

Adres korespondencyjny:
sylwia.keller@inhort.pl

WSTĘP

Malina jest gatunkiem powszechnie uprawianym w wielu krajach świata, w tym również w Polsce i cenionym głównie ze względu na zdrowe i smaczne owoce, przydatne do konsumpcji w stanie świeżym, jak i przetworzonym. Oprócz licznych zalet, jak wysoka plenność, zimotrwałość, atrakcyjne owoce, większość uprawianych odmian posiada liczne kolce o zróżnicowanej agresywności, które występują niemal na wszystkich organach rośliny – na pędach, szypułkach owocowych, ogonkach liściowych, a także na nerwach liści po ich dolnej stronie. Ich obecność utrudnia prace przy pielęgnacji roślin i zbiorze owoców.

Celem prowadzonych w IO-PIB badań jest zidentyfikowanie specyficznych genów o zróżnicowanej ekspresji w pędach, wyłonionych w wyniku sekwencjonowania transkryptomu (dwa sezony 2021 i 2022), jako potencjalnie sprzężonych z cechą bezkolcowości/kolcowości pędów oraz weryfikacja ich aktywności metodą RT-qPCR.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny: łodygi, skolekcionowane z roślin odmiany 'Sokolica' (wytwarza pędy z kolcami) i klonu IO-PIB: M-258 (wytwarza pędy bez kolców).

Materiał roślinny do weryfikacji przydatności wyłonionych genów: próbki łodyg skolekcionowane z 10 wyselekcjonowanych siewek z populacji 'Heritage' x M-258 (oznaczona jako H x M-258).

Materiał do analiz molekularnych: całkowite RNA badanych prób. Genom ref: *R. occidentalis* v.3.0 (www.rosaceae.org/species/rubus/all)

Baza sekwencji do bioinformatycznej analizy porównawczej odczytów FASTQ - 'Sokolica'L vs. M-258L (L-próby pędów).

Materiał do oceny liczby transkryptów DEGs: w genomach genotypów rodzicielskich i mieszańcowych z populacji segregującej 'Heritage' x M-258.

Testy weryfikacyjne

RNA— odwrotna transkrypcja do cDNA (Affinity QPCR cDNA Superscript Synthesis Kit, Agilent).

RT-qPCR - Kappa SybrqPCR (KappaBiosystems); RotorGen 6000, Corbett, Life Science.

Ocena profili ekspresji—metoda porównania krzywych standardowych (Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7.), krotność zmiany ilości transkryptów—metoda $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Wykresy profili ekspresyjnych—program GraphPad PRISM 8.0.

WYNIKI

W wyniku analizy porównawczej bibliotek cDNA uzyskanych dla odmiany 'Sokolica' oraz klonu M-258 zidentyfikowano 3 681 genów o zróżnicowanej ekspresji (DEG– Differentially Expressed Genes).

GO enrichment—KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: Funkcje genów przypisano do trzech grup obejmujących: procesy biologiczne - (51%), czynniki molekularne - (41%) oraz kodujących składniki komórkowe - (8%).

