

Parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) rezistences pret sakņu trupi ģenētiskie aspekti

Dr. silv. Vilnis Šķipars,

Darba vadītājs: Dr. biol. Dainis Ruņģis
LVMI “Silava” Ģenētisko Resursu Centrs

Salaspils, 2012. gada 9. marts

Tēmas aktualitāte



- ~36% no mežu kopējās platības aizņem priežu tīraudzes.
 - Latvijā sakņu trupe ir bieži sastopama. Sakņu trupe nodara materiālus zaudējumus mežsaimniecības nozarei.
 - Liels priedes tīraudžu īpatsvars veicina šīs slimības izplatību.
 - Sakņu trupi grūti detektēt, vadoties pēc koka ārējā izskata.
 - Pret sakņu trupi rezistentu priežu nav.
-

Mežaudžu atveseļošanas problēmas



Inficētu mežaudzi atveseļot ir praktiski neiespējami, lai to panāktu, no augsnes jāaizvāc inficētās saknes, pat tad sakņu fragmenti paliek augsnē.

Alternatīvu sugu izvēle ir ierobežota, jo *H. annosum* inficē arī bērzus, alkšņus, egles u.c. sugas.

Darba mērķis



Darba praktiskā nozīme - izstrādāt selekcijas materiāla molekulāri ģenētisku atlases metodi rezistentāko priedes klonu atlasei.

Darba zinātniskais mērķis ir izpētīt:

- rezistenci ietekmējošo gēnu kopiju skaita atšķirības
- gēnu darbības izmaiņas pēc inokulēšanas ar *H. annosum*
- gēnu kopiju skaita saistību ar gēnu ekspresiju.

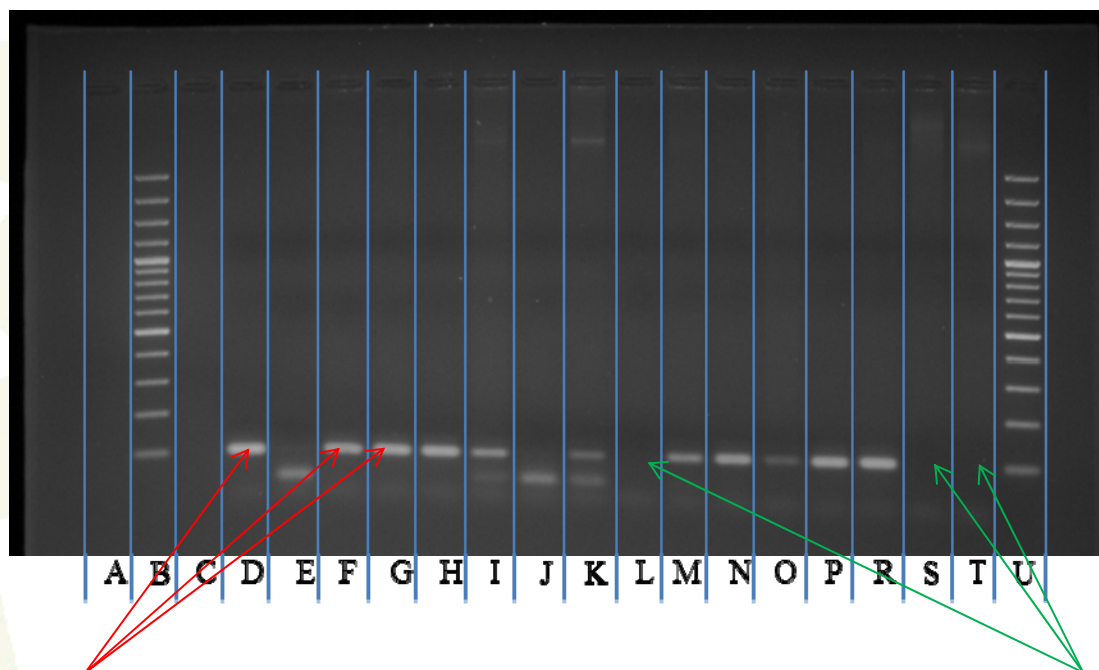
Darba uzdevumi



- Izveidot molekulārās ģenētikas metodi individuālu koku stāvokļa raksturošanai attiecībā uz to inficētību ar *H. annosum*, nenožāgējot koku.
- Veikt rezistences gēnu kopiju skaita analīzes.
- Veikt gēnu ekspresijas analīzes pirms un pēc koku inokulēšanas ar *H. annosum*. *gēnu ekspresija = gēnu darbības intensitāte
- Pārbaudīt vai ir sakarības starp gēnu darbības intensitāti un gēnu kopiju skaitu

