

ZADANIE 43

POSZUKIWANIE REGIONÓW DNA SPRZĘŻONYCH Z WAŻNYMI CECHAMI UŻYTKOWYMI (BEZKOLCOWOŚĆ, WIELKOŚĆ OWOCÓW, ZAWARTOŚĆ W OWOCACH EKSTRAKTU I KWASU ASKORBINOWEGO) U MALINY WŁAŚCIWEJ (*RUBUS IDAEUS* L.) POPRZEZ ANALIZĘ TRANSKRYPTOMÓW

OKRES REALIZACJI BADAŃ: 2023

KIEROWNIK ZADANIA:

dr Anita Kuras

e-mail: anita.kuras@inhort.pl

ZESPÓŁ WYKONAWCÓW:

dr hab. Agnieszka Masny, dr hab. Stanisław Pluta, dr Sylwia Keller-Przybyłkowicz,
dr Mariusz Lewandowski, dr Marek Szymajda, dr Łukasz Seliga, mgr Jolanta Kubik,
mgr Bogusława Idczak, mgr Agnieszka Walencik, mgr Renata Czarnecka,
mgr Jarosław Kołodziejski, Krystyna Strączyńska, Krzysztof Pęzik,
Marzena Śnieguła, Katarzyna Skrzeczkowska,

**Instytut Ogrodnictwa –
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice**



CELE PROJEKTU

1. Ocena mieszańców populacji segregującej uzyskanej w wyniku krzyżowania dwóch zróżnicowanych genetycznie genotypów maliny (odmiany 'Heritage' i klonu M-258), pod względem wybranych cech fenotypowych, jak: kolczastość pędów (uwzględniająca ilość i „agresywność” kolców), sposób owocowania (letnie, jesienne, dwukrotne), wielkość owoców, zawartość w owocach ekstraktu i kwasu askorbinowego. **(temat badawczy 1)**
2. Wytypowanie specyficznych fragmentów EST genów o zróżnicowanej ekspresji, pozyskanych w wyniku sekwencjonowania transkryptomu (dwa sezony 2021 i 2022), jako potencjalnie sprzężonych z cechą bezkolcowości/kolcowości pędów oraz weryfikacja ich aktywności metodą qPCR. **(temat badawczy 2)**
3. Ocena polimorfizmu DNA roślin mieszańcowych pokolenia F1, należących do populacji: 'Heritage' × M-258 w regionie genomu warunkującego jakość owoców. **(temat badawczy 3)**

Cele zostały osiągnięte.

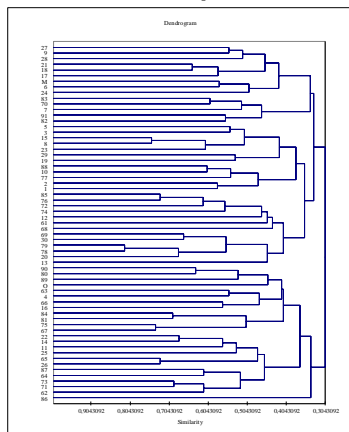
MATERIAŁY I METODY

- Badaniom poddane zostały rosnące w doświadczeniu połowym siewki populacji segregującej ‘Heritage’ × M-258, odznaczającej się wysokim udziałem potomstwa charakteryzującego się brakiem lub małą „agresywnością” kolców, a także rośliny obu genotypów rodzicielskich.
- Wykonano indywidualną ocenę instrumentalną lub bonitacyjną wszystkich siewek i ich form rodzicielskich.
- Indywidualna ocena siewek i ich form rodzicielskich: oceniono stopień kolcowości pędów, sposób owocowania siewek i wielkość owoców, zawartość ekstraktu i kwasu askorbinowego w owocach po ok. 3 miesięcznym okresie ich przechowywania w stanie zamrożonym.
- Analiza polimorfizmu DNA .

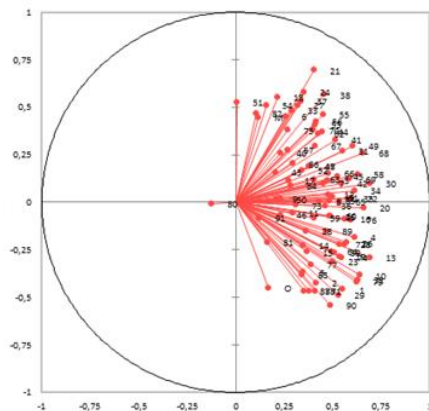


Starter	Długość (pz)	1	2	3	4	5	6	7	8
ru12a	100	+		+				+	
	140		+						
	150	+	+	+	+	+	+	+	+
	190								
	200		+		+	+	+		+
	210								

analiza polimorfizmu DNA



ocena pokrewieństwa (metoda Jaccarda/UPGMA).