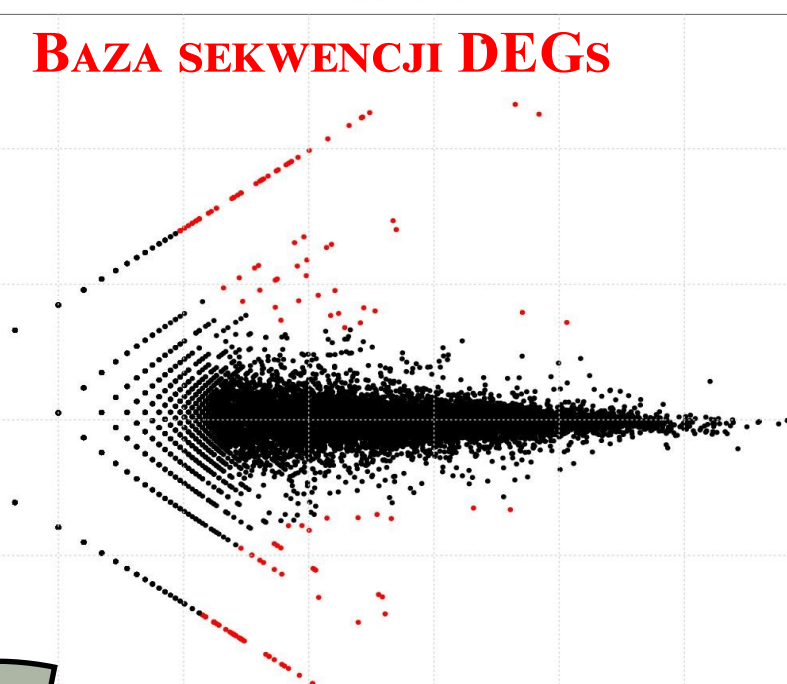
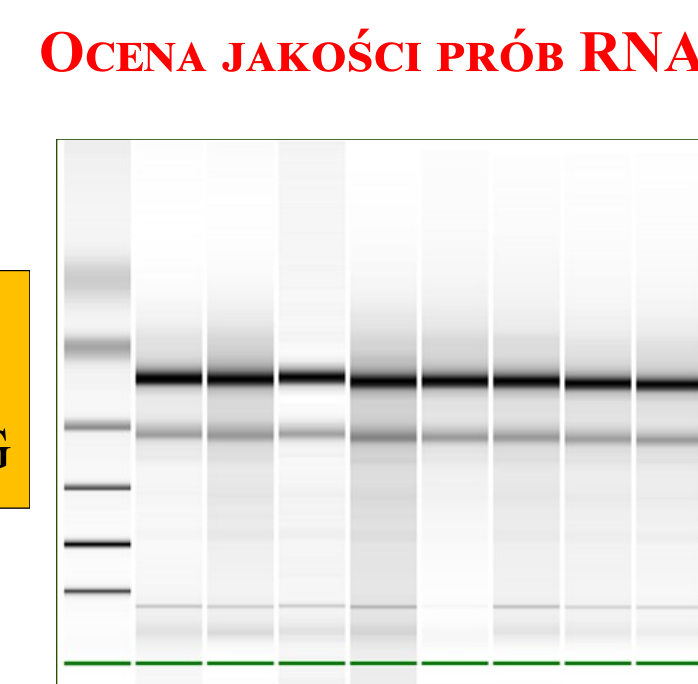
Na bazie odczytów DEG uzyskanych z analizy porównawczej transkryptomów *R. idaeus* vs. *R. occidentalis* wytypowano 15 genów (Tabela 1.), zmapowanych na genom referencyjny maliny czarnej, dla których przeprowadzono testy weryfikacyjne na matrycach 10 genotypów mieszańcowych z populacji H x M-258.

Tabela 1. Zestawienie funkcji genów wytypowanych do testów weryfikacyjnych

CHROMOSOM IDENTYFIKATOR GENU	FUNKCJA WYTYPOWANEGO GENU
Ro04_G26206	Aktywność syntetazy kwasów tłuszczowych.
Ro04_G24959	Aktywność syntetazy kwasów tłuszczowych
Ro0_G30096	Integralne białko błony komórkowej, wiązanie jonów żelaza podczas syntezy i zagęszczania kwasów tłuszczowych.
Ro03_G19195	Integralne białko błony komórkowej, transporter jonów wapnia oraz regulator homeostazy wapniowej w komórce,
Ro01_G30313	nieznana
Ro04_G15926	Białko zawierające domenę KH wiążącą RNA
Ro06_G18552	Izoforma 1 białka podobnego do Drm3, białko związane ze stanem uśpienia/auksyną
Ro02_G15471	nieznana
Ro04_G27733	Hipotetyczne białko PRUPE_1G479900, białko rodziny helikazy RNA: DEAD/DEAH box
Ro02_G35580	Rybosomalne białko S13 podjednostki S40
Ro04_G22259	Białko stresu suszy
Ro07_G33818	Syntaza karbamioilfosforanowa (duży łańcuch)
Ro05_G31461	Białko NRT1
Ro05_G30988	Alfa-galakturonidaza
Ro03_G31882	UDP-glykosyltransferaza 87A2



