

Koksnes veidošanā iesaistīto gēnu ekspresija parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) brīvapputes ģimenēs salīdzinājumā ar relatīvo koksnes blīvumu

Krista Kānberga-Siliņa¹, Āris Jansons¹, Dainis Ruņģis^{1*}

Kānberga-Siliņa, K., Jansons, Ā., Ruņģis, D. (2012). Comparison of wood formation related candidate gene expression with relative wood density in open pollinated Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) families. *Mežzinātne* 26(59): 120-133.

Kopsavilkums. Parastā priede ir ekonomiski nozīmīgākā koku suga Latvijā. Koksnes veidošanos ietekmē gan eksogēni, gan endogēni faktori, to mijiedarbība, kā arī iesaistīto gēnu un transkripcijas faktoru ekspresija. Viens no galvenajiem koksnes kvalitāti raksturojošiem parametriem ir koksnes blīvums. Sugas ietvaros to būtiski ietekmē ģenētiskie faktori. Parastās priedes gēni, kas iesaistīti koksnes veidošanās procesos, ir maz pētīti. Mūsu pētījumam atlasīti kandidātģēni, kas piedalās atšķirīgos koksnes veidošanās ciklos un varētu būt saistīti ar koksnes blīvumu: lignīna biosintēzē – *PAL1*, *CCR*, *CAD*; ūdens transporta nodrošināšanā starp šūnām – *Aqual*, saharozes biosintēzē – *SuSy*, ar mērķi raksturot šo gēnu darbību koksnes veidošanās laikā un noskaidrot, vai pastāv saistība starp šo gēnu ekspresiju un koksnes blīvumu ģimeņu ietvaros. Piecu kandidātģēnu 50 paraugiem noteikta ekspresija agrīnās un vēlinās koksnes veidošanās laikā, 25 paraugi ņemti no sešām ģimenēm ar zemāku relatīvo koksnes blīvumu un 25 – no četrām ģimenēm ar augstāku relatīvo blīvumu. Statistiski būtiska gēnu ekspresijas atšķirība starp agrīnās un vēlinās koksnes veidošanos konstatēta gēniem *Aqual*, *Susy* un *CAD*, bet lignīna biosintēzē iesaistītajiem gēniem *PAL1* un *CCR* šī atšķirība nav būtiska. Atšķirīgos gadalaikos vairāku kandidātģēnu vidējais ekspresijas līmenis dažādās parastās priedes brīvapputes ģimenēs atšķiras līdz astoņām reizēm. Korelācija starp kandidātģēnu vidējo ekspresijas līmeni ģimenēs un relatīvo koksnes blīvumu konstatēta gēnam *Aqual* agrīnās koksnes veidošanās laikā ($r = -0,55$) un gēnam *CCR* vēlinās koksnes veidošanās laikā ($r = 0,58$). Noskaidrots, ka pastāv sakarības starp kandidātģēnu ekspresiju un relatīvo koksnes blīvumu dažādām parastās priedes brīvapputes ģimenēm, kas augušas dabiskos apstākļos. Konstatēta nozīmīga ģenētiskā daudzveidība ģimenes ietvaros, kas varētu būt potenciāls turpmāko pētījumu objekts.

Nozīmīgākie vārdi: koksnes blīvums, gēnu ekspresija, *CAD*, *Susy*, *Aqual*, *PAL1*, *CCR*.

•••

Kānberga-Siliņa, K.², Jansons, Ā.², Ruņģis, D.^{2*} **Comparison of wood formation**

¹ LVMI Silava, Rīgas iela 111, Salaspils, LV-2169, Latvija; *e-pasts: dainis.rungis@silava.lv

² Latvian State Forest Research Institute "Silava", 111 Rīga str., Salaspils, LV-2169, Latvia,

*e-mail: dainis.rungis@silava.lv

related candidate gene expression with relative wood density in open pollinated Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) families.

