

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: 2025

KIEROWNIK ZADANIA:

dr Anita Kuras

e-mail: anita.kuras@inhort.pl

ZESPÓŁ WYKONAWCÓW:

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

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



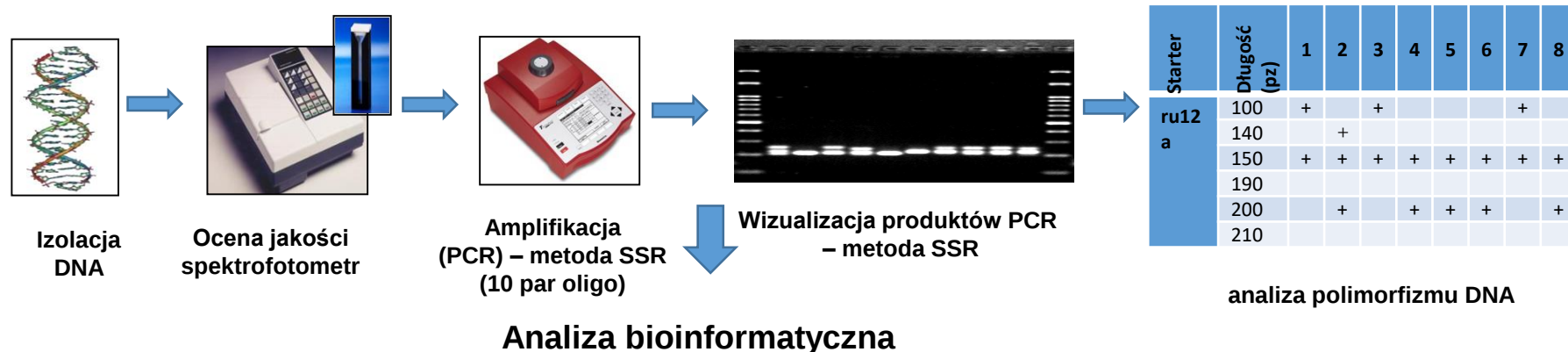
CELE PROJEKTU

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 genów o zróżnicowanej ekspresji, zgromadzonych w bazie sekwencyjnej uzyskanej w wyniku sekwencjonowania transkryptomu *Rubus idaeus* (sezony 2021 i 2022), sprzężonych z cechami bezkolcowości/kolcowości pędów i jakości owoców oraz weryfikacja poziomu ich aktywności metodą RT-qPCR na roślinach mieszańcowych maliny.
(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)

Tematy zostały w pełni zrealizowane, a cele osiągnięte.

MATERIAŁY I METODY

- Badaniom poddane zostały rosnące w doświadczeniu polowym 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.
- Oceniono sposób owocowania siewek i wielkość owoców, kolcowość pędów oraz zawartość ekstraktu i kwasu askorbinowego w owocach po ich ok. 3 miesięcznym przechowywaniu w stanie zamrożonym.
- Analiza polimorfizmu DNA.



- Wygenerowane amplikony poddano analizie bioinformatycznej pod kątem oceny stopnia ich powinowactwa genetycznego. Obecność lub brak polimorficznych fragmentów DNA była podstawą do określenia pokrewieństwa genetycznego badanych genotypów maliny.
- Dystans genetyczny określono na podstawie analizy kodów binarnych 0/1, gdzie „0” oznaczał brak fragmentu DNA o określonej długości, a „1” - jego obecność (metoda Jaccarda). Dendrogram obrazujący pokrewieństwo badanych genotypów skonstruowano stosując metodę UPGMA.
- Przeprowadzono analizę głównych składowych PCA (metoda Pirsona).

MATERIAŁY I METODY

MATERIAŁ DO BADAŃ WALIDACYJNYCH (NGS vs. RT-QPCR) - odmiany wzorcowe **‘Sokolica’** i **M-258**, **‘Glen Ample’** (łodygi kocowe i bez kolców, owoce niedojrzałe i dojrzałe).

