

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: 2021

KIEROWNIK ZADANIA:

dr Anita Kuras,

e-mail: anita.kuras@inhort.pl

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

ZESPÓŁ WYKONAWCÓW: dr hab. Mirosława Cieślińska, dr hab. Agnieszka Masny, dr hab. Stanisław Pluta, dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, dr Mariusz Lewandowski, dr Marek Szymajda, dr Łukasz Seliga, mgr Jolanta Kubik, mgr Bogusława Idczak, mgr Agnieszka Walencik, mgr Agnes Laszlovszky-Zmarlickine, mgr Renata Czarnecka, mgr Jarosław Kołodziejcki, Krystyna Strączyńska, Krzysztof Pęzik, Dorota Starzec, Marzena Śnieguła, Maria Kalisiak, Igor Stankiewicz, Ilona Skiba



CELE PROJEKTU

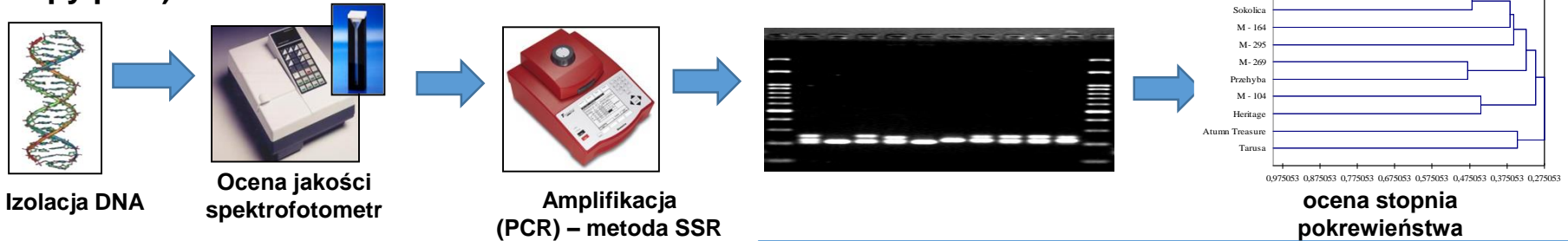
1. Ocena zróżnicowania genetycznego potencjalnych form rodzicielskich maliny właściwej i przygotowanie biblioteki polimorficznych ampliconów do weryfikacji ich potomstwa.
2. Analiza regionów genomu maliny właściwej warunkujących jakość i wielkość owoców przeprowadzona dla 10 wybranych genotypów maliny właściwej, zróżnicowanych pod kątem ww. cech fenotypowych.
3. Ocena stanu zdrowotnego wybranych genotypów maliny właściwej, przed ich włączeniem do programu krzyżowań, co pozwoli na upewnienie się, że użyte w badaniach genotypy są wolne od groźnych chorób wirusowych.
4. Wykonanie dwóch kombinacji zapyleń dla uzyskania populacji segregujących, z wykorzystaniem genotypów o pędach pozbawionych kolców oraz genotypów wytwarzających duże i atrakcyjne owoce.
5. Wytypowanie specyficznych fragmentów EST, pozyskanych w wyniku sekwencjonowania transkryptomu, jako potencjalnie sprzężonych z cechą bezkolcowości / kolcowości pędów oraz jakości wewnętrznej owoców maliny. Po uzyskaniu odczytów sekwencji różnicujących genomy wytypowanych genotypów wzorcowych przeprowadzona będzie ich adnotacja funkcjonalna.

Cele zostały osiągnięte.

MATERIAŁY I METODY

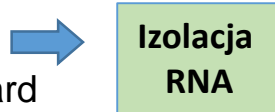
- ✓ **Analiza polimorfizmu DNA:** genotypy maliny czerwonej wytwarzające pędy bez kolców ('Tarusa', 'Autumn Treasure', klon M-295, klon M-269, klon M-258) oraz odznaczające się dużymi i atrakcyjnymi owocami ('Sokolica', 'Przehyba', 'Heritage', klon M-104 i klon M-164).