Abstract. Scots pine is a species of great economic importance in Latvia. Wood properties are affected both by endogenous and exogenous factors and driven by coordinated expression of structural genes and transcription factors. One of the most important wood characteristics is wood density. Wood density within species is affected by genetic factors. Genes involved in wood formation in Scots pine are less studied than in other important species. For this research candidate genes related to wood formation were selected; three are involved in lignin biosynthesis (*PAL1*, *CCR*, *CAD*), one in water transport (*Aqual*) and one in sucrose biosynthesis (*SuSy*). The aim was to characterize wood formation related candidate gene expression in selected scots pine open pollinated families determine if correlations between candidate gene expression and relative wood density can be established in a family context. Samples at each of two time points (during early and late wood development) were taken from 50 trees from which 25 represented six tree families with lower relative wood density and 25 represented four tree families with higher density. The greatest significant differences in gene expression between early and late wood formation were found for the *Aqual*, *Susy* and *CAD* genes. No statistically significant differences were found for the *PAL1* and *CCR* genes. For some candidate genes, the average gene expression between families varied up to eight times depending on the season. Significant correlations were found between average candidate gene expression level and relative wood density within families during early wood development for the *Aqual* gene ($r = -0.55$) and for the *CCR* gene during late wood formation ($r = 0.58$). It is concluded that it is possible to detect significant correlations between selected candidate gene expression and relative wood density for open pollinated tree families, growing in uncontrolled environmental conditions. Genetic variation within tree families affects wood formation and could be the object of future research.

Key words: wood density, gene expression, *CAD*, *Susy*, *Aqual*, *PAL1*, *CCR*.

...

Канберга-Силиня, К.³, Янсонс, А.³, Рунгис, Д.^{3*} **Экспрессия в образовании древесины вовлечённых генов семейств свободного опыления сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) по сравнению с релятивной плотностью древесины.**

Резюме. Сосна обыкновенная одна из самых экономически значимых пород деревьев Латвии. На образование древесины влияют как экзогенные, так и эндогенные факторы и их взаимодействие, а также факторы транскрипции и экспрессия структуральных генов. Одним из самых главных качественных параметров древесины является плотность, на которую, в пределах вида, значительно влияют генетические факторы. Гены, которые связаны с образованием древесины, пока мало изучены. Поэтому в нашем исследовании были выбраны гены кандидаты, которые вовлечены в различных процессах образования древесины сосны обыкновенной: в биосинтезе лигнина – *PAL*, *CCR*, *CAD*, в обеспечении

³ ЛГИЛ «Силава», ул. Ригас 111, Саласпилс, LV-2169, Латвия; *эл. почта: dainis.rungis@silava.lv

транспорта воды между клетками – *Aqual* и в биосинтезе сахарозы *SuSu*, с целью описать эти гены в семействах естественного опыления и выяснить, существует ли взаимосвязь между экспрессией генов и показателями плотности древесины у этих семейств. В общем анализировано 50 образцов раннего и позднего периодов образования древесины от пяти генов кандидатов: изучено 25 образцов из шести семейств с более низкой сравнительной плотностью древесины и 25 образцов из четырёх семейств со сравнительно высокими показателями плотности. Значительно отличалась экспрессия между древесиной раннего и позднего образования у генов *Aqual*, *Susy*, но у генов биосинтеза лигнина *PAL*, *CAD* и *CCR* эти различия были маловыраженными. В различных сезонах средняя экспрессия у большинства генов кандидатов между семействами естественного опыления отличалась даже в восемь раз. Значительная корреляция между средней экспрессией генов кандидатов в семействах сосны обыкновенной и сравнительной плотностью констатирована у генов *Aqual* во времени раннего образования древесины ($r = -0,55$) и у *CCR* – во времени позднего образования древесины ($r = 0,58$). В результате выяснено, что возможно вычислить значительные различия и взаимосвязь между экспрессией генов кандидатов и сравнительной плотностью древесины разных семейств деревьев естественного опыления, которые произрастали в условиях без контроля. Однако, учитывая обширный спектр возможных вариаций экспрессии генов в пределах каждого семейства, более значимым является анализ каждого индивидуального дерева.