MATERIAŁ DO WERYFIKACJI PRZYDATNOŚCI GENÓW: próbki łodyg z kolcami i bez oraz owoce niedojrzałe i dojrzałe 10 siewek (różne pod względem badanych cech) z populacji, **‘Heritage’ x M-258**



Izolacja RNA

**Zestaw Qiagen
/lub metoda
Zeng&Yang
2000**

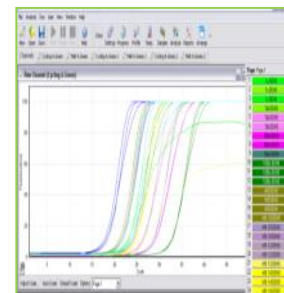


Optymalizacja RT-qPCR,
gen ref. Ru18

F: ACGTCATCCTCCGGCAAAGC

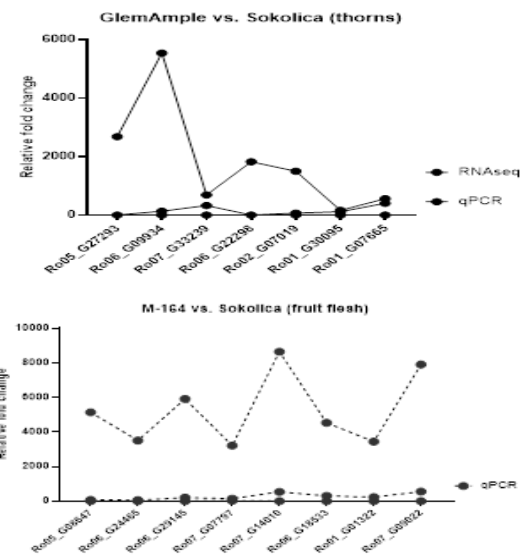
R: ACGACGAAGCTCGCAAGTACAC

Profil termiczny: 95°C/30s;
60°C/20s;
72°C/20s (40x)



Wytypowano 15 genów o rozpoznanej funkcji (A) i o zróżnicowanej ekspresji w porównywanych próbach roślinnych (NGS – 2021-2022) (do testów RT-qPCR zaprojektowano oligonukleotydy (B) (Primer3PRO))

CECHA	IDENTYFIKATOR GENU	SEKWENCJA 5'	SEKWENCJA 3'
JAKOŚĆ OWOCÓW	Ro05_G08647	tgagtctcgaagtctgtcaagg	cctcctctttcaccttaggca
	Ro06_G24465	cgagagagaagtaccaccgc	tcttgggcttgaactttccg
	Ro06_G29145	tgtctgagaaacaagcccact	tctcgtaaaccacagcactc
	Ro07_G14010	ctctgaaacaagaaagcaggctca	ttctgctgagacttagacaaaaca
	Ro06_G18533	tcgaaggcaattctaacgaatcg	tgcgctgcttaaatcctgttcg
	Ro07_G07797	ttcgaccattctcgctcga	tcttgacctcctgttttggc
	Ro01_G01322	tggaagcagaacattacttgca	agcggatctataaggttcagatga
	Ro07_G09022	agctgtatcctcccctagtgtt	gggtaacaatgctccacttcc
KOLCOWOŚĆ	Ro05_G27293	gagagattccgttgagtgcg	ataccaccatcgctgccttc
	Ro06_G09934	ccaacagtgatatgggtctgg	acaccaagaacacaaattctagga
	Ro07_G33293	tcatacataccatcagagacacca	cgctaattgccttgactagcc
	Ro06_G22298	ccccgcgagttcataac	actggctacttcttcaaaca
	Ro02_G07019	cggtggcttctctggaatagg	atatgccgctaccaagtccc
	Ro07_G36746	gagagattccgttgagtgcg	ataccaccatcgctgccttc
	Ro07_G07665	gcttggctcgggaagctcaa	cacttcacctctccaccac