Rezultāti

H. annosum DNS detektēšana



Analīzei
viens
paraugs
no koka

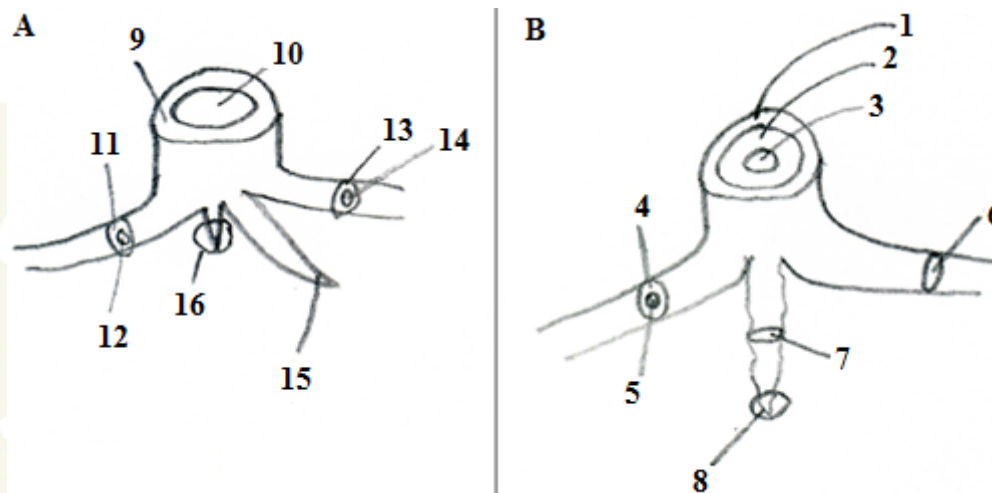
Pozitīvs

Negatīvs

No 300 pārbaudītiem kokiem, 119 dod pozitīvu rezultātu, t. i. gandrīz 40 % koku ir inficēti.

Veicot šo eksperimentu rodas aizdomas par nevienmērīgu *H. annosum* izplatību priedes stumbra pamatnē, jo divi koki, uz kuriem tika atrasts *H. annosum* augļķermenis, pārbaudē deva negatīvu rezultātu.