Ключевые слова: плотность древесины, экспрессия генов, *CAD*, *Susy*, *Aqual*, *PAL*, *CCR*.

Ievads

Parastā priede (*Pinus sylvestris* L.) ir viena no ekonomiski nozīmīgākajām koku sugām Ziemeļeiropā ar visplašāko izplatības areālu pasaulē (Nicolov & Helmisaari, 1992). Latvijā parastā priede aizņem 35 % no mežu platības (Valsts meža dienests, 2012), un tās koksnes īpašības viens no pirmajiem pētījis A. Kalniņš (Kalniņš, 1930). Šķēles *et al.*, 2002 pētījumā par parastās priedes koksnes anatomiskajām un fizikālajām īpašībām konstatēts, ka tās ir variablas, un vairumam mērīto parametru variācijas koeficients ir augstāks par 20 %.

Ģēni, kas iesaistīti koksnes veidošanās procesos parastajai priedei ir mazāk pētīti

nekā citām ekonomiski nozīmīgām priežu sugām, piemēram, *Pinus radiata* un *Pinus taeda* (Lev-Yadun & Sederoff, 2000). Koksnes veidošanos ietekmē gan eksogēni, gan endogēni faktori un to mijiedarbība, un to kontrolē koordinēta iesaistīto ģēnu un transkripcijas faktoru ekspresija (Plomion *et al.*, 2001). Skujkoku koksnes veidošanās gaitā mērenajā joslā izšķir agrīnās koksnes (pavasari/vasarā) un vēlinās koksnes veidošanos vasaras beigās/rudenī (Creber & Chaloner, 1984; Uggla *et al.*, 2001).

Agrīnā koksne sastāv no šūnām ar plāniem primārajiem šūnapvalkiem un lielām šūnām, bet vēlinās koksnes traheīdas ir mazākas un ar bieziem sekundārajiem šūnapvalkiem (Lev-Yadun & Sederoff, 2000;

Ugla *et al.*, 2001). Agrinā koksne satur vairāk lignīna, mazāk hemiceluložu, celulozes, un tās blīvums ir zemāks (Li *et al.*, 2009). Koksnes īpašības, piemēram, blīvums, mainās arī kokam augot (Plomion *et al.*, 2001; Cato *et al.*, 2006). Parastās priedes koksnes blīvums palielinās līdz 15 gadu vecumam un tad stabilizējas. Konstatēta korelācija starp juvenilās un brieduma koksnes blīvumu (Hannrup *et al.*, 1998).

Lignīns ir komplekss polimērs, bez noteiktas struktūras un ir ļoti nevienmabīgs. Tas ir viens no svarīgākajiem augu biopolimēriem un ir nepieciešams, lai veicinātu šūnapvalku un visa auga mehānisko izturību. Lignīns nodrošina šūnapvalka ūdensizturību, kā arī piedalās ūdens un ūdenī šķīstošo savienojumu transportēšanā (Whetten & Sederoff, 1995). Lignīna biosintēzē iesaistītie gēni piedalās augu aizsardzības reakcijās pret dažādiem patogēniem (Sarkanen & Ludwig, 1971 cit. pēc Boerjan *et al.*, 2003). Vidējais lignīna daudzums dažādām priekšu sugām variē no 25 līdz 35 % no sausnes (Plomion *et al.*, 2001). Lignīna biosintēzes ceļš ir daļa no lielā fenilpropanoīdu biosintēzes ceļa (Dixon *et al.*, 2002; Vanholme *et al.*, 2010). Lignīna biosintēze var atšķirties starp audu tipiem un atsevišķām šūnām. Galvenie biosintēzē iesaistītie enzīmi kā, piemēram, PAL, CCR, 4CL un CAD, ietekmē metabolītu plūsmu lignīna biosintēzes procesā (Campbell & Sederoff, 1996).