**Zweryfikowane geny użyte
w testach qPCR**

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

- Wykazano duże zróżnicowanie badanych 102 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, 19 genotypów odznaczało się owocowaniem na wierzchołkach bardzo wysokich, jednorocznych pędów, co pozwoliło zakwalifikować je do tzw. „dwupiętrowych” i 37 genotypów włączono do grupy „letnich”, owocujących na dwuletnich pędach.
- Badane genotypy były silnie zróżnicowane pod względem wielkości owoców. Średnia masa 1 owocu w populacji segregującej 'Heritage' x M-258 wynosiła od 1,79 g do 4,08 g. Stwierdzono, że łącznie 21 siewek wytworzyło owoce o wyższej masie jednostkowej od owoców obu form rodzicielskich występujących w ich rodowodzie. Owoce o największej masie (powyżej 4,0 g) posiadały 3 siewki.
- W rodzinie mieszańców uzyskanej z krzyżowania 'Heritage' x M-258:
 - spośród 102 siewek, bezkolcowe pędy w części środkowej i górnej tworzyło 42 roślin (41,2% badanej populacji segregującej) z czego 36 roślin wytwarzało pędy całkowicie bezkolcowe;
 - 6 roślin (5,9% populacji) posiadało małe i delikatne kolce na pędach;
 - jedynie 13 siewek (12,7% populacji) charakteryzowało się ostrymi, „agresywnymi” kolcami.
- Zawartość kwasu askorbinowego w owocach siewek populacji 'Heritage' x M-258, wynosiła od 32 mg/100 g do 60 mg/100 g świeżej masy owocu. Większą zawartością kwasu askorbinowego, w porównaniu do obu odmian rodzicielskich, odznaczały się owoce 66 siewek.

Temat badawczy 2: Wytypowanie i weryfikacja metodą RT-qPCR, genów cechy bezkolcowości o zróżnicowanej ekspresji, zgromadzonych w bazie sekwencyjnej *Rubus idaeus*

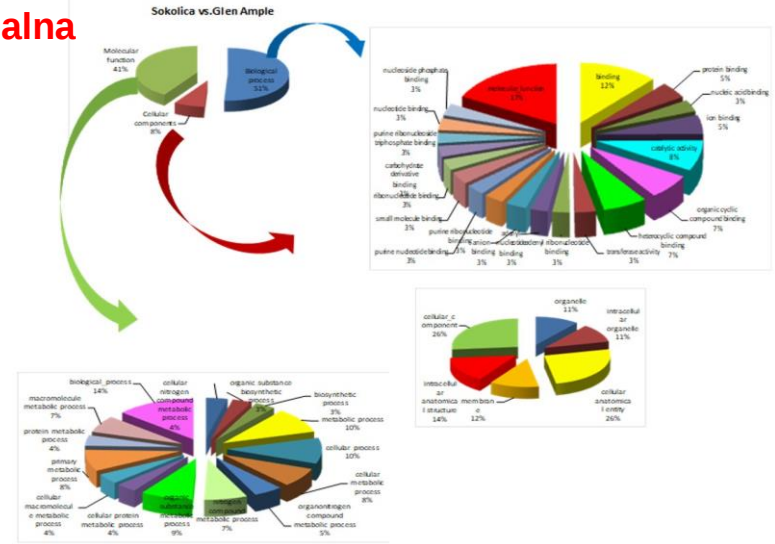
Analiza NGS ('Sokolica' vs. 'Glen Ample'), analiza funkcjonalna

bezkolcowość pędów maliny, 1255 775 DEG's

Adnotacja funkcjonalna genów: GO enrichment

procesy biologiczne - 135 268 DEG's, czynniki molekularne - 109 143 DEG's, składniki komórkowe - 22 115 DEG's.

ID GENU	FUNKCJA
Ro05_G27293	Medium-chain fatty-acid--CoA ligase
Ro06_G09934	Protodermal factor 1
Ro07_G33293	Linoleate 13S-lipoxygenase 2-1, chloroplastic
Ro06_G22298	Jacalin-related lectin 19
Ro02_G07019	Acid-sensing ion channel 2
Ro07_G36746	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic
Ro07_G07665	Esterase OVCA2