H. annosum nevienmērīgā izplatība



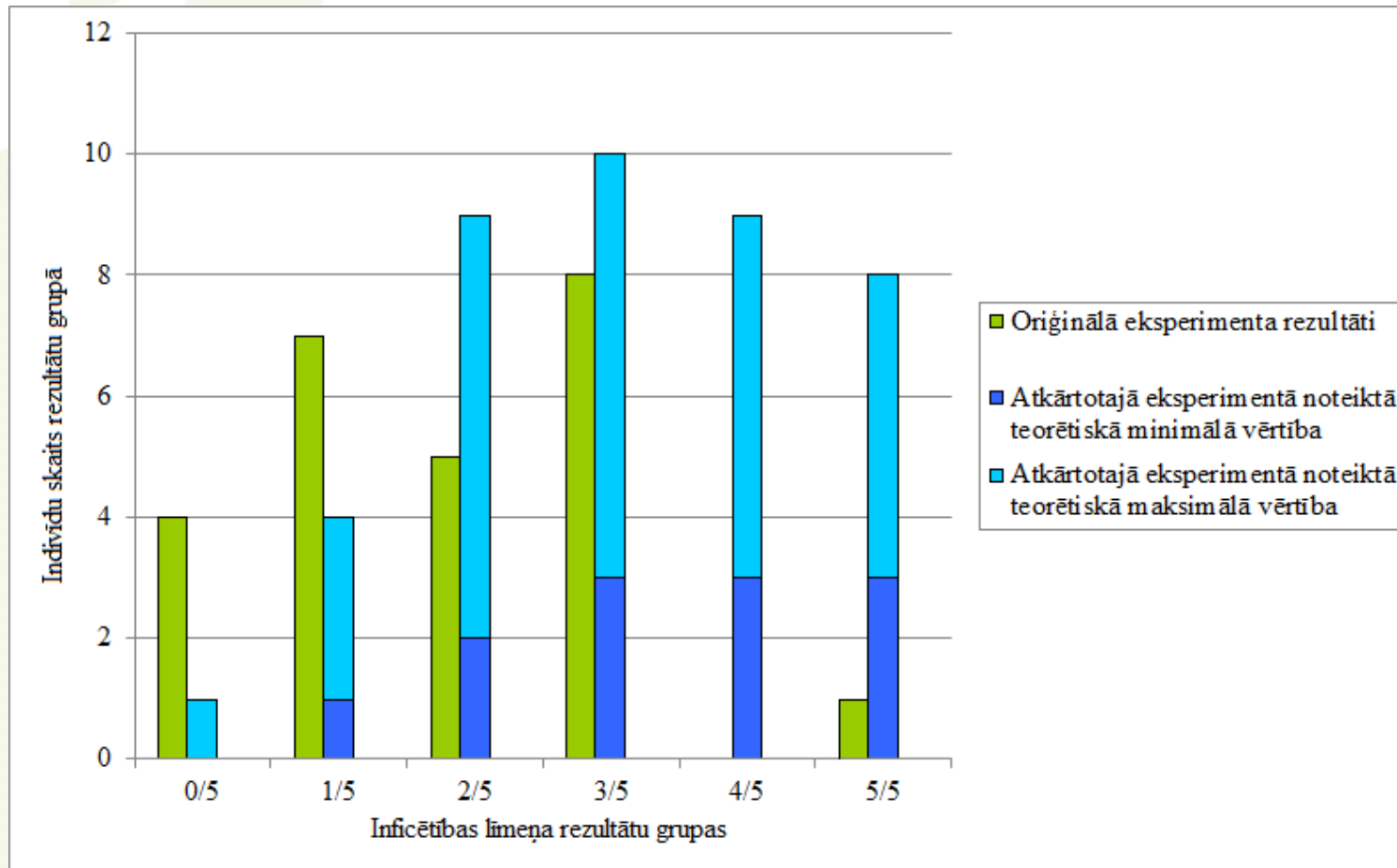
*Eglē infekcija norit citādi

	Parauga numurs	Parauga atrašanās vieta	H. annosum DNS (+/-)
Veselā koka celms	1	Stumbrs, ārpusē (1cm no mizas)	+
	2	Stumbrs, 5cm no centra	-
	3	Stumbrs, 2cm no centra	+
	4	1. sānsakne, pieguļoši stumbram, ārpusē	+
	5	1. sānsakne, pieguļoši stumbram, centrs	+
	6	2. sānsakne, 10 cm no stumbra	-
	7	Mietsakne, pieguļoši stumbram	-
	8	Mietsakne, 20 cm no stumbra	+
Nokaltušā koka celms	9	Stumbrs, ārpusē (1cm no mizas)	-
	10	Stumbrs, 1cm no centra	-
	11	1. sānsakne, pieguļoši stumbram, ārpusē	+
	12	1. sānsakne, pieguļoši stumbram, centrs	+
	13	2. sānsakne, 5 cm no stumbra, ārpusē	-
	14	2. sānsakne, 5 cm no stumbra, centrs	+
	15	3. Sānsaknes gals, 30 cm no stumbra	+
	16	Mietsakne, 5 cm no stumbra	-

Koku inficētības līmeņa noteikšana



Analīzei
5
paraugi
no koka



Atkārtotajā eksperimentā (pēc 11 mēn.) pieaug koku proporcija ar augstāku inficētības līmeņa novērtējumu.

86% inficēti (izmantojot vienu paraugu no koka 40%)

Kandidātģēnu izvēle



Kritēriji pētāmo ģēnu (kandidātģēnu) izvēlei:

- Informācija par ģēna produkta antimikrobiālām īpašībām zinātniskajā literatūrā.
- Ģēna DNS sekvences pieejamība.

Informācija bieži pieejama tikai par radniecīgām sugām, par parastās priedes antimikrobiālajiem ģēniem un šo ģēnu produktiem informācijas maz.

Analizētie gēni



- Taumatīnam līdzīgā proteīna (TLP) gēns.

Pieder PR-5 proteīnu klasei, kuras sastāvā ir proteīni ar negatīvu iespaidu uz augu patogēnu augšanu mazās koncentrācijās.

- Defenzīna 2 gēns (Def2).

Efektivitāte pret H. annosum pierādīta in vitro

- *Pinus sylvestris* rezistences gēns (PsR)

Dokumentēta gēna ekspresijas pastiprināšanās pēc inokulācijas ar H. annosum. iespējama loma auga aizsargsistēmas signālu pārnēsē.