Fenilalanīna amonija liāze (PAL) katalizē fenilalanīna deamināciju par cinamātu, un tas ir fenilpropanoīdu bioķīmiskā ceļa pirmais solis, kas nodrošina substrātu arī monolignolu biosintēzei (Whetten & Sederoff, 1995). Terpentīna

priedei *Pinus taeda* tika konstatēts viens PAL enzīmu kodējošiem gēniem (Whetten & Sederoff, 1992). Tomēr *Pinus banksiana* genoma pētījumi liecina, ka, tāpat kā segsēkļiem, arī kailsēkļiem gēns PAL1 pieder pie lielākas gēnu ģimenes (Butland *et al.*, 1998). Jaunākie publicētie dati liecina, ka *P. taeda* genomā ir pieci PAL ģimenes gēni (Bagal *et al.*, 2012). Paaugstināts PAL daudzums var būt evolucionārs pielāgojums, jo fenilpropanoīdu ceļš piedalās gan augšanas, gan auga aizsardzības reakciju nodrošināšanā (Campbell & Sederoff, 1996). Dillon *et al.* (2010) noskaidroja, ka atsevišķas viena nukleotīda nomainīgas gēnā PAL1 var būt saistītas ar koksnes blīvumu *P. radiata*. Dvornyk *et al.* (2002) atklāja, ka parastās priedes PAL1 lokusam raksturīga zema daudzveidība, kas norāda uz tā nozīmīgumu.

Cinamil-CoA reduktāze (CCR) katalizē hidroksicinamil-CoA tioestera reducēšanu par atbilstošajiem aldehīdiem, un šī enzīma katalizētais lignīna biosintēzes posms tiek uzskatīts par pirmo soli monolignolu biosintēzē no fenilpropanoīdiem (Whetten & Sederoff, 1995). Kanēļspirta dehidrogenāze (CAD) katalizē hidroksicinamaldehīdu reducēšanu par hidroksicinamalkoholiem, un tas tiek uzskatīts par pēdējo monolignolu biosintēzes soli. No augiem ar samazinātu CAD aktivitāti vieglāk iegūstama papīrrūpniecībai nepieciešamā celulozes masa (Whetten & Sederoff, 1995; Baucher *et al.*, 1996). Terpentīna priedei sastopami mutanti, kuriem raksturīga defektīva *cad-1* alēle, un šiem kokiem ir augstāks koksnes blīvums, salīdzinot ar indivīdiem, kuru CAD gēnā nav mutāciju. Kā iemesls tam tiek minēta lielāka vēlinās koksnes proporcija *cad-1*

heterozigotiskiem kokiem nekā kokiem ar abām funkcionālajām gēna *CAD* alēlēm (Yu *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006). *P. taeda* *CAD* enzīmu kodē viens gēns (O'Malley *et al.*, 1992). *CAD* aktivitāte ietekmē lignīna sastāvu (MacKay *et al.*, 1997). Li *et al.* (2011b) secinājis, ka *CAD* gēns *P. radiata* vairāk ekspresēts indivīdos ar augstāku koksnes cietību (zemāku mikrofibrilu leņķi). Tomēr samazināta *PAL* aktivitāte ietekmē lignīna sastāvu vairāk nekā samazināta *CAD* aktivitāte, kas varētu liecināt par alternatīva monolignolu biosintēzes ceļa esamību (MacKay *et al.*, 1997; Bate *et al.*, 1994).

Lignīna biosintēzē iesaistīto gēnu ekspresiju ietekmē transkripcijas faktori kā, piemēram, *MYB* gēnu ģimenes kodētie proteīni, vides faktori un hormonu darbība (Plomion *et al.*, 2001). Koksnes veidošanās procesā iesaistītie gēni var ietekmēt arī mikrofibrilu leņķi un koksnes blīvumu (Li *et al.*, 2011a).

