

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: 2022

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 Agnes Laszlovszky-Zmarlickine, Krystyna Strączyńska, Krzysztof Pęzik,
mgr Jarosław Kołodziejski, Marzena Śnieguła, Katarzyna Skrzeczkowska,

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



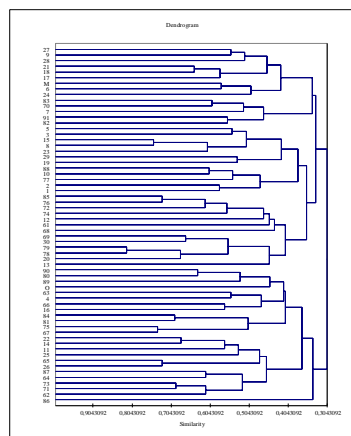
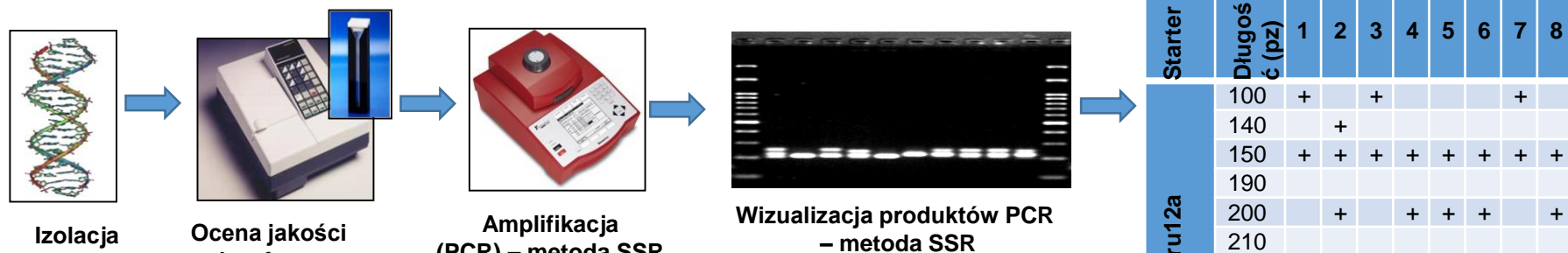
CELE PROJEKTU

1. Ocena mieszańców dwóch populacji segregujących uzyskanych w wyniku krzyżowania zróżnicowanych genetycznie form rodzicielskich maliny właściwej pod względem cechy bezkolcowości pędów (*temat badawczy 1*).
2. 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 (*temat badawczy 2*).
3. Ocena polimorfizmu DNA roślin mieszańców pokolenia F_1 , należących do populacji segregującej wytypowanej do badań i eliminacja z populacji genotypów o nieustalonym rodowodzie, tzw. outcross (*temat badawczy 3*).

Cele zostały osiągnięte.

MATERIAŁY I METODY

- Materiał badawczy siewki 2 rodzin mieszańców, wyprodukowane z nasion otrzymanych w wyniku realizacji w roku 2021 programu krzyżowań z użyciem czterech form rodzicielskich: ‘Heritage’ × M-258 oraz ‘Autumn Treasure’ × M-164.
- Indywidualna ocena siewek i ich form rodzicielskich pod względem kolcowości pędów i wytypowanie do dalszych badań populacji segregującej.
- Założenie doświadczenia polowego - łącznie 102 mieszańce oraz po 15 roślin ich form rodzicielskich.
- Analiza polimorfizmu DNA.



ocena pokrewieństwa
(metoda Jaccarda/UPGMA).

**ELIMINACJA
ZAMIESZAŃ**

**WYTYPOWANIE POPULACJI
DO DALSZYCH BADAŃ BEZ
ZAMIESZAŃ I SEGREGUJĄCEJ
WZGLĘDEM KOLCOWOŚCI
PĘDÓW MALINY**

MATERIAŁY I METODY

Genotypowanie metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania (NGS)

Materiał do badań stanowiły: próbki liści, łodygi (kolcowa, bezkolcowa) oraz owoców (niedojrzały, dojrzały)

odmian 'Sokolica' i 'Glen Ample'

klony IO-PIB: M-164 i M-258



Izolacja RNA

Bioinformatyczna analiza porównawcza bibliotek, odczytów sekwencji FASTQ.