Ocena pokrewieństwa analiza głównych składowych (PCA) (metoda Persona)

MATERIAŁY I METODY

TEMAT 2: WERYFIKACJA I WALIDACJA REGULACJI WYŁONIONYCH DEG METODĄ RT-QPCR

MATERIAŁ DO BADAŃ WALIDACYJNYCH (NGS VS. RT-QPCR) - odmiany wzorcowe 'Sokolica' i klonu IO-PIE M-258.

MATERIAŁ DO WERYFIKACJI PRZYDATNOŚCI WYŁONIONYCH GENÓW – łodygi 10 wyselekcjonowanych siewek z populacji 'Heritage' x M-258



Izolacja RNA

Zestaw Qiagen
/lub metoda
Zeng&Yang
2000



Optymalizacja RT-qPCR,

gen ref. Ru18

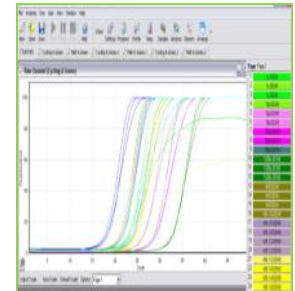
F: ACGTCATCCTCCGGCAAAGC

R: ACGACGAAGCTCGCAAGTACAC

Profil termiczny: 95°C/30s;

60°C/20s;

72°C/20s (40x)



Wytypowano 8 genów o rozpoznanej funkcji (A) i o zróżnicowanej ekspresji w porównywanych próbach roślinnych (do testów RT-qPCR zaprojektowano oligonukleotydy (B) (Primer3PRO))

CECHA	IDENTYFIKATOR GENU	FUNKCJA
A	Ro02_G35580	40S ribosomal protein S13
	Ro04_G22259	multidrug resistance protein
	Ro07_G33818	carbamoyl-phosphate synthase (large chain)
	Ro07_G33724	E3 ubiquitin-protein / ligase listerin
	Ro05_G31461	protein NRT1
	Ro05_G30988	alpha-galacturonidase
	Ro03_G31882	UDP-glycosyltransferase 87A2
	Ro01_G18506	CTP synthase 2

CECHA	SEKWENCJA 5'	SEKWENCJA 3'	ID genu	(pz)
B	gaggagtcaaagccaaaag	ttctcacaatgggctttcc	Ro05_G31461	229
	gtgattctcacgggattgct	actggggaagcttctttgt	Ro02_G35580	259
	tctggaccagaaaagatgg	acgaacttgctgatggttc	Ro05_G30988	186
	tctgctttctgtgccttt	agtgtttgatgctcccaac	Ro04_G22259	217
	gacgctttcgaagctaag	tgtccttcgtggactttcc	Ro07_G33724	224
	gcagagtctggcatgtcgta	gtgtgagcagagctgcagag	Ro04_G27733	217
	tcaatggttccaaaagcaca	aggctttgttgggaatct	Ro03_G31882	220
	atcgccacgacaagtacctc	tttgcgtcccaatttcttc	Ro07_G33818	238

Temat badawczy 1: Indywidualna ocena cech fenotypowych roślin mieszańców maliny, należących do populacji segregującej wytypowanej do badań (około 100 pojedynków)