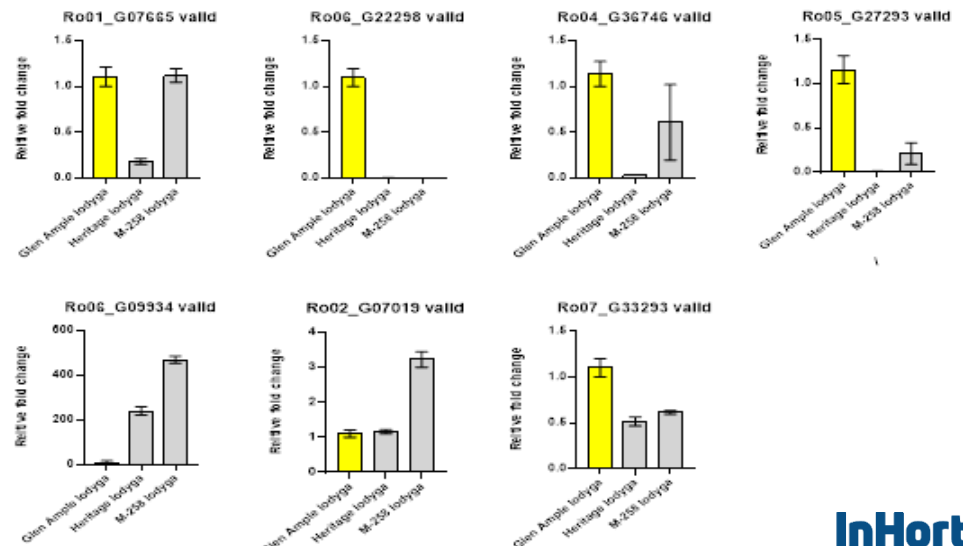
Profile ekspresji DEG's (QPCR) – rośliny wzorcowe

Walidacja typu regulacji7 DEG's

Sprzężenie z regulacją cechy bezkolcowości:

Nadekspresja:

- ✓ Ro02_G07019 (koduje Acid-sensing ion channel 2)
- ✓ Ro06_G09934 (koduje Protodermal factor 1) w próbach pędów bezkolcowego klonu M-258 oraz w genomie odmiany 'Heritage' (wytwarza pędy o niewielkich, miękkich i mało agresywnych kolcach).



Temat badawczy 2: Wytypowanie i weryfikacja metodą RT-qPCR, genów cechy jakości owoców o zróżnicowanej ekspresji, zgromadzonych w bazie sekwencyjnej *Rubus idaeus*

Analiza funkcjonalna ('Sokolica' vs. M-258)

Jakość owoców maliny: 292 261DEG's

Adnotacja funkcjonalna genów:

ID GENU	FUNKCJA
Ro05_G08647	Small heat shock protein, chloroplastic
Ro06_G24465	NDR1/HIN1-like protein 9
Ro06_G29145	NDR1/HIN1-like protein 10
Ro07_G14010	Heat shock protein 90-1
Ro06_G18533	Acetate kinase
Ro07_G07797	18.5 kDa class I heat shock protein
Ro01_G01322	Thioredoxin reductase 2
Ro07_G09022	NAC domain-containing protein 91

Walidacja typu regulacji 8 DEG's

A) w owocach niedojrzałych aktywność wszystkich badanych genów porównana do kontroli 'Sokolica', była istotnie niższa.

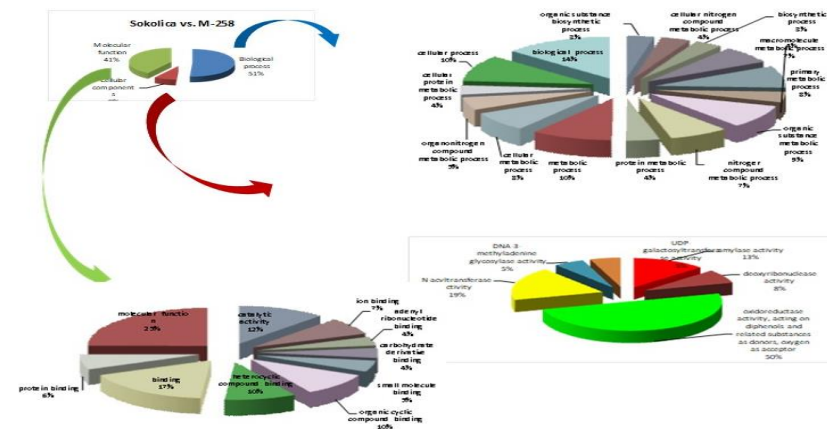
B) w owocach dojrzałych aktywność genów:

DOWN: Ro06_G18533 i Ro04_G14010, w odniesieniu do kontroli 'Sokolica',

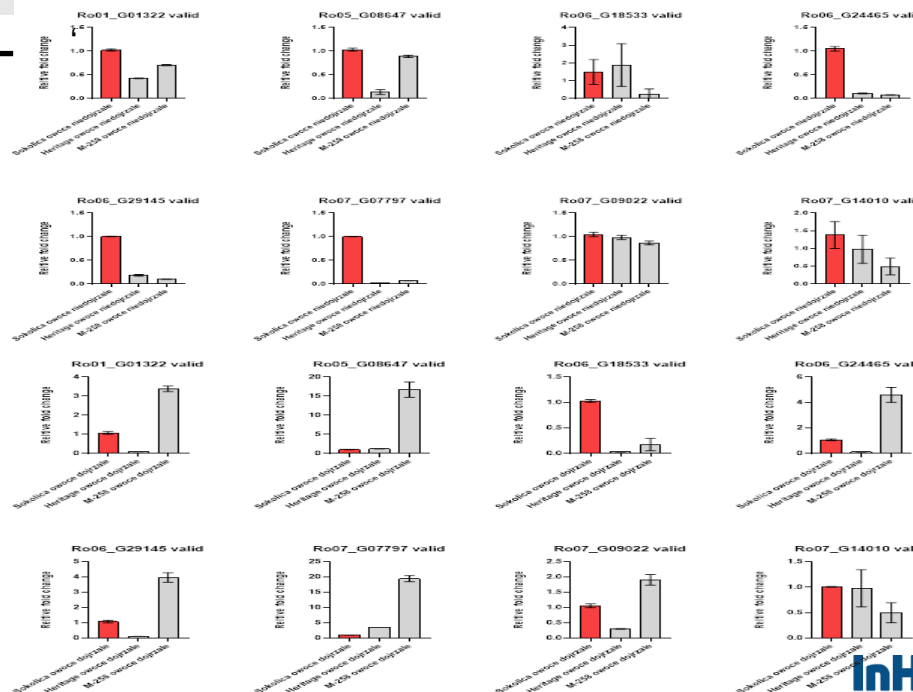
DOWN: wszystkich testowanych genów w próbach kontroli 'Heritage',

UP: Ro01_G01322, Ro06_G24465 (4x) oraz Ro05_G08647 i Ro07_G07797 (15x) w próbach kontroli 'Heritage',

DOWN: w próbach klonu M-258.



Przykładowe profile ekspresji DEG's (QPCR)



Temat badawczy 2 cd.: Ocena profili ekspresji wyłonionych genów w genomach roślin mieszańcowych populacji segregującej 'Heritage' x M-258

Testy walidacyjne dla prób cDNA pędów oraz owoców 10 roślin mieszańcowych 'Heritage' x M-258.

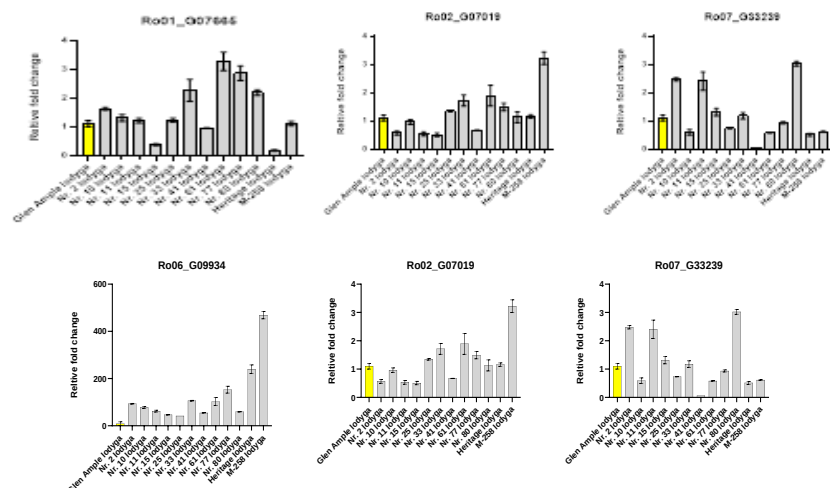
Ocena poziomu ekspresji wyłonionych genów, związanych z regulacją cechy kolcowości pędów.

Wyniki normalizowano względem próby kontrolnej odmiany 'Glen Ample' (wytwarza pędy bez kolców).