(etapy prac)



- ✓ **Genotypowania metodą NGS:** z roślin odmian 'Autumn Treasure', 'Heritage' oraz klonów IO-PIB: M-164 i M-258 kolekcjonowano tkankę:

łodygi kolcowej i bezkolcowej oraz owoców dojrzałych i niedojrzałych, Sokolica' – Standard



- ✓ **Bioinformatyczna analiza porównawcza bibliotek, odczytów sekwencji FASTQ.**

- usunięcie adapterów Cutadapt.
- mapowanie uzyskanych odczytów Hisat2.
- Genom referencyjny *Rubus occidentalis* v3.0. gff3.
- Baza białkowej Uniprot, BLASTX i BLASTP – edgeR.

Wyłonienie sekwencji EST genów o różnicowanej aktywności

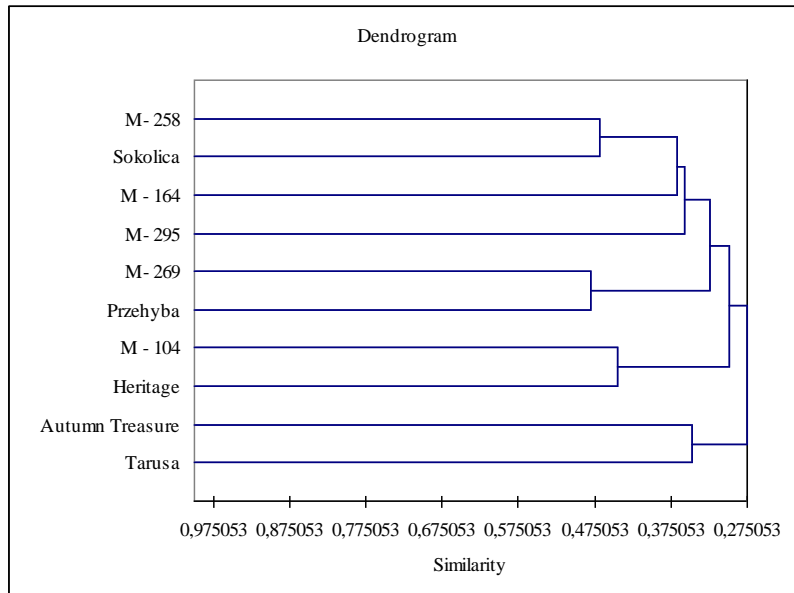
- ✓ **Weryfikacja typu regulacji genów metodą qPCR:** 'Sokolica', 'Glen Ample', 'Schönemann', 'Radziejowa', klony M-258 i M-164 (specyficzne oligonukleotydy zaprojektowane w badaniach, Primer3PRO)

- **Badania na obecność wirusa krzaczastej karłowatości maliny (RBDV):** metoda DAS-ELISA oraz RT-PCR. (etapy prac):

- Kwasy nukleinowe izolowano metodą adsorbpcji na żelu krzemionkowym.
- Do amplifikacji fragmentów cDNA stosowano startery: CPh-F/CPh-R, RYN1-f/RYN1-r oraz RLbv-1f/RLbv-1r.
- Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie w 1,2% żelu agarozowym, barwiono bromkiem etydyiny i analizowano w świetle UV.

Temat badawczy 1: Ocena stopnia polimorfizmu DNA 10 genotypów (potencjalnych form rodzicielskich) maliny.

- Łącznie przeprowadzono 1100 reakcji amplifikacji z 20 parami oligonukleotydów, uzyskano 123 amplikony, z których dwa były monomorficzne o długości od 90 do 700 pz.
- Utworzono bibliotekę polimorficznych amplikonów, badane genotypy scharakteryzowano na podstawie 32-46 alleli. Do analizy potomstwa uzyskanego w wyniku krzyżowania użytych w badaniu form rodzicielskich wytypowano zestaw dziewięciu oligonukleotydów: ru12a, ru24a, ru25a, ru26a, ru35a, ru57a, 116a, 117b, ru228a, generujących najwięcej polimorficznych amplikonów.
- Pokrewieństwo badanych genotypów maliny określone w oparciu o dane wygenerowane metodą SSR, kształtowało się na poziomie 16-48%. Najwyższe wskaźniki pokrewieństwa genetycznego obserwowano dla genotypów: M-258, 'Sokolica', oraz M-269, 'Przehyba' jak również M-104, 'Heritage' wynosi on odpowiednio 47%, 48%, 44%. Najniższy wskaźnik pokrewieństwa genetycznego z pozostałymi roślinami odnotowano dla genotypów 'Autumn Treasure' oraz 'Tarusa' i wynosił on ok. 20% .



