

## Tematiskā pētījumu projekta zinātniskais pārskats par projekta īstenošanu

Projekta numurs: 284/2012	Zinātnes nozare, apakšnozare: Bioloģija, molekulārā ģenētika
Pārskatā iekļautais projekta īstenošanas laika posms	2013-2016
Projekta nosaukums: Parastās priedes ( <i>Pinus sylvestris</i> L.) molekulārās rezistences mehānismu izpēte	
Projekta vadītājs: Dainis Edgars Ruņģis	
Zinātniskā institūcija(s), kurā(s) projekts tiek īstenots: LVMI Silava	

### **1. Projekta izpildes kopsavilkums** (100 – 250 vārdi) (publiskojams)

Parastā priede ekoloģiski un ekonomiski ir viena no nozīmīgākām Latvijas meža koku sugām. Tās izplatības areāls ir ļoti plašs, kas liecina par augstām adaptācijas spējām un fenotipisko plasticitāti. Pēdējos gados ir uzsākti pētījumi par epigēnētisko efektu mehānismiem un to nozīmīgumu (t.sk. DNS metilācija, gēnu kopiju skaita izmaiņas, mikroRNS darbība un retrotranspozona funkcionālā loma). Aizsardzības un fizioloģiskās reakcijas uz dažādiem stresa apstākļiem ir ļoti būtiskas koku sugām, jo indivīdiem nav iespējas telpiski izvairīties no nelabvēlīgiem apstākļiem un tiem var būt ļoti garš mūžs. Pētījuma gaitā ir iegūti pirmie dati par parastās priedes mikroRNS ekspresiju, gēnu kopiju skaita variāciju, kā arī pētītas retrotranspozonu funkcijas un to ietekme uz genoma struktūru. Ir uzsākti arī pētījumi par inducēto rezistenci parastā priedē. Salīdzinot iegūtos rezultātus ar datubāzēm, tika identificēti konservatīvie priedes mikroRNS. Identificētas mikroRNS sekvences, kuras atrodas arī segsēkļu sugās, kā arī tādi, kuri ir atrasti tikai kailsēkļu sugās. Turpmākajos pētījumos un analīzēs, no iegūtajiem datiem tiks identificētas jaunas, neaprašītas mikroRNS sekvences. Identificētās retrotranspozona sekvences tika izmantotas kailsēkļu filoģenētiskiem pētījumiem, un arī noteica to kopiju skaitu 8 parastās priedes indivīdos un 17 papildus kailsēkļu sugās. Analīzes rezultāti apstiprināja kopiju skaitu variāciju starp dažādiem parastās priedes indivīdiem. Iegūtie dati tiks izmantoti tālākiem pētījumiem par retrotranspozonu aktivitāti un funkcionālo ietekmi.

### **2. Galvenie zinātniskie rezultāti** (1-2 lapas)

Projekta pirmā posma tikai uzsākti pētījumi par rezistences reakcijas inducēšanu jaunos priedes kokos (1-2 g.v.). No literatūras noteiktas metiljasmonāta koncentrācijas kādas ir iepriekš izmantotas priežu koku apstrādē. Priežu koki iegādāti no meža un arī no LVM Sēklas un Stādi, un apstrādāti ar dažādam MeJa koncentrācijām. Noteikts, ka augstākās izmantotās koncentrācijas ļoti negatīvi ietekmēja kokus, un daudz aizgāja bojā. Inducēšanas ekperimenti atkārtoti ar priežu rametiem, un zemākām MeJa koncentrācijām. Uzsākts arī UV apstarojuma ekperiments. Kandidātģēnu ekspresijas izmaiņas noteiktas pēc inducēšanas, kā arī kopējās fenola daudzuma izmaiņas. Veikts ekperiments par karstuma stresa izraisītām izmaiņām priežu klonos, un ievākts materiāls tālākai RNS izdalīšanai. Aprobētas dažādas mikroRNS (miRNA) izdalīšanas un klonēšanas metodes. Veikta bioinformatikas analīze izmantojot datubāzē esošas priežu mikroRNS sekvences, atlasot ‘precursor miRNA’ un iespējamo mērķu gēnu sekvences no NCBI datubāzes. Reālā-laika PCR praimeru konstruēti, un ekperimentāli aprobēti. Parastās priedes retrotranspozonu marķieri izstrādāti un aprobēti. Veikta laboratorijas vizīte Norvēģijas Meža un Ainavu institūtā, Ås, Norvēģijā.