- Wykazano duże zróżnicowanie badanych 103 genotypów należących do populacji segregującej 'Heritage' x M-258 pod względem: obecności i „agresywności” kolców na pędach i wielkości owoców.
- 46 genotypów zaklasyfikowano do grupy „jesiennych”, a więc owocujących na jednorocznych pędach.
- 25 genotypów odznaczało się owocowaniem na wierzchołkach bardzo wysokich, jednorocznych pędów, co pozwoliło zakwalifikować je do tzw. „dwupiętrowych”,
- 32 genotypy włączono do grupy „letnich”, owocujących na dwuletnich pędach, mimo że tylko u 7 z nich w sezonie 2023 zaobserwowano dojrzewające latem owoce
- 48 siewek wytworzyło owoce o wyższej masie jednostkowej od owoców obu form rodzicielskich.
- Owoce 43 siewek były bogatsze w ekstrakt niż owoce obu odmian rodzicielskich.
- Owoce 32 siewek zawierały więcej kwasu askorbinowego w porównaniu z owocami obu odmian rodzicielskich.
- Przeprowadzone obserwacje obecności i „agresywności” kolców na pędach wykazały duże zróżnicowanie badanych siewek, pędy bez kolców w środkowej i górnej części wytworzyły 44 genotypy (42,7% całej badanej populacji segregującej), z czego 38 roślin (36,9% populacji) wytwarzało pędy całkowicie pozbawione kolców, zaś na pędach 6 siewek (5,8% populacji) obserwowano pojedyncze i łagodne kolce tylko u nasady.
- W przypadku 31 genotypów (30,1% populacji) kolce na pędach były liczne i agresywnie, podobnie jak u odmiany rodzicielskiej 'Heritage'.

Temat 2.: Weryfikacja regulacji wyłonionych DEG metodą qPCR

ANALIZY BIOINFORMATYCZNE

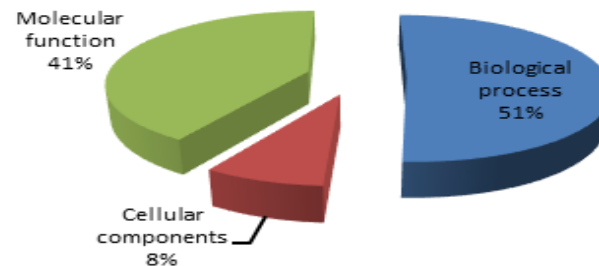
PORÓWNANIE 'SOKOLICA' VS. M-258 I ANALIZA FUNKCJONALNA (GO ENRICHMENT)

bezkolcowości pędów maliny, 265 775 DEG

Funkcja genów:

procesy biologiczne - 135 268 DEG's,
czynniki molekularne - 109 143 DEG's, składni
komórkowe - 21 364 DEG's.

Sokolica vs. M-258



WALIDACJA TYPU REGULACJI WYTYPOWANYCH DEG'S

Cechy bezkolcowości pędów (8 genów)

RNAseq = RT-qPCR (nadekspresja) -

Ro03_G31882, Ro03_G31882, Ro07_G33818,
Ro07_G33724, Ro05_G3146.

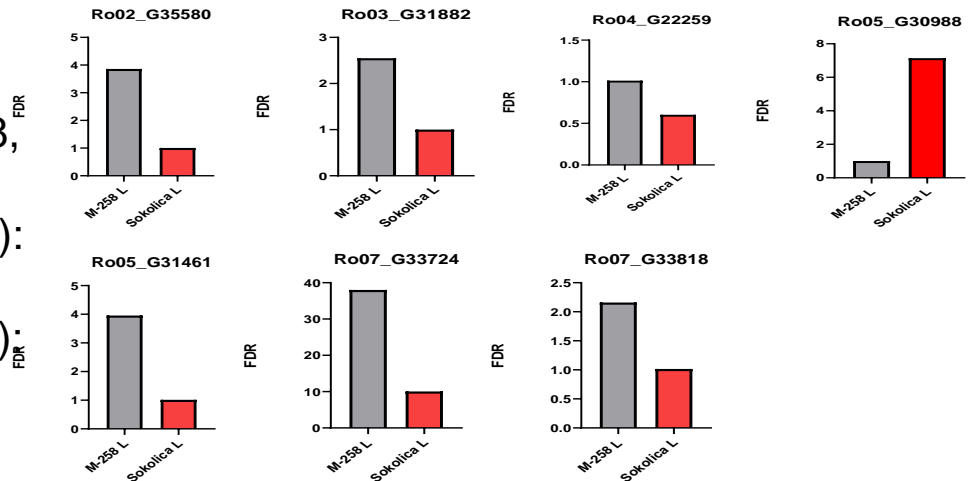
RNAseq ≠ RT-qPCR (nadekspresja ≠ inhibicja):

Ro02_G35580, Ro04_G22259,

RNAseq ≠ RT-qPCR (inhibicja ≠ nadekspresja) •

Ro05_G30988,

Ro01_G18506 brak oczekiwanego produktu
reakcji RT-qPCR.



