

Pētniecības pieteikuma vienošanās Nr. *1.1.1.2/VIAA/1/16/094*

**Pusgada populārzinātnisks pārskats (1.09.2019.-29.02.2020.) par projekta īstenošanas gaitu
“Transponējamo elementu variāciju izpēte parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) gēnu rajonos”**

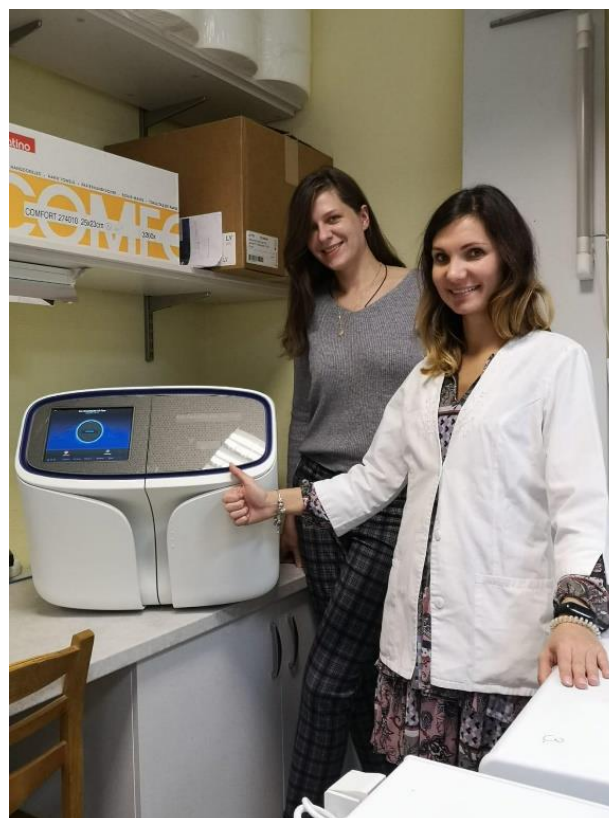
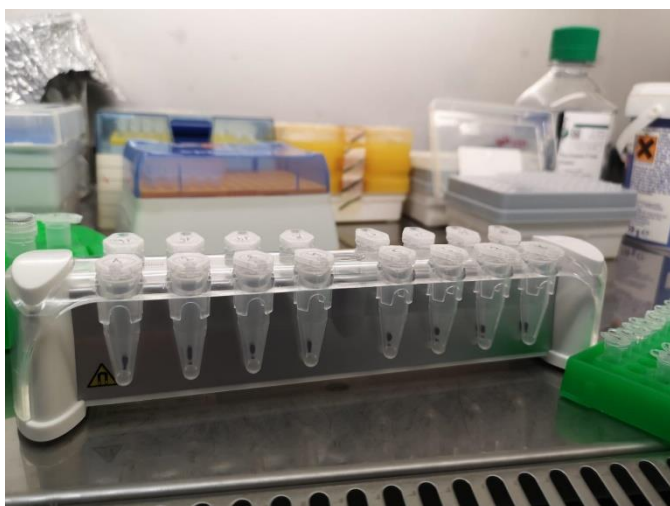
Piektā pusgada laikā tika sagatavotas un veiktas ekspresijas analīzes. Iepriekš mūsu pētījumos tika pierādīts, ka retrotranspozonu ekspresija būtiski palielinās pēc inokulēšanas ar skujbiri izraisošu patogēnu - *Lophodermium seditiosum*. Iepriekš tika noskaidrots, ka šīs slimības simptomi attīstās salīdzinoši lēni, bet patogēnu droši var detektēt skujās tikai 1-2 mēnešus pēc inokulēšanas un šis laiks ir atkarīgs no augšanas apstākļiem (mitruma, apgaismojuma, temperatūras). Retrotranspozonu ekspresija, kas ir proporcionāla ar stresu aktivēto gēnu ekspresijai, var tikt detektēta jau pēc pirmās inficēšanas nedēļas, bet pēc mēneša tā sasniedz maksimālus rādītājus, pakāpeniski krītot otrajā inficēšanas mēnesī, kad patogēns sāk aktīvi vairoties šūnās. Ņemot vērā šīs zināšanas, RNS tika izdalīts no priežu skujām pēc viena mēneša pēc inokulēšanas, lai iegūtu pēc iespējas maksimālu ar mobiliem elementiem saistīto molekulu daudzumu paraugos. Inokulēšanas eksperimenti tika veikti pēc iepriekš optimizētā protokola (Voronova *et al.* 2019). RNS un DNS paraugi tika izdalīti, attīrīti, noteikta to koncentrācija. PCR ar specifiskiem patogēna marķieriem veikts un patogēns tika apstiprināts.