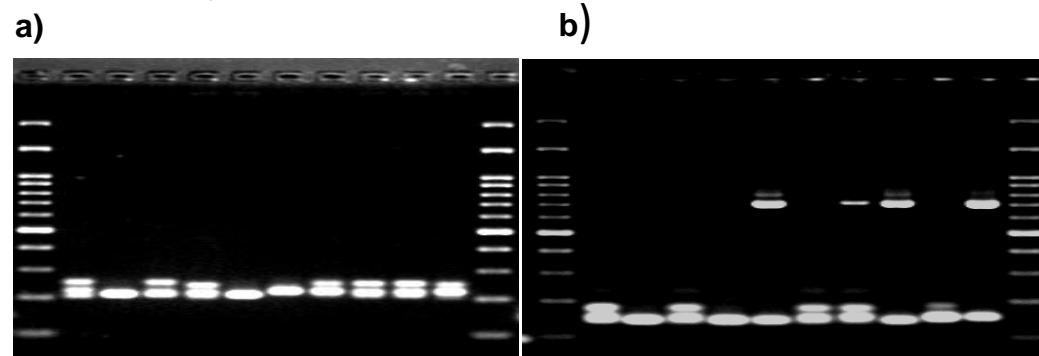
Dendrogram obrazujący pokrewieństwo 10 genotypów maliny(Jaccard/ UPGMA)

Wnioski:

- Uzyskana biblioteka polimorficznych amplikonów jest narzędziem do weryfikacji potomstwa badanych form rodzicielskich maliny.
- Do utworzenia 2 populacji segregujących wytypowano genotypy 'Autumn Treasure', 'Heritage', klony M-164 oraz M-258, oddalone genetycznie i zróżnicowane pod względem badanych cech.

Temat badawczy 2: Ocena 10 genotypów maliny w oparciu o grupy genów warunkujących jakość i wielkość owoców z użyciem technik analizy DNA

Łącznie przeprowadzono 600 reakcji z 10 parami oligonukleotydów, uzyskano 52 polimorficzne amplikony o długości od 140 do 700 pz. W reakcji z oligonukleotydami: Rubus25a, Rubus166b, Rubus210a, RiM015 i Rubis222e, obserwowano fragmenty DNA o długości odpowiednio 150 i 160, 130, 110, 360 i 240 pz najprawdopodobniej skorelowane z wielkością owoców.



Przykładowe elektroforegramy produktów amplifikacji metodą SSR na matrycach DNA z 10 roślin malinyz oligonukleotydem: a) Rubus 35a, b) Rubus 25a

Wnioski

•Na obecnym etapie prac nie udowodniono, że wytypowane markery są znacząco i jednoznacznie skorelowane z cechami jakości owoców, w związku z tym istnieje potrzeba kontynuowania badań w kolejnych latach realizacji projektu.

Temat badawczy 3: Ocena stanu zdrowotnego wybranych genotypów maliny przed ich włączeniem do programu krzyżowań (4 genotypy x 10 roślin = 40 form rodzicielskich).

Na podstawie uzyskanych wyników testu DAS-ELISA stwierdzono obecność RBDV w roślinach klonów maliny oznaczonych: 'Heritage' oraz nr 164 – rośliny 7, 8, 9 i 10. Testy RT-PCR nie wykazały obecności wirusa cętkowanej plamistości liści maliny (RLMV), wirusa żółtaczkli nerwów liści maliny (RYNV) i wirusa plamistości maliny (RLBV) w próbach liści pobranych z badanych roślin maliny. Na roślinach tych nie obserwowano również żadnych objawów wskazujących na infekcję wirusami.

Wnioski

- Brak objawów chorobowych nie wykluczał porażenia roślin przez RBDV.
- Wykrycie RBDV w 10 spośród 40 badanych roślin może wskazywać na obecność potencjalnego źródła wirusa w sąsiedztwie.
- Badane rośliny maliny były wolne od RLMV, RYNV i RLBV.