Temat badawczy 2 – OCENA POZIOMU EKSPRESJI DEG'S

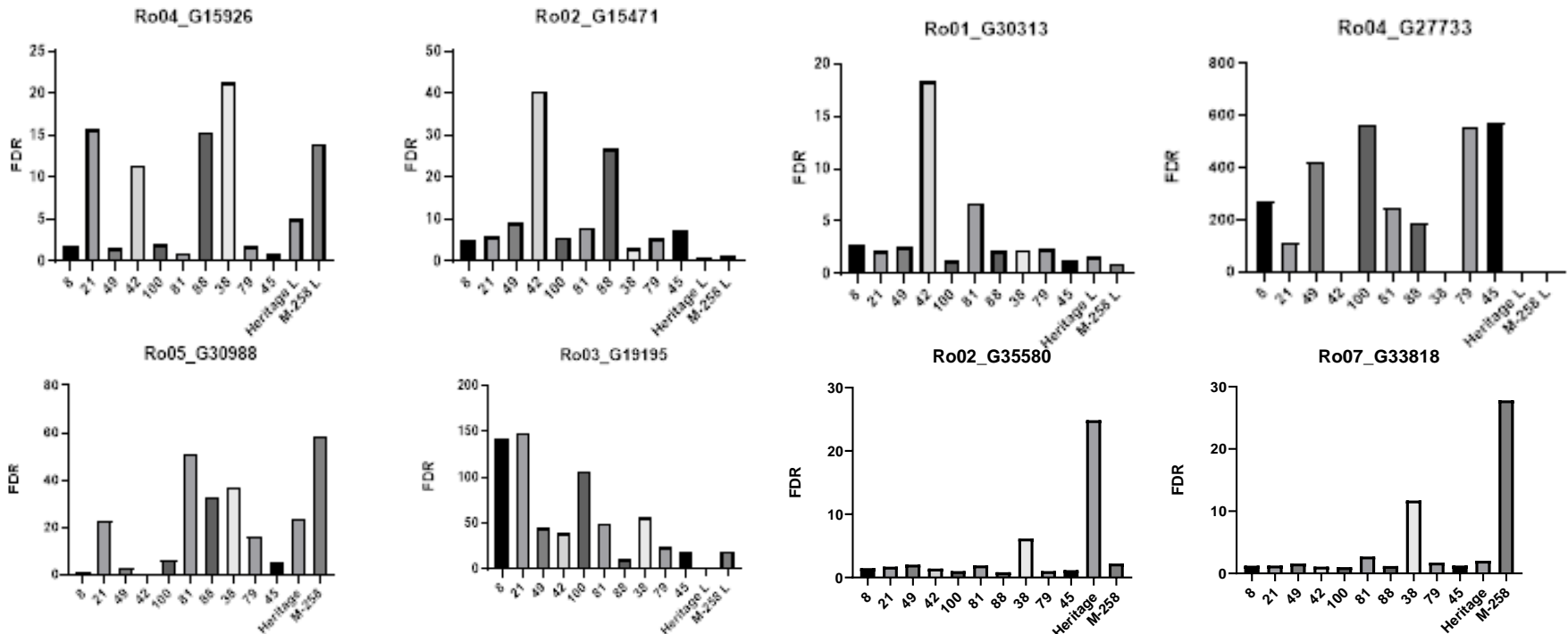
TESTY WALIDACYJNE DLA GENOTYPÓW MIESZAŃCOWYCH ,HERITAGE' x M-258

Ro04_G15926, Ro02_G15471, Ro01_G30313, Ro04_G27733, Ro05_G30988, Ro03_G19195 wykazują korelację między aktywnością genu a cechą kolcowości

Wysoka ekspresja dla genotypów o pędach z kolcami 42 , 81,88.

Ekspresja tych genów była wyższa w genotypach mieszańcowych w porównaniu do form rodzicielskich. Odwrotną zależność dla genów: Ro04_G24959, Ro06_G18552 oraz Ro02_G35580, Ro07_G33818.