Projekta otrā posmā tika turpināti pētījumi par rezistences reakcijas inducēšanu jaunos priedes kokos (1-2 g.v.). No ar metiljasmonātu apstrādātiem priežu stādiem izdalīts kopējais RNS, un konstruētas IonTorrent sekvenēšanas cDNS bibliotēkas no ar mikroRNS bagātinātas frakcijas. No mikroRNS bibliotēkām iegūtas no 444274 līdz 1146198 sekvences (vidēji

748076.5) ar vidējo 21 nukleotīdu garumu. Iegūto sekvenču analīze uzsākta, identificējot konservatīvās mikroRNS sekvences, kā arī iespējamās pre-mikroRNS („precursor microRNA”) sekvences. Veikti inokulēšanas eksperimenti ar skujbīres izraisītāju *Lophodermium* spp., un sakņu trapes izraisītāju *Heterobasidion annosum*, un ievākts materiāls RNS izdalīšanai un gēnu ekspresiju analīzēm. Parastās priedes retrotranspozonu marķieri izmantoti, lai noteiktu to aktivāciju pēc inokulācijas ar iepriekš minētiem sēņu patogēniem. strādāti un aprobēti. Veikta laboratorijas vizīte Norvēģijas Meža un Ainavu institūtā, Ås, Norvēģijā, kur tika veikti jaunās paaudzes sekvenēšanas eksperimenti ar IonTorrent PGM platformu. Publicēti divi raksti SCOPUS datubāzē iekļautos žurnālos, un rezultāti prezentēti starptautiskā konferencē.

Projekta 3. posmā veikta 1.g.v. priežu rametu inokulēšana ar *L.seditiosum* un *H.annosum*, un paraugi ievākti turpmākām analīzēm. Kandidātģēnu ekspresijas izmaiņas pēc inokulācijas ar *H. annosum* analizētas ar reālā laika PCR, un iegūtie dati salīdzināti ar rezultātiem, kuri iepriekš iegūti no pieaugušiem priedes kokiem. Tika izmantotas digitālā PCR metode, kā arī papildus kontrolģēni, lai analizēti gēnu kopija skaitu variāciju. Turpināta IonTorrent iegūto datu analīze. Salīdzinātas iegūtās mikroRNS sekvences ar datubāzē esošām mikroRNS sekvencēm no dažādām sugām, lai noskaidrotu parastās priedes mikroRNS sekvences līdzību un izplatību ar citu sugu mikroRNS. Anotētas un analizētas mikroRNS sekvences, kuras bija diferenciāli ekspresētās pēc MeJa apstrādi. Analizētas retrotranspozona sekvenču ekspresijas izmaiņas pēc inokulāciju ar *L. seditiosum*. Veikta filoģenētiskā DNS analīze ar 11 priežu retrotranspozona marķieriem, izmantojot 80 paraugus no dažādām kailsēkļu sugām un ģintīm.

Projekta 4. posmā veikta priežu sējeņu apstrāde ar metiljasmonātu un noteiktas izmaiņas hitināzes aktivitātē. Inokulēti vairāki priežu klona Ja2-III-4 rameti ar sakņu trapes izraisītāju, *Heterobasidion annosum*, un paraugi ievākti no inokulētiem un kontroles paraugiem RNS izdalīšanai. Konstruētas un sekvenētas astoņas IonTorrent sekvenēšanas bibliotēkas. Veikta gēnu kopiju skaitu analīzes rezultātu salīdzinošā analīze, izmantojot augstu izšķirtspējas kušanas līknes analīzi (comparative high resolution melting curve analysis - C-HRM). Ar reālā-laika PCR apstiprināta no IonTorrent datiem noteikto diferenciāli ekspresēto hitināzes gēna ekspresija. Veikta neanotēto mikroRNS datu analīze, un salīdzināta mikroRNS un retrotranspozona ekspresija. Noteikts 11 retrotranspozona kopiju skaits 18 dažādās kailsēkļu sugās, apstiprināti iepriekš iegūtie retrotranspozonu ģimenes ekspresijas pētījuma rezultāti, izmantojot alternatīvas qPCR analīžu metodes, un veiktas bioinformātiskas analīzes, analizējot IonTorrent sekvenēšanas datus. Sagatavoti četri zinātniskie manuskripti.