Tika izstrādāts jauns protokols paraugu sagatavošanai ar turpmāku NGS sekvenēšanas tehnoloģiju. Tika pielietotas divas stratēģijas: 1. transkribēto RNS paraugu amplifikācija ar iepriekš izstrādātiem gēnos izplatīto mobilo elementu praimeriem; 2. transkribēto RNS molekulu atlase ar zondēm un turpmāka molekulu pavairošana ar specifisku enzīmu. Kontrolei izmantoja bibliotēku no 22 gēnu amplifikācijas produktiem. Tā ka visi marķieri tika veidoti balstoties uz *P.taeda* references genoma sekvencēm, amplifikācijas efektivitātes pārbaude mūs interesējošai *P.sylvestris* sugai ir svarīga. Amplifikācijas produkti katram paraugam tika apstiprināti ar gēlelektroforēzi, dažādu genotipu paraugi apvienoti un attīrīti. Attīrīto paraugu koncentrācijas noteiktas ar *Quibit* fluorimetru. Iegūti 19 paraugi ar kvalitāti atbilstošu turpmakai sekvenēšanas bibliotēku veidošanai. Tika izveidotas 19 sekvenču bibliotēkas pēc *Ion Xpress Plus gDNA Fragment Library Preparation (ThermoFisher)* protokola. Paraugu šķelšanai tika izmantots *Covaris* fokusēts ultrasonikātors. Bibliotēkas kvalitāti novērtēja ar *Ion Library TaqMan Quantitation kit (ThermoFisher)* protokola izmantojot reāla laika PQR. Katrā posmā bibliotēkas tika attīrītas ar *ProNex Size-Selective Purification System (Promega)*. Ion Chef aparatūra (*ThermoFisher*) tika izmantota čipa sagatavošanai. Ion GeneStudio S5 (*ThermoFisher*)