- Pinosilvīna sintāzes gēns (PsBBs)

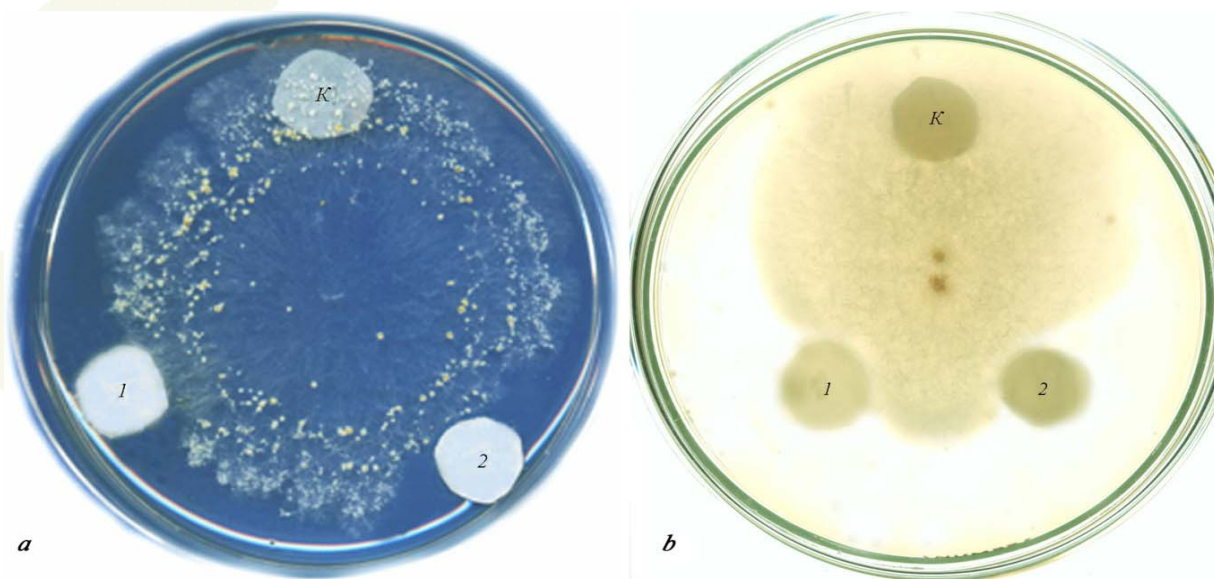
Gēna kodētais enzīms katalizē reakciju, kas sintezē pinosilvīnu – organisku savienojumu ar plaša spektra baktericīdām un fungicīdām īpašībām.

Antimikrobiālie proteīni



Antimikrobiālie proteīni ir proteīni, kas inhibē patogēnu vairošanos vai iznīcina tos.

Piemērs

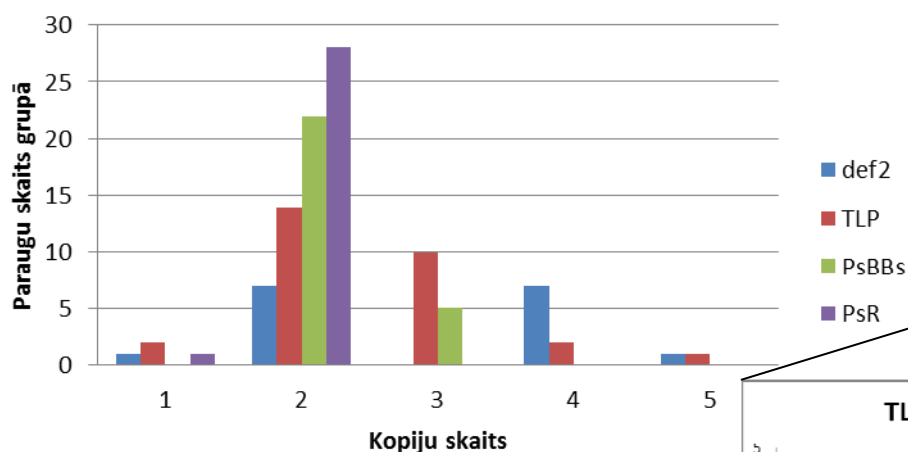


Parastās priedes Def1 proteīna (defenzīns 1) sēņu augšanu inhibēšanas efekts. a – *Heterobasidion annosum*, b – *Fusarium solani*. K – sterils destilēts ūdens, 1 – 5 μg Def1, 2 – 10 μg Def1. (Kovaleva et al., 2009.)

Rezistences kandidātģēnu kopiju skaita variācijas analīzes



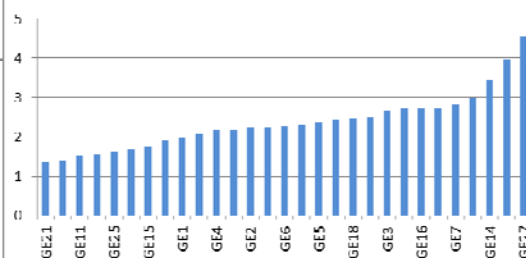
Kopiju skaita frekvences



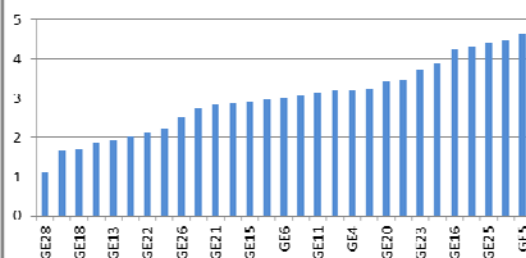
Kopiju skaita analīžu rezultātu amplitūda.