### **3. Projekta rezultātu sociāli – ekonomiskā ietekme**

*Raksturot jau sasniegto un/vai paredzamo projekta rezultātu (jauniegūto zināšanu) ietekmi uz visdažādākajām sabiedrības darbības jomām (t.sk. saimniecisko darbību), ieskaitot rezultātu izmantošanu citu (t.sk. praktiskas ievirzes pētījumu) veikšanā, jauniegūto zināšanu pienesums aktuālu jautājumu risināšanā; izmantošanu par argumentu bāzi dažāda veida diskusijām (diskursiem), zināšanu pieejamību plašākai sabiedrībai... Raksturot šo ietekmi ar konkrētiem pierādījumiem un/vai argumentiem (līdz 1 lapai).*

Šī projekta gaitā iegūtie rezultāti ir devuši ievērojamu ieguldījumu zināšanās par molekulārās rezistences mehānismiem parastajā priedē (*Pinus sylvestris* L.). Daudzos gadījumos tie ir pirmie iegūtie publicētie dati par šādiem pētījumiem parastajā priedē. Iespējams, ka iegūtos rezultātus varēs izmantot arī priežu selekcijas programmās, izstrādājot papildus rezistences kritērijus selekcijai, kā arī palielinot selekcijas materiāla fenotipisko plasticitāti.

Zinātniskā sadarbība ar NIBIO ir devusi iespēju projekta izpildītājiem iegūt jaunas zināšanas un konsultēties par dažādām pētnieciskām un analītiskām pieejām, kā arī izmantot jaunākās laboratorijas iekārtas. Tas palielina izpildītāju starptautisko zinātnisko konkurētspēju un rada iespējas tālākai sadarbībai.

Apgūtās metodikas un analītiskās metodes tiks izmantotas arī ar saimniecisko darbību saistītiem projektu pieteikumiem, piem.: augsnes mikrofloras bioloģiskās daudzveidības noteikšana izmantojot nākamās paaudzes sekvenēšanu, retrotranspozonu un gēnu kopiju skaita saistība ar saimnieciskām īpašībām parastās priedes selekcijas materiālā, kā arī inducētās rezistences loma priežu sējeņu saglabāšanas uzlabošanai meža atjaunošanas gaitā.

#### **4. Zinātniskā sadarbība**

*Īsi raksturot sadarbību projekta ietvaros vai izmantojot projekta rezultātus ar citiem tematiski saistītiem partneriem Latvijā un ārvalstīs (ja attiecināms) (līdz 1 lapai).*

<b>Partneris</b> (zinātniskā organizācija/ projekts/ programma/ sadarbības tīkls, tā pārstāvis)	<b>Sadarbības raksturojums</b>
Norvēģijas Meža un Ainavu institūts (tagad NIBIO)	Laboratorijas vīzītes, digitālās PCR iekārtas izmantošana, IonTorrent platformas izmantošana

#### **5. Sadarbība studiju programmu īstenošanā un maģistru/doktorantu sagatavošanā**

*Raksturot sadarbību projekta ietvaros vai izmantojot projekta rezultātus studiju programmu īstenošanā un pilnveidošanā (ieskaitot mācību materiālu sagatavošanu), projekta izpildē iesaistītie maģistri un doktoranti, iesniegtie un aizstāvētie maģistra/promocijas darbi (ja attiecināms) (līdz 1 lapai)*

<b>Augstskola, Studiju programma(s) / mācību kurss(i)</b>	<b>Sadarbības raksturojums</b>

<b>Nr.</b>	<b>Studenta Uzvārds, Vārds</b>	<b>Darba nosaukums*</b>	<b>Promocijas padome / Augstskola, fakultāte**</b>	<b>Dalības statuss, iesniegšanas/ aizstāvēšanās datums/laika periods***</b>
1	Angelika Voronova	Retrotranspozonu struktūra parastās priedes ( <i>Pinus sylvestris</i> L.) genomā un to ekspresija	Latvijas universitātes bioloģijas zinātnes nozares promocija padome	Aizstāvēts 04.02.2014
2	Baiba Krivmane	Parastās priedes ( <i>Pinus sylvestris</i> L.) mikroRNS loma stresa un slimību atbildes reakcijās.	Latvijas universitātes bioloģijas fakultāte	Plānots aizstāvēt 2017.g.