Arī saharozes sintēzei ir būtiska loma koksnes veidošanās procesā. Saharozes sintēzes gēns *Susy* nodrošina resursus arī celulozes sintēzei (Uggla *et al.*, 2001). Nairn *et al.* (2008) konstatējis, ka *P. taeda* *Susy* gēna ekspresijas variācija no aprīļa līdz augustam ir līdzīga celulozes sintēzes gēnu ekspresijas variācijai tajā pašā laika periodā. Enzīms *Susy* sastopams visās auga daļās un, samazinot *Susy* aktivitāti līdz 2-6 % no dabiskās aktivitātes, konstatēta palēnināta augu augšana un mazāks cietes daudzums audos (Martin *et al.*, 1993). *Susy* enzīms ir lokalizēts citosolā, bet daļa tiek saistīta arī ar aktīna citoskeletu vai plazmatisko membrānu (Amor *et al.*, 1995). *P. taeda* konstatēti vairāki saharozes sintēzes gēni (Nairn *et al.*, 2008). Modeļorganismam

Arabidopsis thaliana aprakstīti seši saharozes sintēzes gēni (Baud *et al.*, 2004). Konstatēts, ka gēns *Susy* vairāk ekspresēts juvenilā koksne – *P. radiata* indivīdos ar augstāku koksnes blīvumu (Li *et al.*, 2012).

Šūnu elongācijai nepieciešama strauja liela ūdens daudzuma pārvietošana. Šajā procesā iesaistīti akvaporīni (Johansson *et al.*, 2000). Akvaporīnu un akvaporīniem līdzīgo proteīnu gēni *P. radiata* agrīnajā un vēlīnajā koksne tiek ekspresēti atšķirīgi (Li *et al.*, 2010).

Gēnu ekspresijas atšķirības ir būtiskas fenotipiskajai variabilitātei sugas ietvaros. Gēnu ekspresijas līmenis atšķiras starp dažādiem indivīdiem un šūnu veidiem (Palle *et al.*, 2010). Gēnu ekspresija pētīta dažādiem organismiem, kas pakļauti dažādiem apstākļiem, tomēr gēnu ekspresijas variācija un atšķirības dabiskos apstākļos augošām populācijām pētītas salīdzinoši maz.

Lai selekcijas darbā iekļautu funkcionālus molekulāros marķierus, nepieciešams plašāks priekšstats par koksnes veidošanās iesaistītajiem gēniem un procesiem (Plomion *et al.*, 2001). Ukrainetz *et al.* (2008) secinājis, ka, izmantojot par vienu no kritērijiem augstāku agrīnās koksnes blīvumu, varētu neizraisīt būtisku koksnes pieauguma samazināšanos, jo selekcijas materiāla atlasē izvēloties par kritēriju vēlīnās koksnes blīvumu, var samazināties pēcnācēju radiālā augšana.

Darba mērķis – raksturot koksnes veidošanās procesā iesaistītos gēnus parastās priedes pluskoku brīvapputes ģimenēs un noskaidrot, vai pastāv saistība starp atlasīto kandidātģēnu ekspresiju un koksnes blīvumu.

Materiāli un metodes

Kandidātģēnu atlase un praimeru veidošana

Kandidātģēnu pieeja pētījumos par ģenētisko faktoru ietekmi uz fenotipu saistīta ar asociāciju noteikšanu starp konkrētu ģēnu struktūras vai darbības intensitātes (ekspresijas) variāciju un fenotipu. Šādi izpētei izvēlētie ģēni ir kandidātģēni. Mūsu projekta izpildei kandidātģēni atlasīti, analizējot pieejamo informāciju par koksnes veidošanā iesaistītajiem ģēniem, kas ir pētīti kādai kailsēkļu sugai. Vērā ņemta arī ģēnu sekvenču pieejamība datubāzēs. Praimeru veidošanai izmantotas NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) datu bāzē (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) atrodamās sekvenses (CCR – AY064169, CAD – AF549814, PAL1 – AF353986 *Susy* – EF619967, *Aqual* – EU301695). Praimeru konstruēti, pielietojot brīvi pieejamas programmas – Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) un FastPCR (<http://primerdigital.com/fastpcr.html>). Vispirms iespējamo praimeru sekvenses pārbaudītas ar programmu NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>). Pēc tam katram kandidātģēnam, izmantojot PCR, laboratorijā pārbaudīti četri līdz seši praimeru pāri, un turpmākam darbam izvēlēti tie, kuru kvalitāte reālā laika polimerāzes ķēdes reakcijās bija apmierinoša. Endogēnās kontroles ģēna *GAPDH* (glicerāldehīda 3-fosfāta dehidrogenāzes ģēns) praimeru sekvenses iegūtas no Šķipars *et al.* (2011).