Kopiju skaita variācijas detektētas ģēniem TLP un Def2.

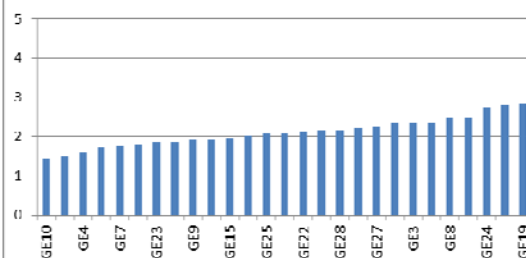
TLP ģēna kopiju skaits



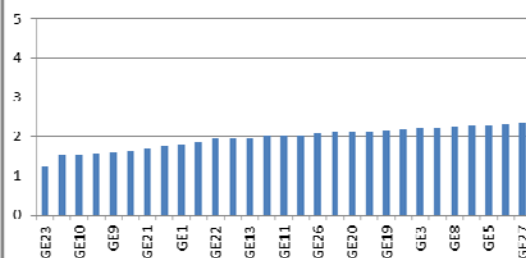
Def2 ģēna kopiju skaits



PsBBs ģēna kopiju skaits



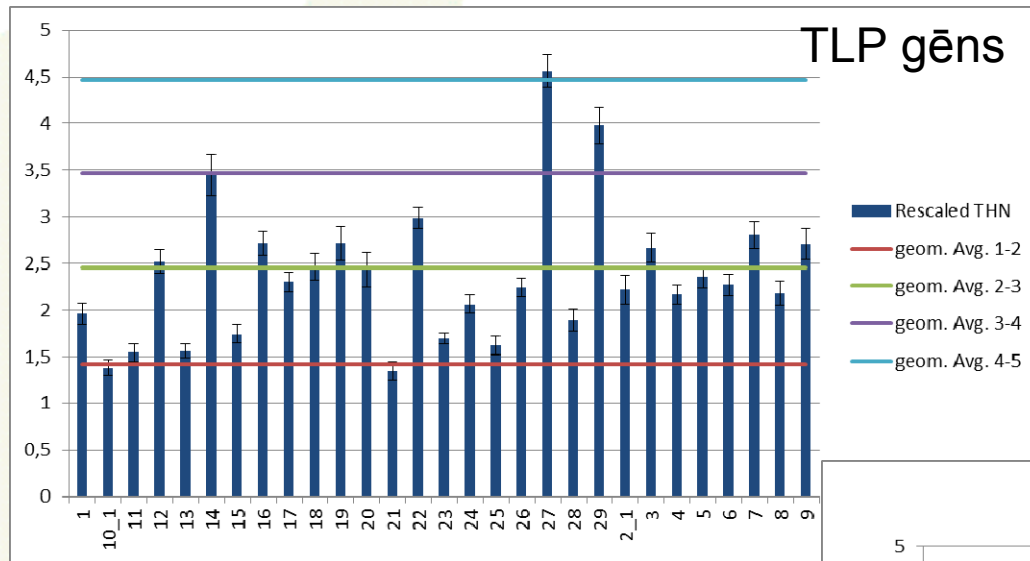
PsR ģēna kopiju skaits



Gēnu kopiju skaits



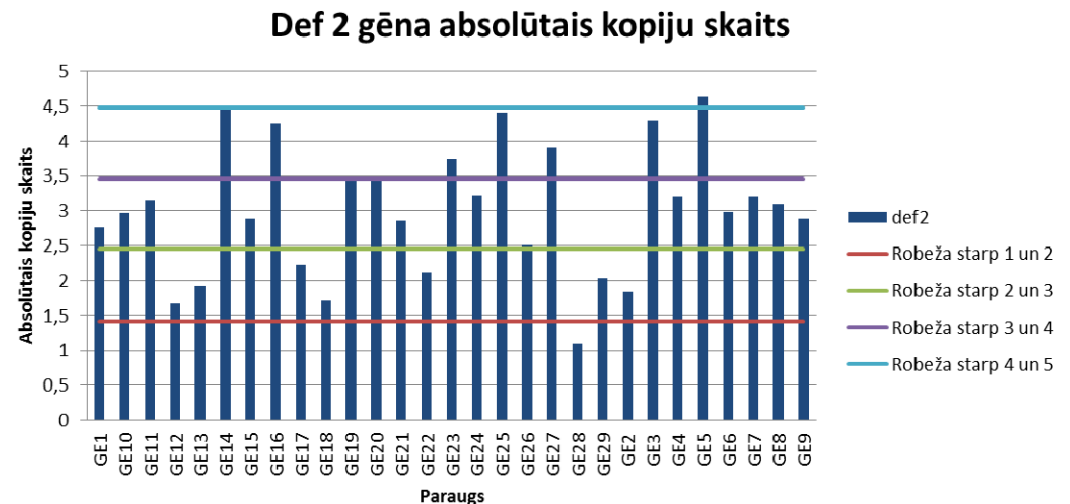
Hipotēze: lielāks kopiju skaits → gēna aktīvāka darbība → rezistentāks īpatnis