Temat badawczy 4: Ocena możliwości uzyskania populacji segregującej maliny właściwej

- Wykonano dwie kombinacje krzyżowań z udziałem genotypów rodzicielskich charakteryzujących się pędami całkowicie pozbawionymi kolców ('Autumn Treasure', M-258) oraz dużymi i atrakcyjnymi owocami ('Heritage', klon M-164).
- Liczba zapylnych kwiatów w obu kombinacjach krzyżowań była zróżnicowana i wynosiła dla 'Heritage' × M-258 – 42 kwiaty, a dla 'Autumn Treasure' × M-164 – 15 kwiatów, zaś liczba owoców – odpowiednio 33 i 8. Łącznie zapylnono 57 kwiatów, z których uzyskano 41 owoców.
- Średnia efektywność zapyłania, wyrażona jako procent uzyskanych owoców w stosunku do zapylnych kwiatów, wynosiła 66 %. Porównując obie kombinacje krzyżowań, lepszą efektywnością zapyłania, wynoszącą 78,6 %, odznaczała się kombinacja 'Heritage' × M-258.
- Średnia masa owoców, zebranych w obu kombinacjach krzyżowań była zróżnicowana i wynosiła, w przeliczeniu na jeden owoc, 1,38 g. Większymi owocami (1,55 g) charakteryzowała się kombinacja 'Heritage' × M-258.
- Z zebranych owoców uzyskano łącznie 1331 nasion, co pozwalało wyliczyć, że jeden owoc maliny właściwej zawierał przeciętnie 26 nasion. Więcej nasion w jednym owocu (36,6 szt.) stwierdzono w kombinacji 'Heritage' × M-258. Liczba nasion uzyskana w obu kombinacjach krzyżowań była zróżnicowana. Znacznie więcej nasion uzyskano w wyniku krzyżowania odmiany 'Heritage' i klonu M-258.

Wnioski

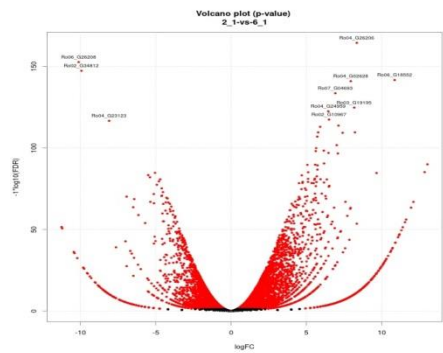
Możliwe jest otrzymanie nasion mieszańcowych dla dwu populacji segregujących: 'Heritage' × M-258 oraz 'Autumn Treasure' × M-164 w wyniku krzyżowania genotypów maliny 'Heritage' i M-164, oddalonych od siebie genetycznie i odznaczających się dużymi i atrakcyjnymi owocami, z genotypami M-258 i 'Autumn Treasure', posiadającymi pędy pozbawione kolców.



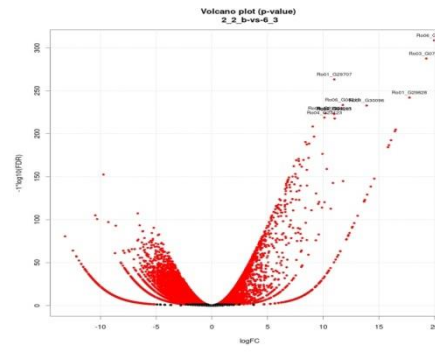
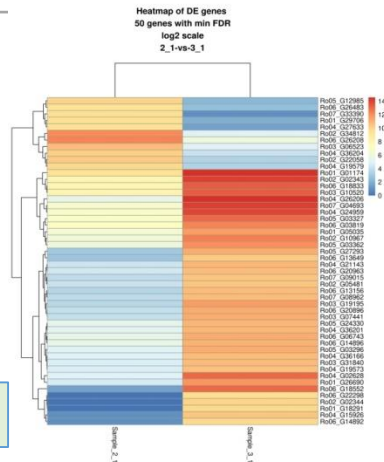
Temat badawczy 5: Ocena 10 genotypów maliny w oparciu o grupy genów warunkujących jakość i wielkość owoców z użyciem technik analizy DNA