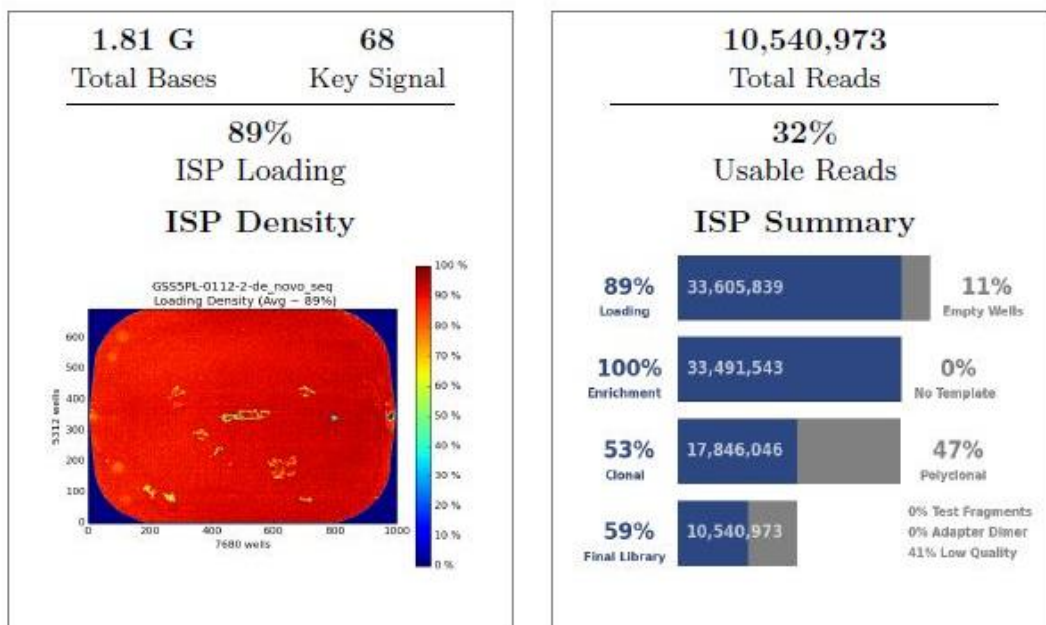
sistēma izmantota NGS vai multi-paralēlai sekvenēšanai. Tika izmantoti reaģenti un čips garāku nolasījumu iegūšanai, kas palīdzētu identificēt gēnu fragmentus izveidotajās bibliotēkās. Jaunās aparatūras pirmajai palaišanai sekoja līdzīgi produktu speciāliste inženiere no Lietuvas Rita Bandariavičiūtē (Att.1), kura veica apmācību visiem ieinteresētiem kolēģiem par praktisko aparatūras un reaģentu komplektu lietojumu un niansēm. Iegūts 100% daļiņu piesātinājums ar sekvencēm un 89% čipa pārklājums ar daļiņām, sekvenēšana rezultējās ar vairāk kā 10,5 miljonu nolasījumiem, katra no bibliotēkām tika reprezentēta rezultātos (Att.2). Iegūtie rezultāti palīdzēs noskaidrot regulatīvo mobilo elementu izplatību parastās priedes (*P.sylvestris*) gēnos un novērtēt izstrādāto protokolu rezultātus. Izgudrota jauna pieeja, kas iespējams palīdzēs identificēt ar transponējamiem elementiem (TE) saistītus gēnu tīklus nesekvencēto sugu genomiem. Pat ar NGS tehnoloģiju attīstību, atkārtojumu atrašanās vieta genomā paliek grūti verificējama, jo to identificēšanai ir nepieciešams vairākas reizes sekvenēt genomu ar pietiekamu pārklājumu, kas daudzām augu sugām ar lieliem genomiem ir izaicinājums. TE atkārtojamība un savstarpējā līdzība vienā genomā un to variācija starp genotipiem, tāpat arī NGS tehnoloģijas nolasījumu garuma ierobežojumi, neļauj noskaidrot precīzu TE atrašanas vietu. Pat jaunākās (un daudz dārgākas) NGS tehnoloģijas, kas rezultējās ar garākiem nolasījumiem (*PacBio*), ne vienmēr var atrisināt TE lokalizāciju un struktūru, jo daudzi TE ir garāki par 10 kbp, īpaši sarežģīti tas ir kailsēkļu genomiem.

Sagatavota un iesniegta recenzijai publikācija “*Comparative study of pine reference genomes reveals transposable element interconnected gene networks*”. Autoru kolektīvs: Angelika Voronova, Martha Rendón-Anaya, Pär Ingvarsson, Ruslan Kalendar, Dainis Ruņģis. Publikācijas uzlabošanai un rezultātu verificēšanai tika nodibināta sadarbība ar augu retrotranspozonu pētnieku Dr.Ruslanu Kalendaru, kurš pozitīvi novērtēja padarīto darbu un sniedza vērtīgus komentārus manuskripta uzlabošanai.

Saistībā ar nelabvēlīgiem apstākļiem ceļošanā un augstu iespējamību, ka visi publiskie pasākumi tiks atcelti bez līdzekļu atgūšanas iespējām, kā arī projekta budžeta pārplānojumu (NGS sekvenēšanas iekļaušanu, atvērtas pieejamības publikācijas plānošana), atteicos no plānotās dalības konferencē Francijā. Pieteicos dalībai 62. Daugavpils Universitātes starptautiskajā zinātniskajā konferencē, tika sagatavots un iesniegts kopsavilkums “*Variation of mobile genetic elements in pine genes and flanking regions*”.



Attēls 1. NGS bibliotēku un čipa sagatavošanas process.



Attēls 2. NGS rezultātu kopsavilkums, kur ir redzams čipa pārklājums, daļiņu piesātinājums, nolasījumu skaits.

Salaspilī, 2020.gada 12. martā

Pārskatu sagatavoja:



/Dr.Biol. Angelika Voronova/