Efektivitāte pret *H. annosum* vēl jāpierāda.

Pirmie dati par CNV priedē.

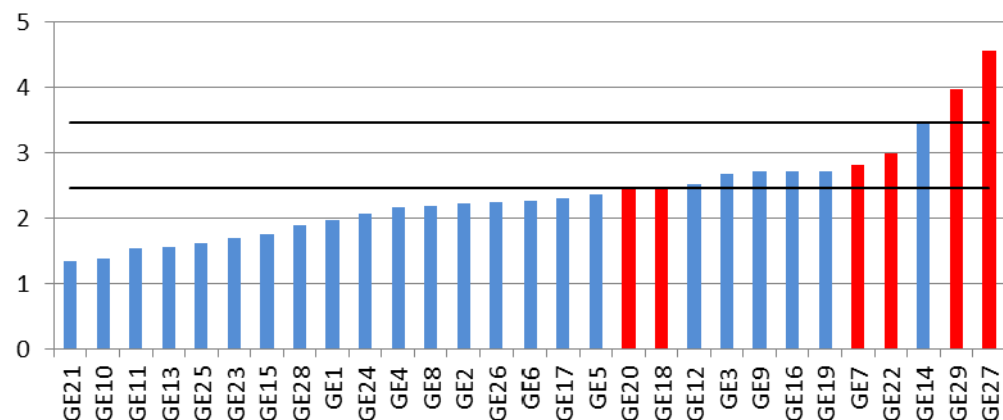
Efektivitāte pret *H. annosum* pierādīta *in vitro*.



Rezultātu ģimenes struktūra

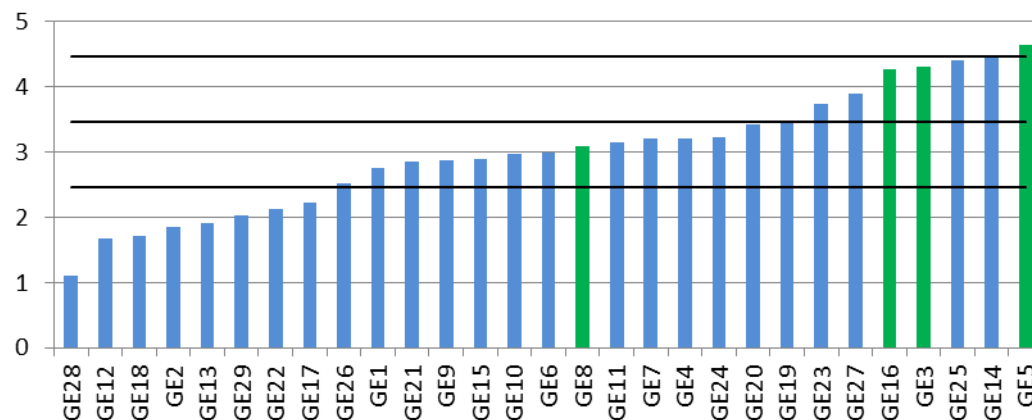


TLP gēna kopiju skaits



TLP gēna gadījumā visiem Ja3 ģimenes kokiem, izņemot paraugu GE20, kas ir ļoti tuvi robežai, kopiju skaits ir lielāks par divi.

Def2 gēna kopiju skaits



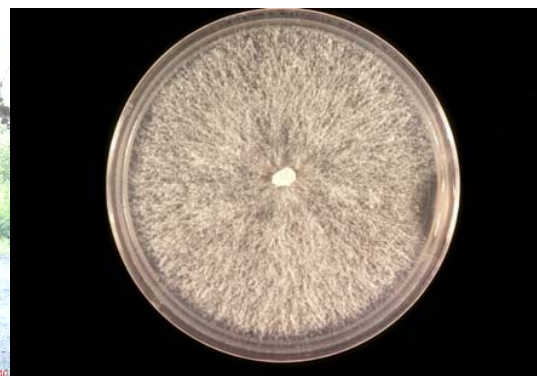
Def2 gēna analīzē iegūtajiem rezultātiem ir ģimenes struktūra - visiem ģimenes Ja15 pārstāvjiem ir vismaz 3 šī gēna kopijas.