Relatīvā koksnes blīvuma noteikšana

Nobriedušās ārējās koksnes relatīvā blīvuma noteikšanai izmantots *Pilodyn 6J*

Forest instruments, kas darbojas ar noteiktu spēku – 6 džouliem (J) – dzenot kokā metāla stieni, kura diametrs ir 2,5 mm. Pirms mērīšanas kokam attiecīgajā vietā noņem mizu (Hansen, 2000). Mērījumus veic viena metra augstumā no koka sakņu kakla. Uz instrumenta skalas nolasāms stieņa garums, kas palicis ārpus koka. Kien *et al.* (2008) dati apstiprina, ka koksnes blīvums, kas noteikts, pielietojot kokam destruktīvas, bet precīzākas metodes, atbilst *Pilodyn* vērtībām. Relatīvais koksnes blīvums milimetros izmērīts 565 valdaudzes kokiem. Turpmākam darbam izvēlētas sešas ģimenes ar zemāku un četras ar augstāku koksnes blīvumu, un to ietvaros – 25 koki ar augstāko un 25 koki ar zemāko relatīvo blīvumu. Analizēto indivīdu skaits no katras ģimenes: And 19 – 3, Mis 60 – 7, S 2 – 3, S 24 – 5, S 8 – 3, S 9 – 4, Mis 34 – 6, S 25 – 6, S2 17 – 8, S2 18 – 5.

Stādījuma raksturojums un paraugu ievākšana

Koksnes paraugi ģēnu ekspresijas pētījumiem ievākti parastās priedes stādījumā, kas ierīkots Latvijas centrālajā daļā (56°41'N, 24°26'E) 1982. gadā. Attālums starp kokiem 2 × 1 m, stādījumā nav veikta kopšanas cirte. Atlasīti parastās priedes brīvapputes ģimeņu indivīdi no dažādām izcelsmes vietām: Misis (Vecumnieku novads), Andrupenes (Dagdas novads), Silenes un Silenes2 (Daugavpils novads). Eksperiments reģistrēts Ilglaicīgo pētniecisko objektu reģistrā – Nr. 30. Paraugi ievākti 2011. gada maija sākumā un septembra beigās. No katra koka iegūts viens koksnes paraugs 1 metra augstumā no sakņu kakla. Vispirms kokam 10 × 5 cm liels laukums attīrīts no mizas. Ar tīru skalpeli atdalīti

mikstie audi (kambijs, sekundārā ksilēma un floēma), kas, pēc ievietošanas 2 ml stobriņā, nekavējoties sasaldēti šķidrā slāpekļī.

RNS izdalīšana

RNS (ribonukleīnskābes) izdalīšanai izmantota metode, pielietojot ekstrakcijas buferi ar CTAB (2 % CTAB; 0.1 M Tris-HCl (pH 8); 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA (pH 8); 2 % PVPP. Pirms lietošanas pievienots β -merkaptotetanolis – beigu koncentrācija buferī 10 %) (Chang *et al.*, 1993; Pina & Perez, 2011) ar nelielām modifikācijām. RNS koncentrācija noteikta, pielietojot Qubit spektrofluorimetru un Quant-iT reaģentus (Invitrogen) pēc ražotāja norādījumiem. Katram paraugam izmantoti 200 μ l bufera un 1 μ l krāsas.