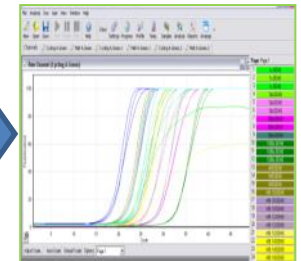
- usunięcie adapterów Cutadapt.
- mapowanie uzyskanych odczytów Hisat2.
- Mapowanie do genomu referencyjnego *Rubus occidentalis* v3.0. pliku gff3.
- wyszukanie sekwencji w bazie białkowej Uniprot, BLASTX i BLASTP.

Końcowe opracowanie wyników – pakiet edgeR.

NAZWA GENU	SEKWENCJA ZIDENTYFIKOWANEGO GENU	WIELKOŚĆ GENU (pz)
	Geny regulujące cechę kolcowości pędów maliny	
Ro01_G30313	ATGGGGGGATCTTCGAGATATAGGGCGAGGGTGAAGGCGAG GGCGGCAAAGATGGAGGCCGATCGTCAGCATAGGGAAGCCC TGGAGGCTGAGCGTCGCAATAGGGAAGCCATGGAGGCGGAT TGGGTCCGGAATAAGTCACTGTATATGTACCCACGAGAAC CATGGCCTTGGCAGAGTTGACCCTAGATACTGTTACGTTGTC CAGGCCATCAAATTGAGCGATTTGTTCTCCTTCTCCGAGACCC TGATTACCATGTCCTATTCCAGATCTCTTCAAAGTAGAGCTAC ATCTATTAGCGAAGACAAGTTACTACGAGAAGTTGATTATATA TATGGCAGGCGCGTCCCGCAAATGGGTTTGGTCTTTCG GATCTCAAATTTGTTGGCGGGCGGGGCGGCAAGGAC GATGGATGCTTCAGAGCCACTACAAGAGTCTACGTGCTGGAA ACTGATTCAAAGTGTGGGAGATGGTACGCCAAGTTATCAAAG GATCCAACGCAAGTGCGGGGAGGAAATGTGAGCCCTTGCTT GTGGGGATCAAAGGTAACCTGTATGCTCTAAACACATTACCCA CAAATCCCTCTGATTTTCCCATCTTTGAGGTATACGACCCGGA AACCAAGTTATGGACCGCTCTCCGGATCCTCCATTTGATCCC TTGAGCATGGAGTGTTCTGGTT	1380

Weryfikacja typu regulacji genów metodą RT-qPCR dla genotypów: 'Sokolica', 'Glen Ample', 'Laszka', 'Radziejowa', 'Autum Treasure', M-258 i M-164

NAZWA	SEKWENCJA 5'	SEKWENCJA 3'	WIELKOŚĆ PRODUKTU (pz)
Ro01_G30313	aagtgtgggagatggtacgc	ggtttccgggtcgtatacct	159
Ro04_G15926	ggggcaattatgctcttgaa	gcggtgtgtcagtatttga	282
Ro06_G18552	tgatggctgcccttaaaatc	agaggagaccgaaggtagc	125
Ro02_G15471	gattcgaagagatgcaagg	cagaagccaaagccaaagag	109
Ro04_G27733	gtgtgagcagagctgcagag	gcagagtctggcatgctgta	112
Ro01_G18506	gtgaacctgataccggcact	ttaactcccgcacactgttg	208
Ro05_G30569	aggttctggaattggcacac	acctcaaggaggcctatggt	295
Ro06_G24318	tgacgaaatgggtgatgcta	ttcaagaaaccggaacgaat	180
Ro02_G35794	agaagcaaatggaggtgagc	ccgtgttgaatcgtttctg	350
Ro01_G12210	ctcgagacagttgtgccatc	ggcaggctgttttgatttg	167