Rezultātu ģimenes struktūra pastiprina CNV analīžu rezultātu ticamību.

Zemmizas inokulēšana



- Gēnu ekspresijas izmaiņu novērtēšanai
- Inokulēšanas ar *H. annosum* izraisītās pigmentācijas garuma novērtēšanai (ilgākā laika periodā)

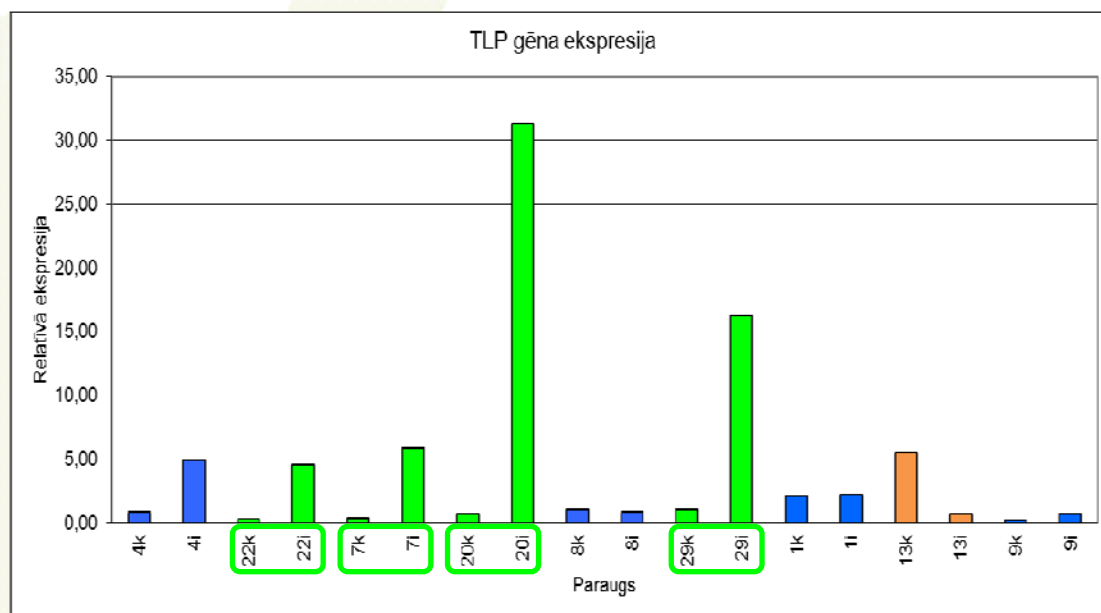


TLP gēna ekspresija



*Gēna ekspresija = gēna darbības intensitāte

TLP loma inducētajā rezistencē lielāka nekā primārajā rezistencē



Endogēnā kontrole = GAPDH

Paraugs	Relatīvā ekspresija	Attiecība starp kontroles un inokulēto paraugu
4k	0,78	
4i	4,90	6,30
22k	0,27	
22i	4,52	16,49
7k	0,30	
7i	5,89	19,30
20k	0,64	
20i	31,28	48,57
8k	1,00	
8i	0,82	0,82
29k	1,03	
29i	16,27	15,85
1k	2,09	
1i	2,20	1,06
13k	5,48	
13i	0,67	0,12
9k	0,16	
9i	0,74	4,60

Paraugiem ar lielāku TLP gēna kopiju skaitu (**attēlā zaļi**) šī gēna ekspresija pēc inokulēšanas ar *H. annosum* palielinās vairāk nekā paraugiem, kuros TLP kopiju skaits nav palielināts (**attēlā zili**)!

Dati vēlreiz pastiprina CNV analīžu ticamību.

Secinājumi



- Attīstīta PĶR metode individuālu *P. sylvestris* koku inficētības līmeņa noteikšanai. Konstatēts, ka *H. annosum* priedes stumbra pamatnē izplatās nevienmērīgi. Analizējot 5 paraugus no katra koka ir iespējams raksturot inficētības pakāpi un pētīt tās dinamiku.
- Detektēts kopiju skaita polimorfisms diviem ar rezistenci saistītiem gēniem. Pirmo reizi priedē pētīts gēnu kopiju skaita polimorfisms.
- Noteiktas *H. annosum* izraisītas gēnu ekspresijas izmaiņas. Detektēts, ka analizēto gēnu ekspresija uz *H. annosum* reaģē dažādi, kas norāda uz šo gēnu lomu dažādos rezistences mehānismos.
- TLP gēnam noteikta korelācija starp gēnu kopiju skaitu un gēna ekspresijas pieaugumu, šādi dati par priedi agrāk nav aprakstīti.