Analiza NGS: Liczba odczytów - **272 198 883**

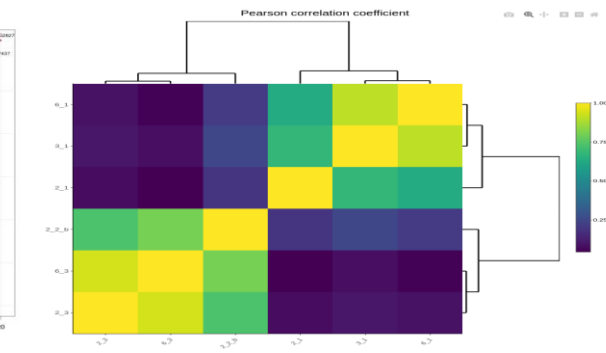
Porównania plików wynikowych Pokrycie genomu <i>R. occidentalis</i> <35,43 % – 90,14 %>	Cecha dla której podjęto identyfikację sekwencji deEST
Sokolica (łodyga kolcowa) vs. M-258 (łodyga bezkolcowa)	Cecha kolcowości pędów maliny
Sokolica (łodyga kolcowa) vs. Autumn Treasure (łodyga bezkolcowa)	
Sokolica (owoce niedojrzałe) vs. Sokolica (owoce dojrzałe)	Cecha jakości owoców maliny
Sokolica (owoce niedojrzałe) vs. M-258 (owoce dojrzałe)	



Kolcowość/bezkolcowość



Jakość owoców



Mapa korelacji prób porównywanych

Wytypowanie genów o zróżnicowanej ekspresji, analiza poziomu ekspresji 10 genów najbardziej zróżnicowanych pod kątem aktywności w porównywanych próbach roślinnych

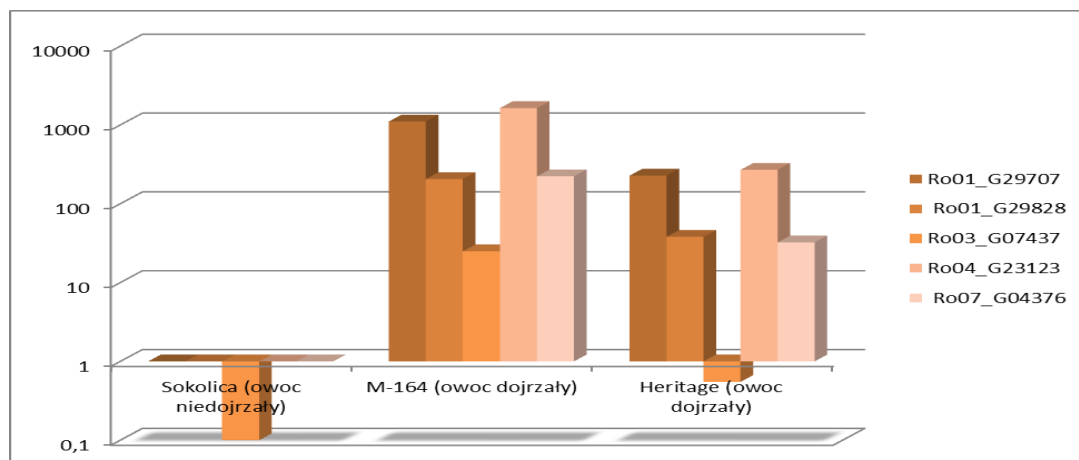
- 5 genów dla cechy kolcowości maliny - zbadano dla odmian: 'Autum Treasure', 'Sokolica', 'Glen Ample', M-164, 'Heritage', M-258, 'Radziejowa' i 'Schönemann'
- 5 genów dla cechy jakości wewnętrznej owoców : dla odmian: 'Sokolica', M-164 i 'Heritage'