Lai atbrīvotos no DNS (deoksiribonukleīnskābes) piemaisījuma, RNS paraugi apstrādāti ar DNāzi I (kat. nr. EN0521, Thermo scientific) un attīrīti, izmantojot fenola/hloroforma/izoamilspirta maisījumu attiecībā 50 : 49 : 1. RNS tīrība pārbaudīta, ar PCR reakciju (sākuma denaturācija 95°C 5 min; 35 cikli 95°C 35 s; 55°C 35 s; 72°C 2 min, gala elongācija 72°C 10 min). Kopējais reakcijas tilpums 20 μ l. Vienas reakcijas sastāvs: 1 μ l tiešā un atgriezeniskā praimera, 2 μ l 10x Taq PCR bufera (Thermo Scientific), 1,44 μ l 25 mM MgCl₂, 2 μ l 10 mM dNTP, 0.2 μ l Taq polimerāzes (5 U/ μ L, Thermo scientific), 12,36 μ l ūdens + 500 ng RNS. Izmantoti praimeri PtSusy5F CCTGGTCTCTACCGTGTGGT, PtSusy5R GTAAGCGATGCTGCTTTC. Iegūtie rezultāti vizualizēti 1,2 % agarozes gēla ar etīdija bromīdu pēc elektroforēzes.

cDNS sintēze

Izdalītajai RNS komplementārās DNS (cDNS) sintēzei reversās transkripcijas reakcijās izmantoti 500 ng izdalītās RNS. Reversās transkripcijas reakcijas tilpums 50 μ l. Reversajai transkripcijai pielietots reaģentu komplekts *TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents* (Life technologies) un Oligo(dT)18 praimeri (Thermo Scientific), ievērojot ražotāja protokolu. Standaardlīknēm cDNS sintezēta no 1 μ g izdalītās RNS. Pavasarī ievākto paraugu analizē izmantoti pavasarī iegūta standarta parauga seriālie atšķaidījumi, bet rudenī ievākto paraugu analīzei – seriālie atšķaidījumi no rudenī iegūtā standarta parauga. cDNS pārbaudīta PCR reakcijā, kurai izmantoti praimeri, kas no genomiskās DNS amplificē garāku fragmentu nekā no cDNS (PtSusy5F un PtSusy5R). Iegūtie fragmenti vizualizēti agarozes gēla pēc elektroforēzes.

Reālā laika PCR

Gēnu ekspresijas analizēm izvēlēta reālā laika PCR pieeja, izmantojot relatīvo standartlīkni. PCR veikts, pielietojot Applied Biosystems StepOnePlus reālā laika PCR iekārtu. Reālā laika PCR reakciju temperatūras režīms: 50°C 10 min; 95°C 10 min; 40 cikli 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, kam seko kušanas līknes iegūšanas posms). Reakciju sagatavošanai izmantots reālā laika PCR reaģentu komplekts *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Thermo Scientific). Reakcijas tilpums 20 μ l. Vienas reakcijas sastāvs: 2 μ l cDNS, 0,15 μ l 10 mM kandidātģēna tiešā un 0,15 μ l 10 mM kandidātģēna atgriezeniskā praimera, 10 μ l 2x Maxima SYBR Green sagataves un 7,7 μ l

H₂O. Izmantotie praimerī: gēnam *Aqual* (aqualf7F CCTTGGCGGCCAGATCACCA, aqualr7 R GCCGCCGGTGACGAACCTGA); gēnam *CCR* (CCR1F TCAGGCCTATGTCCATGTCA, CCR1R CGAGTCAACCACATCACCAC); gēnam *Susy* (Susy4F CAAGACTCGACCGGGTAA, Susy4R TTCGGCCACTTCTCTCTGT); gēnam *PAL1* (palF CGGATCCATTAACCTACAAGC, palR TCCCGTCCAAGACATACTCC); gēnam *CAD* (cadF ACCATCCAGTTGCTCATCC, cadR CCCAGCATCACTAGCTTCC). Ikviens paraugs ar katram kandidātģenam specifiskajiem praimeriem analizēts trijos tehniskajos atkārtojumos un uz katras plates reakcija attiecīgajiem paraugiem veikta arī konstitutīvi ekspresētajam gēnam *GAPDH*. Standartliknēm izmantoti iepriekš aprakstīto cDNS standartparaugu seriālie atšķaidījumi, atšķaidījuma faktors 5.