Ocena poziomu ekspresji wybranych genów, sprzężonych z cechami jakości owoców.

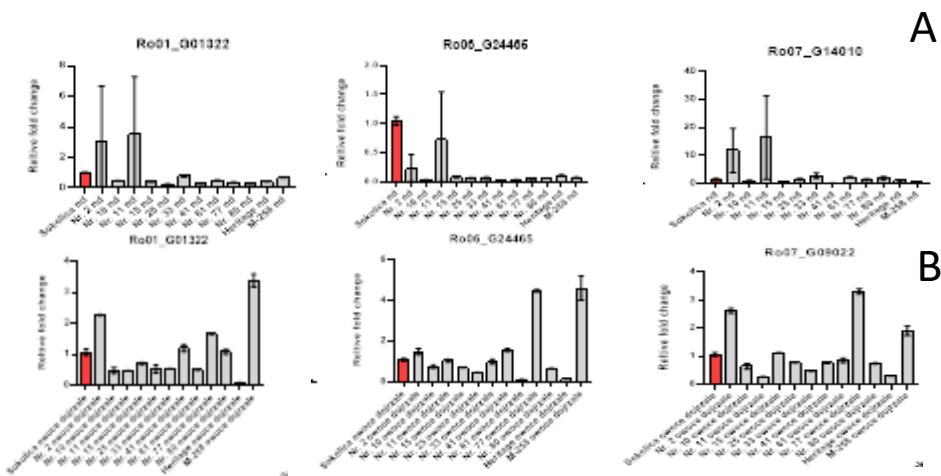
Wyniki normalizowano względem próby kontrolnej odmiany 'Sokolica' (wytwarza wysokiej jakości smaczne i duże owoce).

Przykładowe profile ekspresji wytypowanych genów



- **UP u bezkolcowych:** Ro07_G36746, Ro05_G27293, Ro06_G09934, Ro02_G07019, (genotypy: 25, 33, 61, 80, M-258 i 'Heritage'),
- **UP u kolcowych:** Ro07_G33293 (genotypy: 2, 11 i 15),
- **DOWN u kolcowych:** Ro07_G07665 (genotypy: 25 oraz 'Heritage').

Przykładowe profile ekspresji wytypowanych genów



A) UP w owocach niedojrzałych:

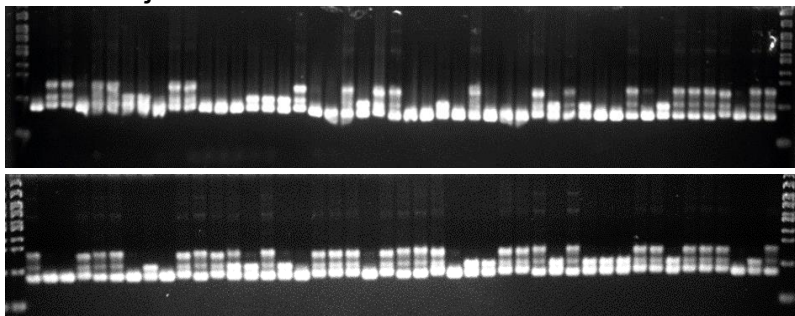
- Ro01_G01322, Ro05_G08647, Ro06_G18533, Ro07_G09022 (genotypy 11 i 77)
- Ro07_G14010 (genotyp 2 i 11),

B) UP w owocach dojrzałych:

- Ro05_G08647, Ro06_G24465, Ro06_G29145, Ro06_G18533, Ro07_G07797, Ro01_G01322, Ro07_G09022 (genotypy: 77 i M-258).