15 DEG's - z bazy bibliotek RNA-seq (2021-2023)

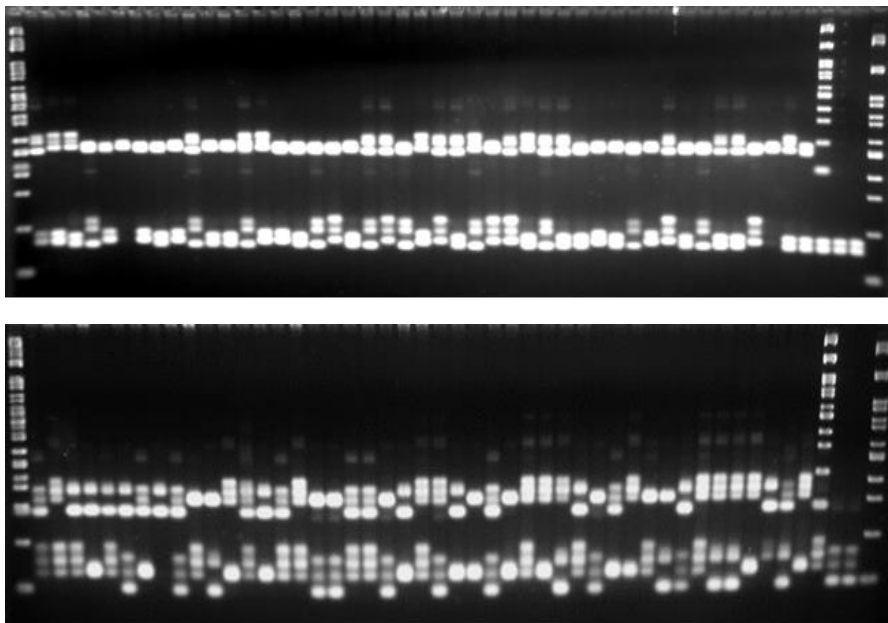


Przykładowe profile ekspresji wytypowanych genów

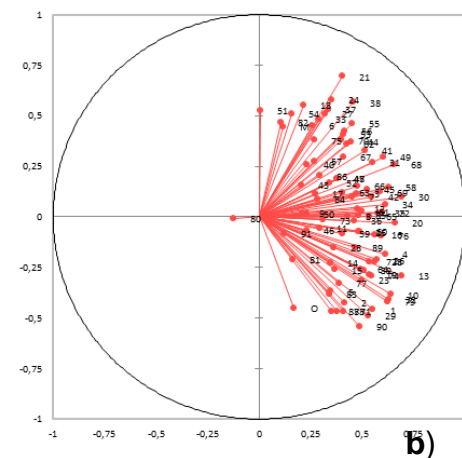
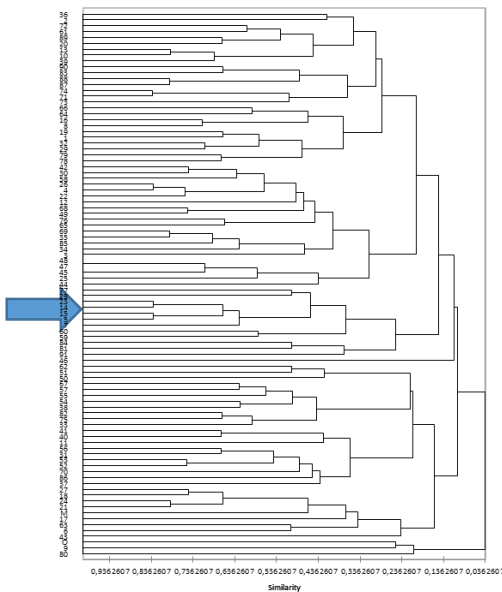
Temat badawczy 3: Ocena polimorfizmu DNA roślin mieszańcowych pokolenia F₁, należących do populacji 'Heritage' × M-258

Łącznie przeprowadzono 5 580 reakcji z 10 parami oligonukletydów, uzyskano 48 polimorficzne amplikony o długości od 100 do 390 pz.

Pokrewieństwo badanych genotypów maliny z populacji 'Heritage' × M-258, określone w oparciu o dane wygenerowane metodą SSR, kształtowało się na poziomie 36-83%. Do grupowania danych dotyczących pokrewieństwa badanych genotypów, zastosowano analizę głównych składowych (PCA). W wyniku której klonów podzielono na dwie grupy o większym podobieństwie genetycznym do jednej z form rodzicielskich użytych w krzyżowaniu.