qPCR

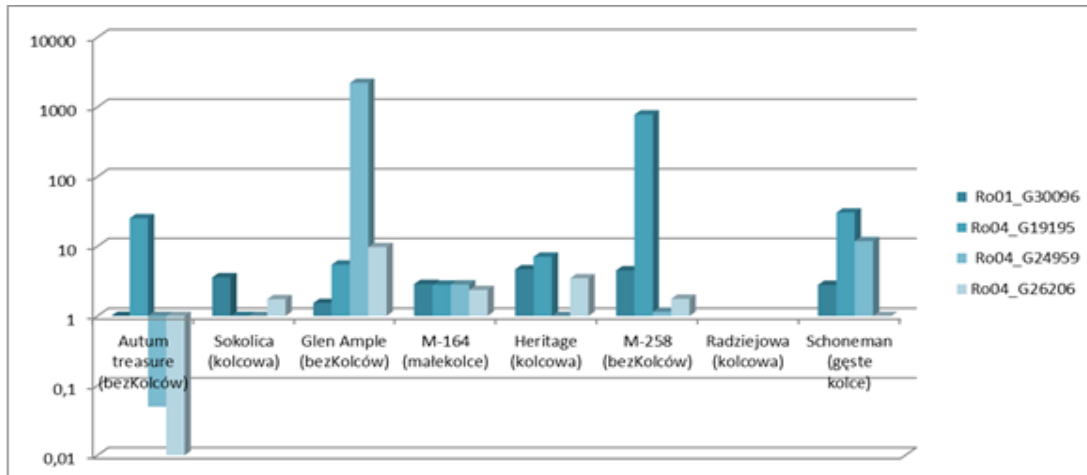
WYNIKI (temat badawczy 5 cd.)

Profil ekspresji (qPCR) genów regulujących jakość wewnętrzną owoców maliny czerwonej



- Wzrost aktywności Ro01_G29707, Ro01_G29828, Ro03_G07437, Ro07_G04376, Ro04_G23123, w owocach dojrzałych klonu M-164 (duże słodkie owoce).
- 10x mniejsza aktywność genów Ro01_G29707 i Ro04_G23123, - dojrzałe owocach 'Heritage' (owoce średniej jakości)
- W owocach niedojrzałych nie zaobserwowano istotnej aktywności wyłonionych genów

Profil ekspresji (qPCR) genów regulujących cechę kolcowości pędów maliny czerwonej,



- Aktywność genów Ro04_G24959 i Ro04_G19195, Ro04_G26206 w odmianach bezkolcowych: 'Autum Treasure', 'Glen Ample' i M-258.
- Gen Ro01_G30096 istotnie wysoki poziom transkryptu w odmianach kolcowych,
- Dla odmiany 'Radziejowa' - brak różnicowania w poziomie ekspresji
- Brak oczekiwanego produktu dla genu Ro02_G34812

Ten sam typ regulacji w NGS i qPCR.

Ro02_30096, Ro03_19195, Ro04_24959, Ro04_26206 - kolcowości

Ro01_29828, Ro07_04376, Ro04_23123, Ro01_29207 - jakości owoców



8 funkcjonalnych
markerów
molekularnych

WNIOSKI

1. Uzyskano bibliotekę polimorficznych amplikonów , która jest doskonałym narzędziem do weryfikacji potomstwa badanych form rodzicielskich maliny.
2. Do utworzenia 2 populacji segregujących wytypowano genotypy: 'Autumn Treasure', 'Heritage', klony M-164 oraz M-258, oddalone genetycznie i zróżnicowane pod względem badanych cech. Dotychczas wytypowane markery do selekcji genotypów pod względem jakości wewnętrznej i zewnętrznej owoców, nie są znacząco i jednoznacznie skorelowane z badaną cechą,
3. Brak objawów chorobowych nie wykluczał porażenia roślin przez RBDV.
4. Wykrycie RBDV w 10 spośród 40 badanych roślin może wskazywać na obecność potencjalnego źródła wirusa w sąsiedztwie.
5. Badane rośliny maliny były wolne od RLMV, RVCV i RLBV.
6. Możliwe jest otrzymanie nasion mieszańcowych dwu populacji segregujących: 'Heritage' × M-258 oraz 'Autumn Treasure' × M-164 w wyniku krzyżowania genotypów maliny 'Heritage' i M-164, oddalonych od siebie genetycznie i odznaczających się dużymi i atrakcyjnymi owocami, z genotypami M-258 i 'Autumn Treasure', posiadającymi pędy pozbawione kolców.
7. Sporządzono bazę sekwencyjną - 6 000 adnotowanych genów o odmiennej aktywności w badanych odmianach / klonach maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.).
8. Osiem genów: Ro02_30096, Ro03_19195, Ro04_24959, Ro04_26206, Ro01_29828, Ro07_04376, Ro04_23123, Ro01_29207, wykazało przydatność do wstępnego określenia statusu molekularnego odmian maliny i mogą stanowić specyficzne funkcjonalne markery do wczesnej selekcji roślin kolcowych / bezkolcowych o wysokiej jakości owoców.