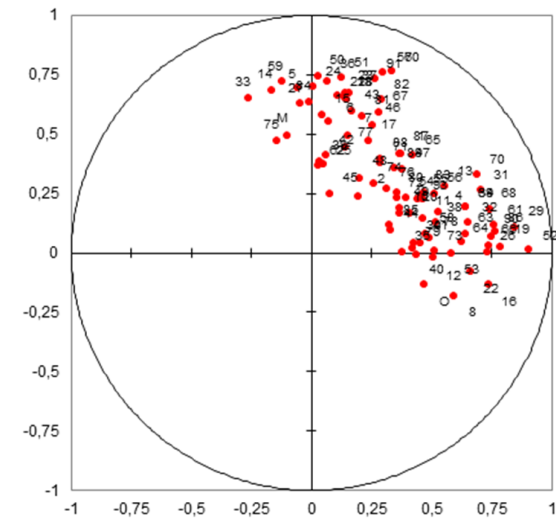
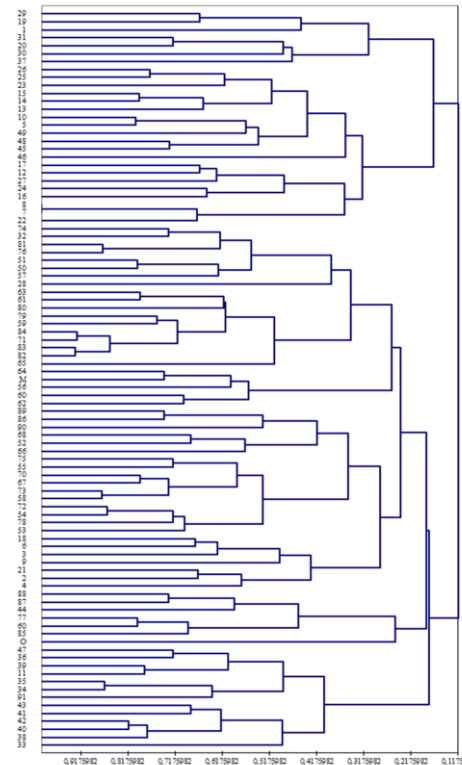
Temat badawczy 3: Ocena polimorfizmu DNA roślin mieszańcowych pokolenia F₁, należących do populacji segregującej wytypowanej do badań

Łącznie przeprowadzono 5 580 reakcji amplifikacji na matrycach DNA wydzielonych z 91 roślin maliny należących do populacji 'Heritage' × M-258. W reakcji amplifikacji z wytypowanymi parami starterów uzyskano 48 polimorficznych amplikonów, rozróżniających formy rodzicielskie. Długość polimorficznych fragmentów DNA charakteryzujących testowane genotypy maliny wahała się od 150 do 280 pz. Pokrewieństwo badanych genotypów maliny z populacji 'Heritage' × M-258, określone w oparciu o dane wygenerowane metodą SSR, kształtowało się na poziomie 11-89%. Na dendrogramie oraz po analizie głównych składowych (PCA) obserwowano zgrupowanie w większości genotypów o zbliżonej wielkości owoców.



Przykładowy elektroforegram produktów amplifikacji metodą SSR na matrycach DNA z roślin maliny z testowanymi oligonukleotydami: Rubus 167a

STARTER	DŁUGOŚĆ (p.z)	1	2	3	4	5	6	7	8
Rubus 2a	180	+	+	+	+	+	+	+	+
	190	+	+	+	+	+			
Rubus 16a	180	+				+			+
	190		+	+	+		+	+	
	200	+	+	+	+	+	+		
	210								+



(Analiza PCA obrazująca pokrewieństwo roślin należących do populacji: 'Heritage' × M-258, opracowany zgodnie z metodą Pirsona.

Fragment tabeli z polimorficznymi amplikonami (metoda SSR z 10 parami oligonukleotydów)

Dendrogram- pokrewieństwo roślin populacji segregującej

Temat badawczy 1

- ✓ Uzyskanie genotypów o dużych, bogatych w ekstrakt i kwas askorbinowy owocach oraz 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.

Temat badawczy 2

- ✓ Wyłonięte geny cechy kolcowości istotnie skorelowane są z fenotypem roślin, posiadających niewielkie delikatne kolce lub z ich brakiem.
- ✓ Aktywność genów: Ro06_G24465, Ro07_G14010, Ro01_G01322, Ro07_G09022 była skorelowana z wysokimi wartościami parametrów jakości dojrzałych owoców.

Temat badawczy 3

- ✓ W wyniku przeprowadzonej oceny polimorfizmu DNA roślin mieszańcowych populacji F1 'Heritage' × M-258 w regionie genomu warunkującego jakość owoców, nie potwierdzono skuteczności testowanych markerów do selekcji genotypów maliny pod względem badanej cechy, istnieje zatem konieczność kontynuacji badań.