Przykładowe elektroforegramy produktów amplifikacji metodą SSR na matrycach DNA z roślin



a)

Dendrogram obrazujący pokrewieństwo roślin należących do dwóch populacji: (a) 'Heritage' × M-258 oraz (b) analiza głównych składowych (PCA)

- ✓ Uzyskanie genotypów o dużych owocach i bezkolcowych pędach metodą tradycyjnej hodowli krzyżówkowej jest możliwe, jednak ich liczebność w populacji siewek w znacznym stopniu zależy od właściwego doboru form rodzicielskich do programów krzyżowań.
- ✓ Sporządzono bazę łącznie 558 036 adnotowanych genów o odmiennej aktywności w badanych odmianach / klonach maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.).
- ✓ Dotychczas wyłonione geny nie wykazały jednoznacznie, stabilnej aktywności w badanych próbach, pochodzących z roślin zarówno kolcowych, jak i bezkolcowych.
- ✓ W wyniku przeprowadzonej oceny polimorfizmu DNA roślin mieszańcowych pokolenia populacji F₁ 'Heritage' × M-258 w regionie genomu warunkującego jakość owoców nie potwierdzono skuteczności wytypowanych do badań markerów do selekcji genotypów o różnej wielkości owoców, istnieje konieczność kontynuacji badań.

PREZENTACJA WYNIKÓW BADAŃ NA KONFERENCJI

Poster prezentowany podczas VI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych – Konferencja Naukowa pt. „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka”, Olsztyn, 21-22 czerwca 2023 r., Streszczenia, s. 78.

Abstrakt zamieszczony w materiałach konferencyjnych: VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych – Konferencja Naukowa pt. „Przyjazne środowisku ogrodnictwo w życiu współczesnego człowieka”, Olsztyn, 21-22 czerwca 2023 r., Streszczenia, s. 78.

ANALIZA TRANSKRYPTOMU MALINY WŁAŚCIWEJ *RUBUS IDEAEUS*, DLA WYŁONIENIA GENÓW SPRZĘŻONYCH Z CECHAMI JAKOŚCI OWOCÓW ORAZ BEZKOLCOWOŚCI PĘDÓW



Sylvia Keller-Przybyłkiewicz, Anita Kuras, Agnieszka Walencik, Agnieszka Masny
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Konstytucji 3-go Maja 1/3, 96-100 Skieniewice

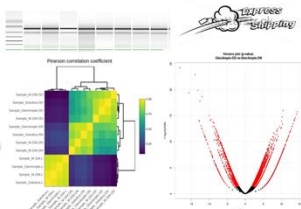
WSTĘP

Malina jest gatunkiem uprawianym w różnych regionach świata. Jej owoce, ze względu na zawartość związków bioaktywnych, m.in. związków fenolowych, antocyjanów i elagitanin, wzbogacają dietę człowieka. Obecnie hodowla maliny skoncentrowana jest na wytworzeniu nowych odmian, charakteryzujących się wysoką plennością i atrakcyjnością owoców, zimotrwałością oraz bezkolcowością pędów. Celem przeprowadzonych badań była identyfikacja fragmentów EST genów sprzężonych z cechami kolcowości oraz jakości owoców (wielkością, zawartością ekstraktu oraz kwasu askorbinowego), uzyskanych z odczytów NGS transkryptomów maliny, a także ich anotacja funkcjonalna.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny liczył: lodygi bez kolców i z kolcem oraz owoce niedojrzałe i dojrzałe, skolekcjonowane z odmian i klonów: 'Glen Ample', M-258 (bezkolcowe, wytwarzają duże owoce) oraz 'Sokolica', M-164 (kolcowe, wytwarzają duże owoce).

ZOLACJA RNA, WG ZENG IYANG, 2000.



Materiał do analiz molekularnych: całkowite RNA do sekwencjonowania *de novo*.

Bioinformatyczna analiza porównawcza odczytów sekwencji FASTQ bibliotek cDNA

1. Usunięcie adapterów Cutadapt
2. Mapowanie uzyskanych odczytów do genomu referencyjnego *Rubus occidentalis* v3.0. plik gff – Hisat2
3. wyszukanie sekwencji w bazie białkowej Uniprot. BLASTX | BLASTP
5. Kocowanie opracowanie wyników – pakiet edgeR.

Weryfikacja typu regulacji genów metodą RT-qPCR.

Materiał roślinny: 'Sokolica', 'Glen Ample', 'Laszka', 'Radziejowa', 'Autumn Treasure' oraz klonu IO-PIB: M-164, M-258.