IZOLACJA RNA, wg. metody opisanej przez ZENG & YANG

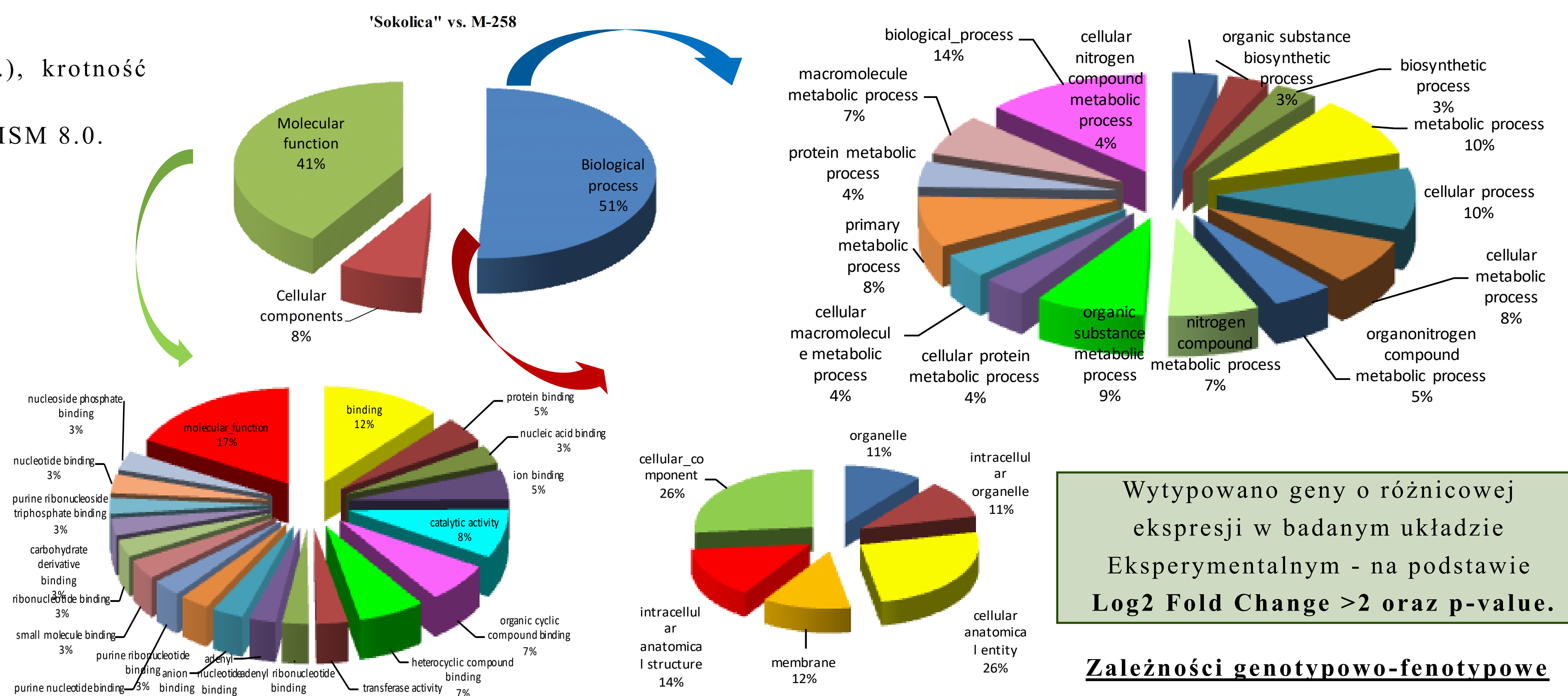