Optymalizacja RT-qPCR, gen ref. Ru18

F: ACGTCATCCTCCGGCAAAGC

R: ACGACGAAGCTCGCAAGTACAC

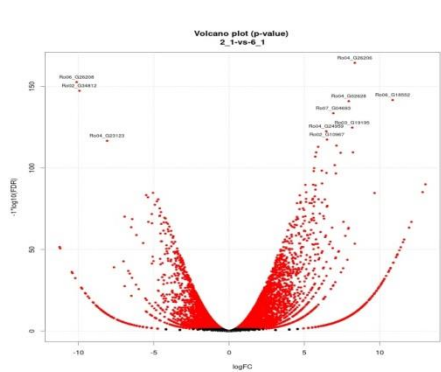
Temat badawczy 1: Indywidualna ocena mieszańców obu populacji segregujących pod względem bezkolcowości

- Wykazano duże zróżnicowanie badanych siewek w obrębie każdej rodziny mieszańców pod względem obecności i „agresywności” kolców na pędach.
- W rodzinie mieszańców uzyskanej z krzyżowania ‘Autumn Treasure’ × M-164:
 - na 67 uzyskanych siewek tylko 5 siewek (7,5% populacji mieszańców tej rodziny) odznaczało się całkowicie bezkolcowymi pędami;
 - blisko 30% siewek (22 rośliny) posiadało nieliczne i dość delikatne kolce;
 - 10 siewek (14,9% populacji) charakteryzowało się licznymi i dość „agresywnymi” kolcami (3 klasa kolcowości).
- W rodzinie mieszańców uzyskanej z krzyżowania ‘Heritage’ × M-258:
 - spośród 102 siewek, bezkolcowe pędy tworzyło 38 roślin (37,2% populacji mieszańców tej rodziny);
 - 15 roślin (14,7% populacji) posiadało małe i delikatne kolce na pędach;
 - jedynie 6 siewek (5,9% populacji) charakteryzowało się ostrymi, „agresywnymi” kolcami.
- W żadnej z badanych populacji siewek nie stwierdzono roślin o bardzo silnych i agresywnych kolcach, które należałoby zaliczyć do 4 klasy kolcowości.

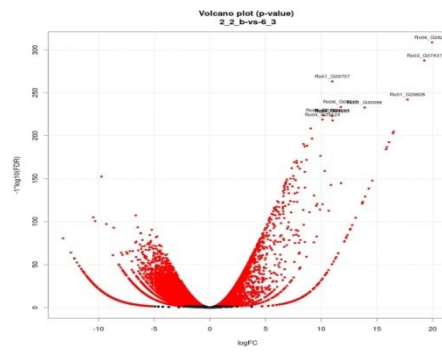
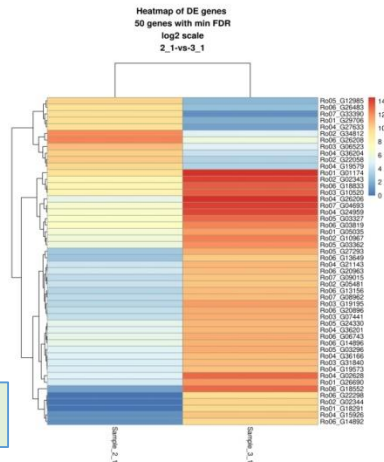
Temat badawczy 2: Ocena 10 genotypów maliny w oparciu o grupy genów warunkujących jakość i wielkość owoców z użyciem technik analizy DNA