3	Ilze Šņepste	Inducētā rezistence parastā priedē ( <i>Pinus sylvestris</i> L.)	Latvijas universitātes bioloģijas fakultāte	Plānots aizstāvēt 2018.g.
---	--------------	--	---	---------------------------

- \* norāda iesniegtā vai aizstāvētā maģistra/promocijas darba nosaukumu; ja dalība projektā tā izpildes laikā nav noslēgusies ar iesniegtu vai aizstāvētu darbu, norāda iesaistītā studenta darba paredzamo nosaukumu vai izpildīto darbu raksturojošu nosaukumu;
- \*\* promocijas darbiem norāda promocijas padomi; maģistra darbiem un iesaistītiem maģistratūras un doktorantūras studentiem norāda augstskolu un fakultāti;
- \*\*\* norāda studenta dalības statusu iesaistīts/iesniegts/aizstāvēts; ja iesaistīts projekta izpildē norāda laika periodu (kuros gados), ja iesniegts/aizstāvēts norāda attiecīgo datumu.

## **6. Projekta rezultātu izplatīšana (līdz 1 lapai)**

### **6.1. Dalība nozīmīgākajos zinātniskajos pasākumos, kas nodrošināta projekta ietvaros; līdzdalība to organizēšanā**

<b>Nosaukums (Konference, simpozījs, seminārs, izstāde...)</b>	<b>Plenārziņojums (Jā/Nē)</b>	<b>Līdzdalība organizēšanā (Jā/Nē)</b>	<b>Apraksts</b>
European Cooperation In Science And Technology (COST) Action BM1006 seminārs „Bioinformatics for Non-Coding RNAs” 28.06.2014. - 04.07.2014	Nē	Nē	Baiba Krivmane, Ilze Šņepste, Vilnis Šķipars, Dainis Ruņģis „An initial survey of microRNA expression in Scots pine”
‘DNA habitats and its RNA inhabitants’ Zalcburgā, Austrijā, 03.07.2014 - 05.07.2014	Nē	Nē	Voronova A., Belevich V., Rungis D. „Expression of retrotransposon-like sequences in the complex Scots pine genome under stress conditions.” Book of abstracts p.62.
Eiropas Molekulārās Bioloģijas Laboratoriju EMBL konference ‘The Mobile Genome’ Heidelbergā, Vācija,	Nē	Nē	Voronova A., Belevich V., Korica A., Rungis D, “Retrotansposon families show differential expression changes in response to two fungal pathogens in complex conifer genome”
AdapCAR un EVOLTREE konferencē ‘Global change and the evolutionary potential of forest trees’ Islandē , 23.08.2015 - 27.08.2015,	Jā	Nē	Rungis D., Voronova A., Krivmane B, Skipars V., Rauda E., Snepste I., Veinberga I. “Stress-related transcriptional changes and regulation in the Scots pine ( <i>Pinus</i>

			<i>sylvestris</i> L.) genome”
6. Baltijas Ģenētikas kongresā Tartu, Igaunijā 01.10.2015	Jā	Nē	Ruņģis D, Voronova A., Krivmane B, Snepste I., Belevich V., Skipars V., Veinberga I “Genome architecture and stress responses in Scots pine ( <i>Pinus sylvestris</i> L.)”
IUFRO Tree Biotechnology 2015 konferencē „Forests: the importance to the planet and society” Itālija, Florence 08.06.2015 - 12.06.2015	Nē	Nē	„Conservative microRNA studies and analyses in Scots pine ( <i>Pinus sylvestris</i> L.)”(B. Krivmane, I. Šņepste, V. Šķipars, E. Rauda, D. Ruņģis); „Retrotransposon expression in response to in vitro inoculation with two fungal pathogens of Scots pine ( <i>Pinus sylvestris</i> L.)” (A. Voronova, V. Belevich, D. Rungis)

**6.2. Dalība zinātnes popularizēšanā, kas saistīta ar projekta izpildi vai projekta rezultātiem** (populārzinātniskās publikācijas, dalība plašākai sabiedrībai paredzētos pasākumos...)