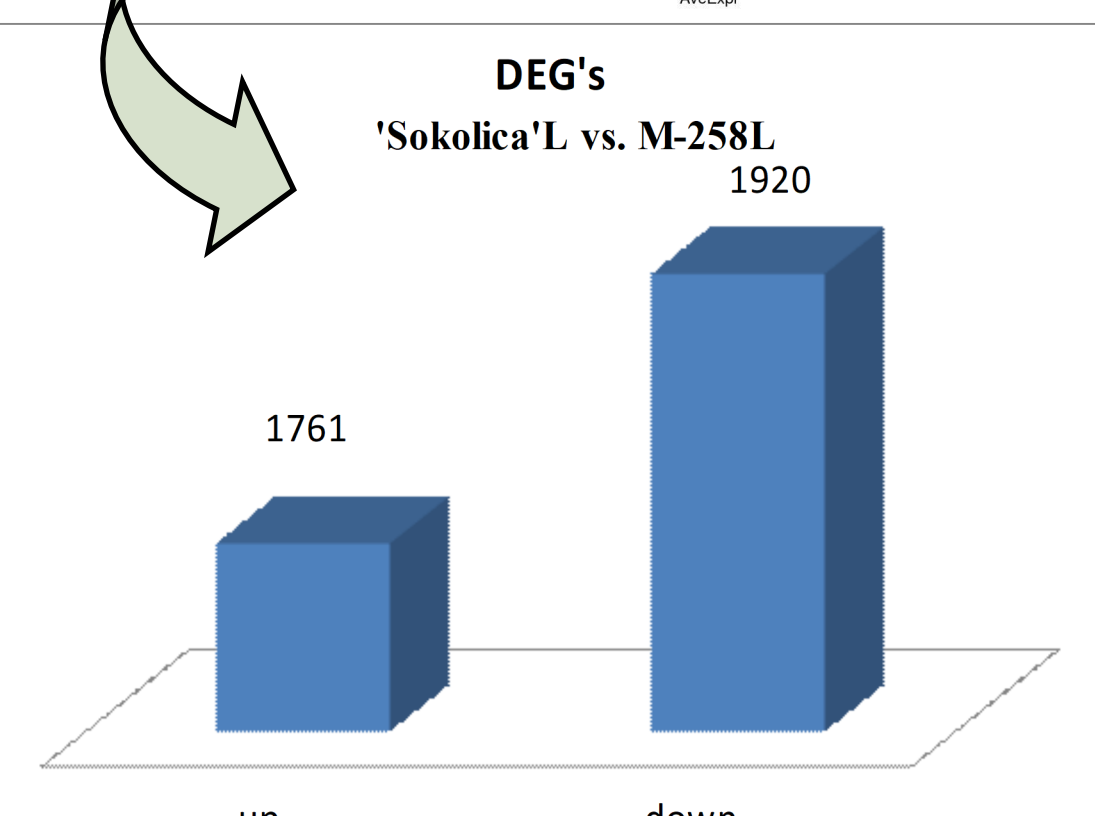
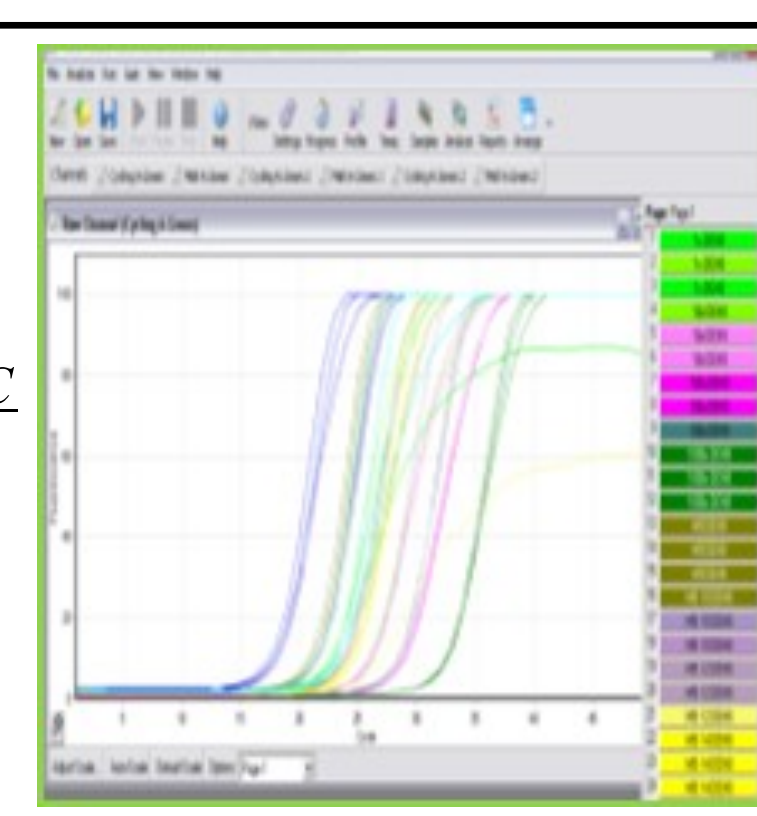