Darba novitāte



- Izveidota molekulārās ģenētikas metode individuālu koku inficētības ar *H. annosum* līmeņa raksturošanai.
 - Pirmais darbs, kurā detektētas un pētītas gēnu kopiju skaita variācijas priežu genomos.
 - Pirmais darbs, kurā aprakstīta palielināta gēna kopiju skaita korelācija ar lielāku gēna ekspresijas pieaugumu reakcijā uz inokulāciju ar *H. annosum*.
 - Pirmo reizi aprakstītas gēnu ekspresijas analīzes dažādiem audu tipiem viengadīgos parastās priedes sējeņos, kombinējot lāzera mikrosecēšanas mikroskopiju ar gēnu ekspresijas analīzēm.
 - Līdz šim nav publicēti darbi par rezistences mehānismiem molekulārās ģenētikas līmenī pieaugušos *P. sylvestris* sugas kokos.
-

Gēnu kopiju skaita analīžu priekšrocības



Bieži rezistences pētījumos izmanto gēnu ekspresijas, t. i. gēnu darbības intensitātes analīzes. Salīdzinot ar šo metodi, gēnu kopiju skaita analīzēm ir vairākas priekšrocības:

- **Vienkāršums**
- Mazāks darba apjoms
- **Ātrāka rezultātu ieguve**
- Lielāks ražīgums (salīdzinot ar ekspresijas analīzēm tas var būt milzīgs)

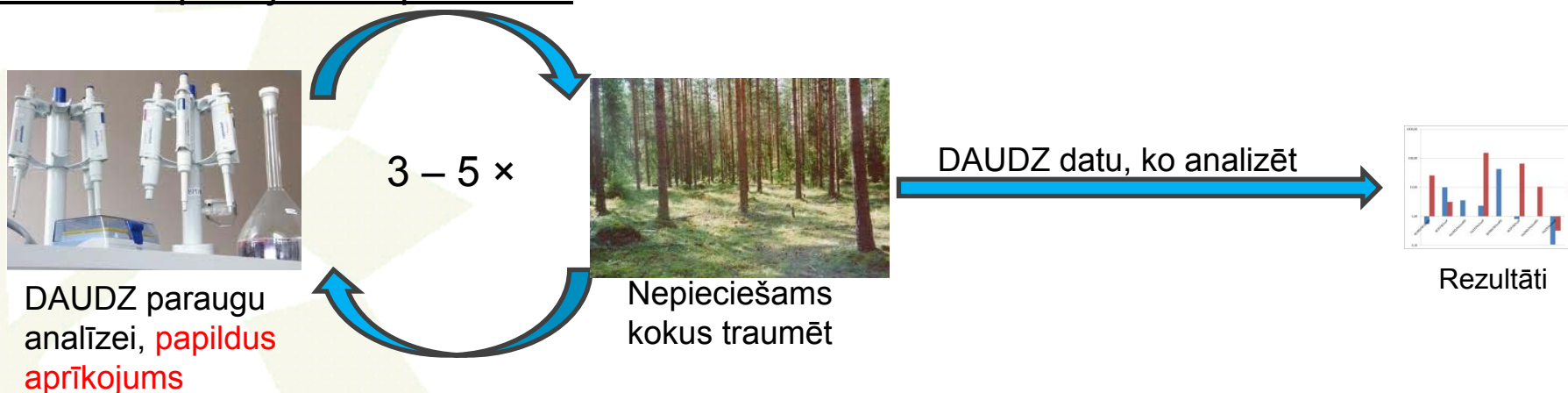
Praktiskam pielietojumam nepieciešams:

- **Kopiju skaita korelācija ar ekspresiju**
- Gēna kodētā proteīna efektivitāte pret patogēniem

Gēnu kopiju skaita analīžu priekšrocības



Gēnu ekspresijas eksperimenti



Gēnu kopiju skaita analīžu eksperimenti





*ESF projekts „Zinātniskās kapacitātes stiprināšana augļkopības, mežu un informācijas tehnoloģijas nozarēs, nodrošinot videi draudzīgu audzēšanas risinājumu, produktu izstrādes un ieviešanas izpēti ar datortehnoloģiju atbalstu”
(Nr.2009/0228/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/035)*