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

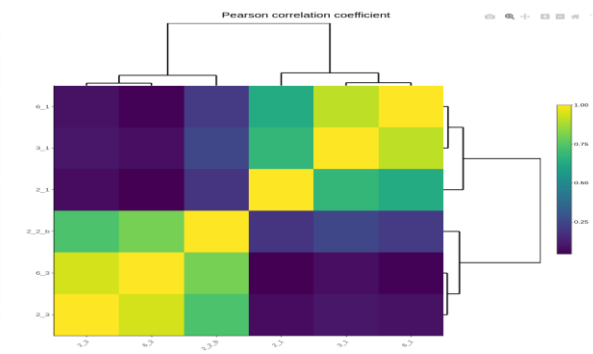
Porównania plików wynikowych	Cecha dla której podjęto identyfikację sekwencji deEST
Pokrycie genomu <i>R. occidentalis</i> <35,43 % – 90,14 %>	
Sokolica (łodyga kolcowa) vs. M-258 (łodyga bezkolcowa)	Cecha kolcowości pędów maliny
Sokolica (łodyga kolcowa) vs. Autumn Treasure (łodyga bezkolcowa)	
Sokolica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

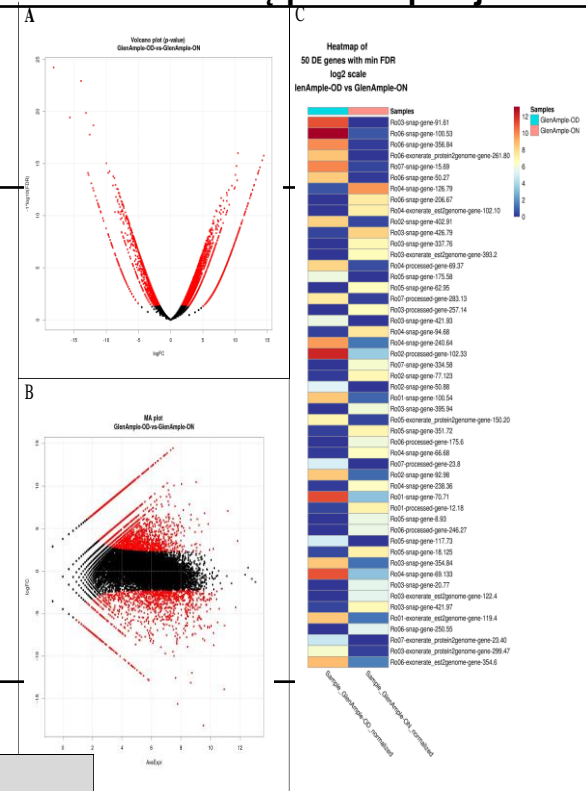
Porównania wyników uzyskanych dla badanych próbek

- M-258 (łodyga bezkolcowa) vs. M-164 (łodyga z małymi kolcami)
- GlenAmple (łodyga bezkolcowa) vs. Sokolica (łodyga z kolcami)
- Sokolica (łodyga kolcowa) vs. M-164 (łodyga z małymi kolcami)
- Sokolica (łodyga z kolcami) vs. M-258 (łodyga bezkolcowa)
- Sokolica-ON (owoc niedojrzały) vs. M-164-ON (owoc niedojrzały)
- Sokolica-ON (owoc niedojrzały) vs. M-258-ON (owoc niedojrzały)
- Sokolica-ON (owoc niedojrzały) vs. GlenAmple-ON (owoc niedojrzały)
- M-258-OD (owoc dojrzały) vs. M-164-OD (owoc dojrzały)
- Sokolica-OD (owoc dojrzały) vs. M-164-OD (owoc dojrzały)
- Sokolica-OD (owoc dojrzały) vs. GlenAmple-OD (owoc dojrzały)
- Sokolica-OD (owoc dojrzały) vs. M-258-OD (owoc dojrzały)
- M-164-OD (owoc dojrzały) vs. M-164-ON (owoc niedojrzały)
- M-258-OD (owoc dojrzały) vs. M-258-ON (owoc niedojrzały)
- Sokolica-OD (owoc dojrzały) vs. Sokolica-ON (owoc niedojrzały)
- GlenAmple-OD (owoc dojrzały) vs. GlenAmple-ON (owoc niedojrzały)