Pasākums / Publikācija	Apraksts

### 6.3. Zinātniskās publikācijas un intelektuālais īpašums

**6.3.1. Publikācijas Web of Science / Scopus indeksētos izdevumos, kā arī izdevumos, kas ietverti ERIH sarakstā (European Reference Index of the Humanities)** (lūdzam norādīt visas šiem kritērijiem atbilstošās publikācijas)

**publicētas/pieņemtās publicēšanai**

1. Voronova A., Ruņģis D. (2013) Development and characterization of IRAP markers from expressed retrotransposon-like sequences in *Pinus sylvestris* L.. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact and Applied Sciences. 67: 485-492. DOI: 10.2478/prolas-2013-0082
2. Šķipars V, Šņepste I, Krivmane B, Veinberga I, Ruņģis D. (2014) A method for isolation of high-quality total RNA from small amounts of woody tissue of Scots pine. Baltic Forestry 20: 230-237.
3. Voronova A., Belevich V., Jansons A., Rungis D. (2014) Stress induced transcriptional activation of retrotransposon-like sequences in the Scots pine (*Pinus*

*sylvestris* L.) genome. Tree Genetics and Genomes 10: 937-951. doi:10.1007/s11295-014-0733-1

#### iesniegtās

1. Voronova A., Beļeviča V., Ruņģis D.. Analysis of retrotransposon distribution in gymnosperm genomes. Tree Genetics and Genomes.
2. Šņepste I., Šķipars V., Krivmane B., Kenigšvalde K., Ruņģis D. Characterization of a thaumatin – like protein gene from *Pinus sylvestris* and determination of antimicrobial activity of the in vitro expressed protein. European Journal of Plant Pathology

#### sagatavotas

1. Krivmane B., Rauda E., Šņepste I., Šķipars V., Ruņģis D. Identification and analysis of conservative microRNAs in Scots pine (*Pinus sylvestris* L).
2. Šķipars V., Ruņģis D.. Analysis of gene copy number variation of the Scots pine thaumatin – like protein gene.

**6.3.2. Citas nozīmīgākās publikācijas** (*lūdzam norādīt līdz 10 nozīmīgākās publikācijas izdevumos, kas neatbilst 6.3.1. punktā minētajiem, kā arī grāmatas, grāmatu nodaļas/raksti krājumos/pilna teksta konferenču tēzes...*)

#### publicētas/pieņemtās publicēšanai

1. Gaile I., Ruņģis D. (2014) The role of induced resistance and TLP protein in the development of defence mechanisms to *Lophodermium spp.* in *Pinus sylvestris* L. seedlings. Proceedings of the 55th International Scientific conference of Daugavpils University. 111-117.
2. Šķipars V., Beļeviča V., Krivmane B., Veinberga I., Ruņģis D. (2014) Determination of resistance-linked gene copy number variation polymorphism using different methods. Proceedings of the 55th International Scientific conference of Daugavpils University. 35-45.
3. Ruņģis, D. (2014) Molekulāro marķieru izmantošana meža koku selekcijā. Četri mežzinātņu motīvi (red. Jansons, J.) 79-106 lpp., DU akadēmiskais apgāds „Saule”, Daugavpils. ISBN 978-9984-14679-9 (Zinātnisko publikāciju klasifikācijas kods 2.2)

#### iesniegtās

nav

**6.3.3. Saņemti izgudrojumu patenti, izgudrojumu patentu pieteikumu publikācijas un izgudrojumu pieteikumi, reģistrētas šķirnes un cita veida reģistrēts intelektuālais īpašums** (*aprakstam jāietver patenta, tā pieteikuma vai intelektuālā īpašuma reģistrācijas numurs*)

nav

Projekta vadītājs:

---

(Dainis Edgars Ruņģis, 27.01.2017)