Optymalizacja testu qPCR, gen ref. *Ru18sRNA*

F: ACGCATCCTCCGGCAAAGC
R: ACGACGAGCTCGCAAGTACAC

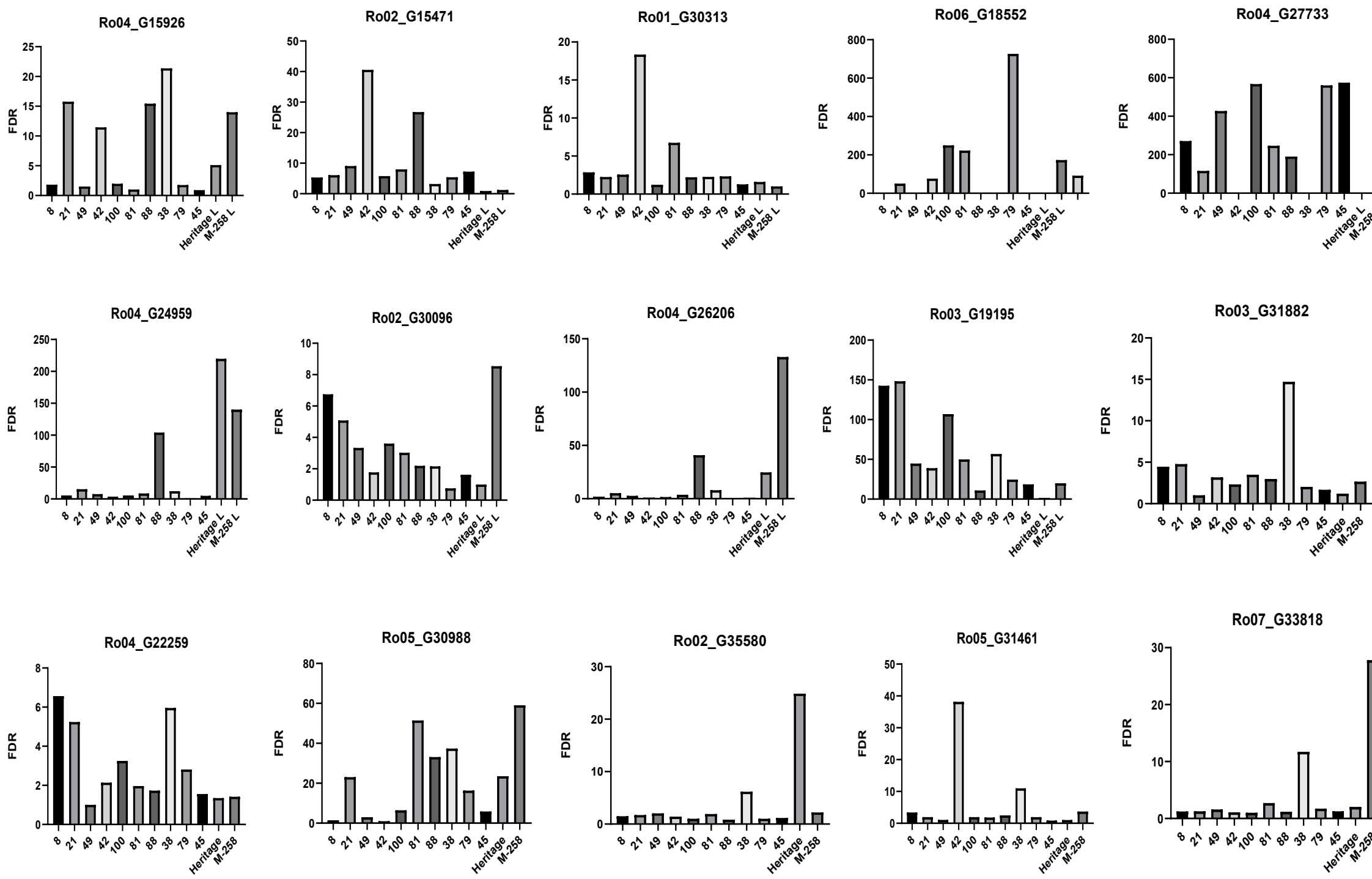
Profil termiczny:

95°C/30s;
60°C/20s;
72°C/20s (40x)



Wytypowano geny o różnicowej ekspresji w badanym układzie Eksperymentalnym - na podstawie **Log2 Fold Change >2 oraz p-value.**

Profile ekspresji 15 wytypowanych genów uzyskane na matrycy genotypów zróżnicowanych pod kątem cechy bekolcowości i agresywności występowania kolców na pędach maliny genotypów z populacji segregującej H x M-258.



- Sześć genów o adnotacjach: Ro04_G15926, Ro02_G15471, Ro01_G30313, Ro04_G27733, Ro05_G30988, Ro03_G19195 wykazało istotną korelację między podwyższoną aktywnością genu a występowaniem cechy kolcowości pędów.
- Wysoką liczbę transkryptów ww.genów odnotowano u genotypów o numerach 42, 81, 88, wytwarzających pędy z kolcami.
- U mieszańców ekspresja tych genów była znacznie wyższa (krotność zmiany ekspresji w przedziale 5 do 600) w porównaniu do ich form rodzicielskich.
- Odwrotną zależność (wyższa ekspresja u form rodzicielskich) zaobserwowano dla 3 genów o adnotacjach: Ro04_G24959, Ro06_G18552 oraz Ro02_G35580 (nadekspresja u kolcowej odmiany 'Heritage') i jednego o adnotacji Ro07_G33818 (nadekspresja u bezkolcowego klonu M-258).

PODSUMOWANIE

- Badania (oparte na genomice porównawczej) umożliwiły wstępną identyfikację genów o rozpoznanej adnotacji, dla których podjęto próbę opracowania molekularnych markerów funkcjonalnych, umożliwiających monitorowanie występowania cechy bezkolcowości u roślin gatunku *Rubus idaeus*.
- Wyłonione geny nie wykazały jednoznacznie stabilnej aktywności w badanych próbach, pochodzących z roślin zarówno kolcowych, jak i bezkolcowych.

Wyniki uzyskano w ramach badań na rzecz postępu w produkcji roślinnej, finansowanych przez MRiRW - zad. 43: Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi ... maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.)