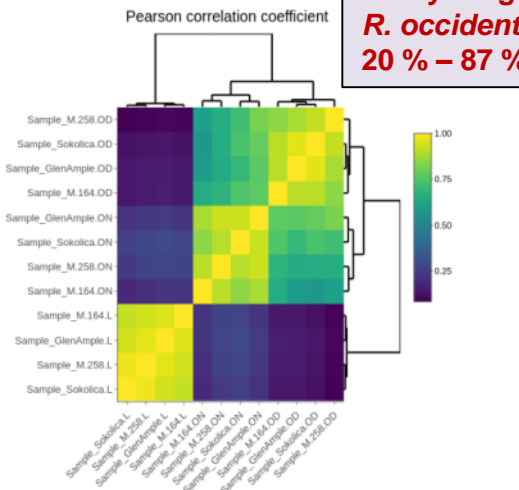
Cecha, dla której przeprowadzono analizę por. ekspresji DEG

Cecha kolcowości pędów

Jakość owoców



Pokrycie genomu *R. occidentalis* 20% – 87%

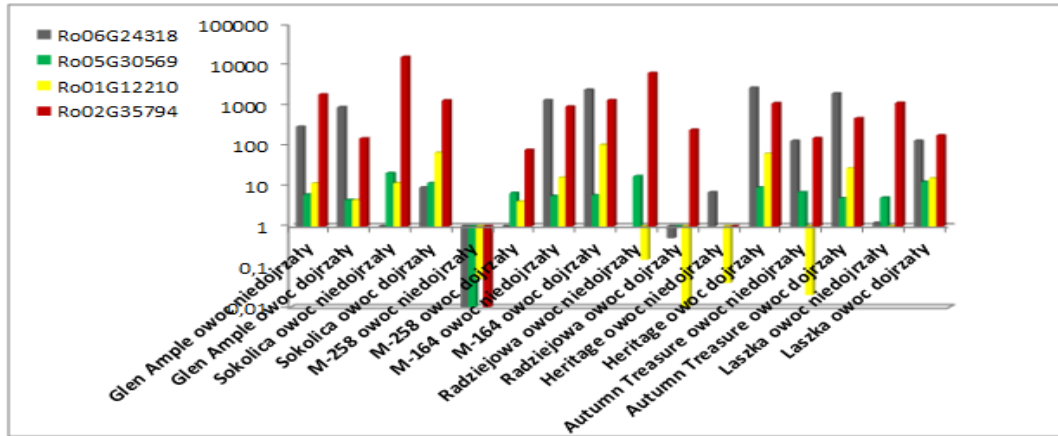


	CHROMOSOM	FUNKCJA GENU
Cecha kolcowości / bezkolcowości malin	Ro01_G30313	nieznana
	Ro04_G15926	Białko zawierające domenę KH wiążącą RNA
	Ro06_G18552	Izofорма 1 białka podobnego do Drm3, białko związane ze stanem uśpienia/auksyna
	Ro02_G15471	nieznana
Cechy jakości wewnętrznej owoców maliny	Ro04_G27733	hipotetyczne białko PRUPE_1G479900, białko rodziny helikazy RNA: DEAD/DEAH box
	Ro01_G18506	Aktywność syntazy CTP, regulującej proces biosyntezy nukleotydów pirymidynowych
	Ro05_G30569	białko podobne do syntazy celulozy G3
	Ro06_G24318	białko 70 kDa replikacji podjednostki A wiążącej DNA, centralny czynnik elongacji translacji P/YeiP
	Ro02_G35794	syntaza kofeiny 3, duża podjednostka rybosomalna RNA podobna do metylotransferazy K/L, domena FLD
	Ro01_G12210	prawdopodobne białko odporności na choroby izofорма X1 (At4g27220) bogata w powtórzenia bogate w leucynę