1. RNA – odwrótna transkrypcja do cDNA (Affinity: qPCR, cDNA Superscript Synthesis Kit, Agilent).
2. RT-qPCR (Kapa Szybki System) (RotorGen 6000, Corbett).
3. W reakcji qPCR zastosowano pary starterów komplementarnych do sekwencji genu referencyjnego *Ru18S18A* (F: ACGTATCTCCGGCAAGC; R: ACGCAAGACTCGCAAGTAC (Wu i in. 2021) oraz genu badanego.

WYNIKI

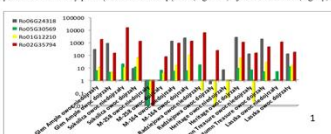
Analizę bioinformatyczną przeprowadzono dla macrz zmapowanych do genomu referencyjnego *Rubus occidentalis*. W tabeli 1 zestawiono próbkę poddane mapowaniu do genomu referencyjnego oraz liczbę odczytów. Procent zmapowanych do genomu *Rubus occidentalis* v3.0 odczytów dla każdej z analizowanych próbek oszacowano w zakresie 85–87%. Rys 1 przedstawia mapę kolorytyczną genów o różnicowanej aktywności DEG z (warunkiem klasyfikacji była różnica zmiany liczby transkryptów LOG-FOLD CHANGE > 2).

Tabela 1. 'Sokolica' (lodyga kolcowa) vs. M-258 (lodyga bezkolcowa).

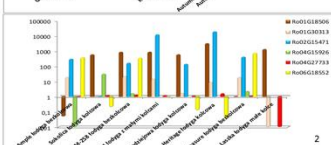
NR	NAZWA PRÓBY	LICZBA PAROWODCZYTÓW
1	GlenAmple-CD (owoc dojrzały)	22 214 452
2	GlenAmple-CN (owoc niedojrzały)	21 813 326
3	Glen Ample (lodyga bez kolców)	27 177 209
4	M-258-CD (owoc dojrzały)	25 061 110
5	M-258-CN (owoc niedojrzały)	24 468 822
6	M-258-L (lodyga mała kolca)	20 907 199
7	M-164-CD (owoc dojrzały)	24 274 674
8	M-164-CN (owoc niedojrzały)	29 040 716
9	M-164-LM (lodyga mała kolca)	28 048 374
10	Sokolica-CD (owoc dojrzały)	26 768 187
11	Sokolica-CN (owoc niedojrzały)	28 911 127
12	Sokolica-L (lodyga kolcowa)	28 199 402
	Suma	304 496 417

KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (GO enrichment) - 51% anotowanych genów - grupa uczestnicząca w regulacji procesów biologicznych, 41% - funkcja molekularna, a 8% - geny kodujące białka komponentów komórkowych.

bazując na uzyskanych danych do dalszych badań weryfikacyjnych wystopowano 10 genów różnicujących cechy badane odnośnie do kąta kolcowości pędów (6 genów) i jakości owoców (4 geny).

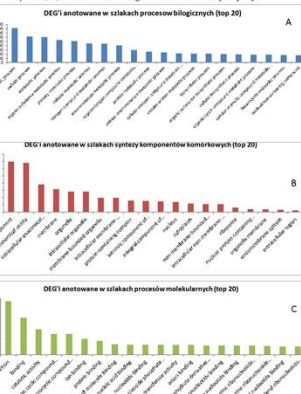


Wykres 1. Profile ekspresji genów regulujących jakość owoców maliny, czerwonoj, wylonionych w eksperymencie NGS.



Wykres 2. Profile ekspresji genów regulujących cechy kolcowości pędów maliny czerwonoj, wylonionych w eksperymencie NGS.

Rys. 2 A, B, C. 'GO enrichment' genów o różnicowanej ekspresji.



Wyniki analizy profilu ekspresji wylonionych genów przedstawiono na wykresach 1 i 2. - wysoka aktywność genu Ro02G35794 (koduje syntazę kofeiny) 3) odnotowano dla odmian produkujących wysokiej jakości duże i smaczne owoce, natomiast dla genów o anotacjach: Ro06G24318 (czynnik transkrypcyjny, funkcja molekularna), Ro02G15471 (funkcja molekularna) oraz Ro01G18506 (koduje syntazę CTP) oszacowano wysoką aktywność w lodygach roślin bezkolcowych.