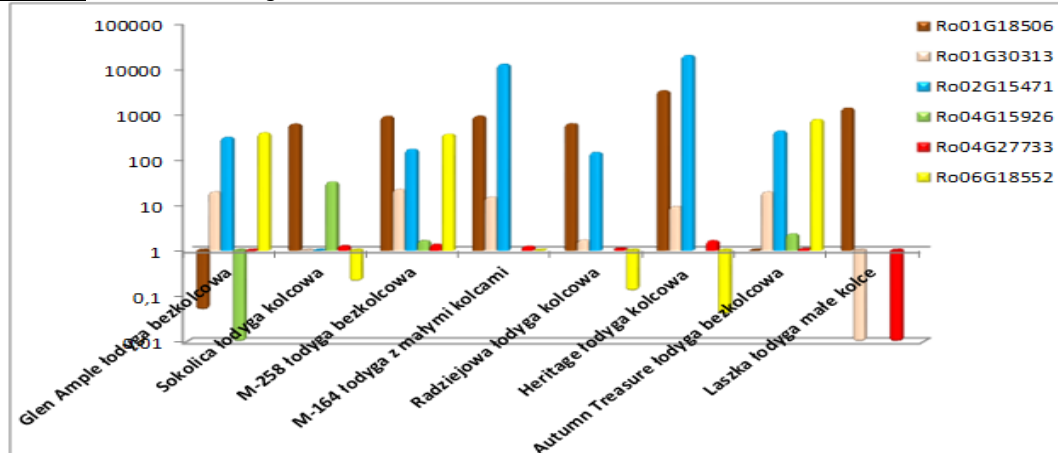
Dla odmian: 'Autum Treasure', 'Sokolica', 'Glen Ample', M-164, 'Heritage', M-258, 'Radziejowa', 'Laszka'-zbadano;

- 6 genów dla cechy kolcowości
- 4 genów dla cechy jakości wewnętrznej owoców roślin:

Profil ekspresji genów regulujących jakość wewnętrzną owoców maliny czerwonej



Profil ekspresji genów regulujących cechę kolcowości pędów maliny czerwonej



Ten sam typ regulacji w NGS i qPCR.

Ro02G35794, Ro036G24318 - regulacja cechy jakości owoców

Ro01G18506, Ro02G15471, Ro06G18552 - regulacja cechy

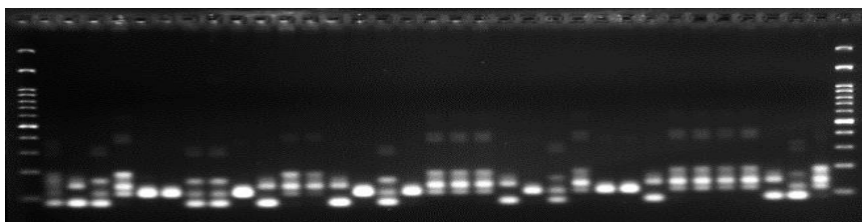
kolcowości pędów

- Wysoka aktywność Ro06G24318 i Ro02G35794 w owocach dojrzałych i niedojrzałych odmian: ‘Glen Ample’, ‘Autumn Treasure’ i klonu M-164.
- Niski poziom ekspresji genów Ro05G30569 i Ro01G12210.
- Najwyższą ekspresję w owocach dojrzałych odmian ‘Sokolica’ i ‘Radziejowa’, oszacowano dla genu Ro02G35794.
- Wszystkie wytypowane geny z grupy regulujących jakość owoców maliny wykazały silną inhibicję w owocach klonu M-258.
- Wysoka liczba transkryptów Ro02G15471 i Ro01G30313 w próbach z łodyg bezkolcowych: ‘Glen Ample’, ‘Autumn Treasure’, ‘Heritage’ i klonu M-258.
- Spadek ekspresji Ro06G18552 u odmian kolcowych i wysoka aktywność w próbach bezkolcowych
- Niska liczba transkryptów we wszystkich badanych próbach Ro04G15926 i Ro04G27733 odnotowano.

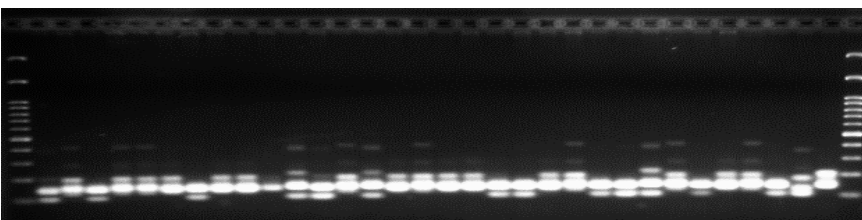
Temat badawczy 3: Ocena polimorfizmu DNA roślin mieszańcowych pokolenia F₁, należących do populacji segregującej wytypowanej do badań

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.

a)

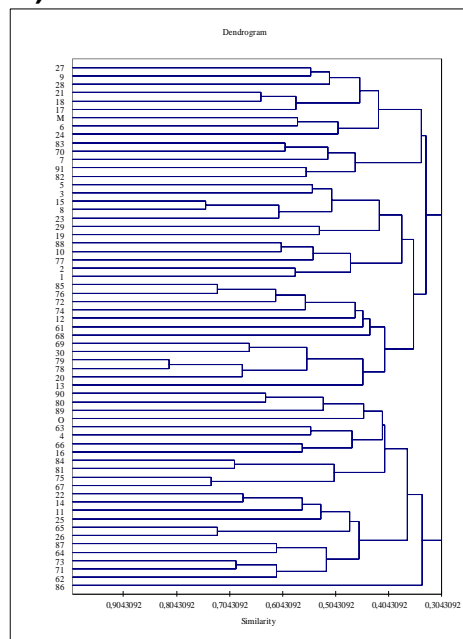


b)

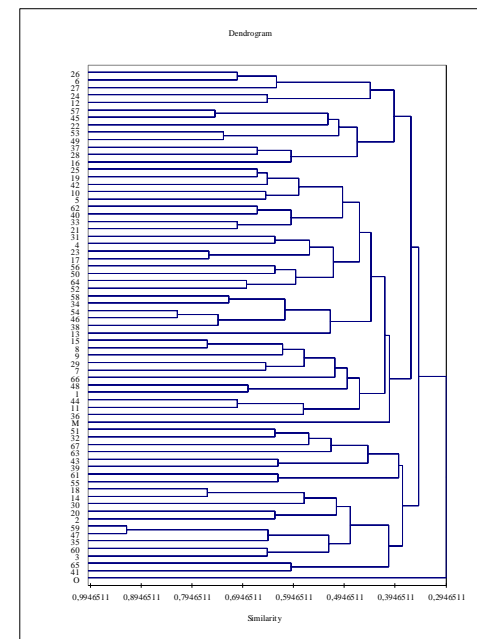


Przykładowe elektroforegramy produktów amplifikacji metodą SSR na matrycach DNA z roślin maliny z testowanymi oligonukleotydami: a) ru26a b) ru12a

a)



b)



Dendrogram obrazujący pokrewieństwo roślin należących do dwóch populacji: (a) 'Heritage' × M-258 oraz (b) 'Autumn Treasure' × M-164,

Podsumowanie

1. W badanej puli roślin, nie obserwowano genotypów o nieplanowanym rodowodzie
2. Do dalszych badań wytypowano populację 'Heritage' × M-258 segregującą pod względem kolcowości pędów maliny

WNIOSKI

- ✓ Uzyskanie genotypów o 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.
- ✓ Poszerzono o 6 000 adnotowanych genów bazę sekwencyjną *Rubus idaeus* L., przydatną do monitoringu cech: kolcowość/bezkolcowość, jakość owoców maliny.
- ✓ Pięć wyłonionych genów: Ro02G35794, Ro036G24318, Ro01G18506, Ro02G15471, Ro06G18552, można uznać za potencjalnie markery do wczesnej selekcji roślin kolcowych/bezkolcowych o wysokiej jakości owoców.
- ✓ W wyniku przeprowadzonej oceny polimorfizmu DNA roślin mieszańcowych pokolenia populacji F₁ 'Heritage' × M-258 oraz 'Autumn Treasure' × M-164 stwierdzono obecność tylko genotypów o ustalonym rodowodzie.
- ✓ Do dalszych badań molekularnych wytypowano populację pozbawioną zamieszania i segregującą pod względem kolcowości pędów: 'Heritage' × M-258.