Wypytowane sekwencje mogą stanowić potencjalne markery funkcjonalne dla badanych cech, przydatne do wczesnej selekcji nowo wytworzonych genotypów maliny właściwej.

LITERATURA
Zeng Y, Yang T. 2012. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. Plant Molecular Biology Reporter, 29(6):417-422.
Wu Y, Zhang C, Yang H, Liu L, Li W, Wu W. 2021. Selection and validation of candidate reference genes for gene expression analysis by RT-qPCR in *Rubus*. 1. 2. of Molecular Sciences, 22, 3013.

ANALIZA TRANSKRYPTOMU MALINY WŁAŚCIWEJ *RUBUS IDEAEUS*, DLA WYŁONIENIA GENÓW SPRZĘŻONYCH Z CECHAMI JAKOŚCI OWOCÓW ORAZ BEZKOLCOWOŚCI PĘDÓW.

Sylvia Keller-Przybyłkiewicz, Anita Kuras, Agnieszka Walencik, Agnieszka Masny.

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul Konstytucji 3-go maja 1/3, Skieniewice

Słowa kluczowe: *Rubus idaeus*, transkryptom, kolcowość pędów, jakość owoców

Malina jest gatunkiem uprawianym w różnych regionach świata. Jej owoce, ze względu na zawartość związków bioaktywnych m.in. związków fenolowych, antocyjanów i elagitanin, wzbogacają dietę człowieka. Obecnie hodowla maliny skoncentrowana jest na wytworzeniu nowych odmian, charakteryzujących się wysoką plennością, zimotrwałością, atrakcyjnymi owocami oraz o pędach bezkolcowych.

Celem przeprowadzonych badań była identyfikacja fragmentów EST genów sprzężonych z cechami kolcowości oraz jakości wewnętrznej owoców, uzyskanych z odczytów NGS transkryptomów maliny, a także ich anotacja funkcjonalna.

Materiał do eksperymentu NGS stanowiły próbki RNA z lodyg oraz owoców (niedojrzały, dojrzały), skolekcjonowane z roślin odmian: 'Sokolica' (odmiana o kolcowych pędach), 'Glen Ample' (odmiana bezkolcowa) oraz klonów IO-PIB: M-164 (wytwarza delikatne kolce) i M-258 (bezkolcowy). Dla przygotowanych preparatów sporządzono biblioteki cDNA a odczyty sekwencji zmapowano do referencyjnego genomu *Rubus occidentalis*. 51% anotowanych genów przypisano do grupy uczestniczących w regulacji procesów biologicznych, 41% - przypisano funkcję molekularną, a 8% zmapowanych sekwencji wykazało homologię do genów kodujących białka stanowiące komponenty komórkowe.

Z poszczególnych grup (na podstawie wartości krotności zmiany ekspresji – FoldChange LogFC > 2) wytypowano dziesięć genów. Sześć z nich różnicowało rośliny o kolcowych pędach, cztery różnicowały odmiany pod względem jakości wewnętrznej owoców. Weryfikację typu regulacji aktywności wylonionych genów (metoda RT-qPCR) przeprowadzono na matrycach cDNA odmian kolcowych 'Sokolica', 'Laszka', 'Radziejowa', 'Heritage' i klonu M-164 oraz bezkolcowych: Glen Ample, 'Autumn Treasure' i klonu M-258 (kolekcja IO-PIB). W reakcji RT-qPCR zastosowano referencyjny gen 18S rRNA o sekwencji oligonukleotydowej określonej dla rodzaju *Rubus*.

W przeprowadzonych testach, wysoka aktywność genu Ro02G35794 (koduje syntazę kofeiny 3) odnotowano dla odmian produkujących wysokiej jakości duże i smaczne owoce, natomiast dla genów o anotacjach: Ro06G24318 (czynnik transkrypcyjny, funkcja molekularna), Ro02G15471 (funkcja molekularna) oraz Ro01G18506 (koduje syntazę CTP) oszacowano wysoką aktywność w lodygach roślin bezkolcowych.

Wypytowane sekwencje mogą stanowić markery funkcjonalne dla badanych cech, przydatne do wczesnej selekcji nowo wytworzonych genotypów maliny właściwej.

Przedstawione wyniki uzyskano w ramach badań na rzecz postępu w produkcji roślinnej, finansowanych przez MRiRW - zadanie 43.