Datu analīze

Datu analīzei izmantots StepOne v2.2 programnodrošinājums, vienfaktora dispersijas analīze ANOVA un Pīrsona korelācijas analīze. Kandidātģenu ekspresijas līmenis izteikts procentos no konstitutīvi ekspresētā gēna *GAPDH* ekspresijas. Paraugi grupēti gan pēc koksnes blīvuma (augstāks un zemāks), gan pēc parauga veida (agrīnās vai vēlinās koksnes veidošanās laikā ievāktie paraugi).

Rezultāti un diskusija

Kandidātģenu ekspresija izvēlētajās brīvapputes ģimenēs agrīnās un vēlinās

koksnes veidošanās laikā noteikta indivīdiem no sešām ģimenēm ar zemāku relatīvo koksnes blīvumu un četrām ar augstāku. Vidējās kandidātģenu ekspresijas vērtības, kas izteiktas procentos no konstitutīvi ekspresētā gēna *GAPDH* ekspresijas izvēlētajās koku ģimenēs, dotas 1. tabulā. Lielākā ģenu ekspresijas atšķirība starp agrīnās un vēlinās koksnes veidošanos konstatēta gēniem *Aqual* un *Susy*, bet lignīna biosintēzē iesaistītajiem gēniem – *PAL*, *CAD* un *CCR* – šī atšķirība nav tik izteikta. Korelācija starp kandidātģenu vidējo ekspresiju ģimenēs un relatīvo koksnes blīvumu konstatēta gēnam *Aqual* agrīnās koksnes veidošanās laikā ($r = -0,55$, $p = 0,1$) un gēnam *CCR* vēlinās koksnes veidošanās laikā ($r = 0,58$, $p = 0,1$). Pārējiem gēniem korelācija starp ģimenes vidējām ģenu ekspresijas vērtībām un relatīvo koksnes blīvumu netika konstatēta. Tomēr, salīdzināšanai pielietojot vienfaktora dispersijas analīzi (ANOVA), netika konstatētas statistiski būtiskas atšķirības starp vidējām kandidātģenu ekspresijas vērtībām ģimenēs ar augstāku un zemāku relatīvo blīvumu. Četrām no sešām ģimenēm ar zemāku relatīvo blīvumu gēna *Aqual* ekspresija agrīnās koksnes veidošanās laikā pārsniedza 1400 % no gēna *GAPDH* ekspresijas, pārējām analizētajām ģimenēm gēna *Aqual* vidējā ekspresija bija zemāka (1. attēls). Tā kā ģenu ekspresija mēdz būtiski atšķirties arī starp veģetatīvi pavairotiem indivīdiem (Gibson, 2008), bet izpētei tika izraudzīti brīvapputes koku pēcnācēji, kas auguši dabiskos vides apstākļos, līdzīgiem pētījumiem būtu rekomendējama lielāka indivīdu skaita analīze, jo ģimenes vidējo ģenu ekspresiju var būtiski ietekmēt arī

viena koka būtiski atšķirīga gēnu ekspresija. Piemērs dots 2. attēlā, kur attēlota saharozes sintāzes gēna *SuSy* ekspresija agrīnās koksnes veidošanās laikā Mis 34 koka pēcnācējiem, kur vienam indivīdam gēna *SuSy* ekspresija pārsniedz 250 % no gēna *GAPDH* ekspresijas,

citam indivīdam – 150 %, bet pārējiem trim analizētajiem indivīdiem gēna *Susy* ekspresija ir ap 50 % no gēna *GAPDH* ekspresijas. Dati atspoguļo izvēlēto kandidātģēnu augsto dabisko gēnu ekspresijas variāciju parastās priedes brīvapputes ģimeņu pēcnācējiem.

1. tabula / Table 1

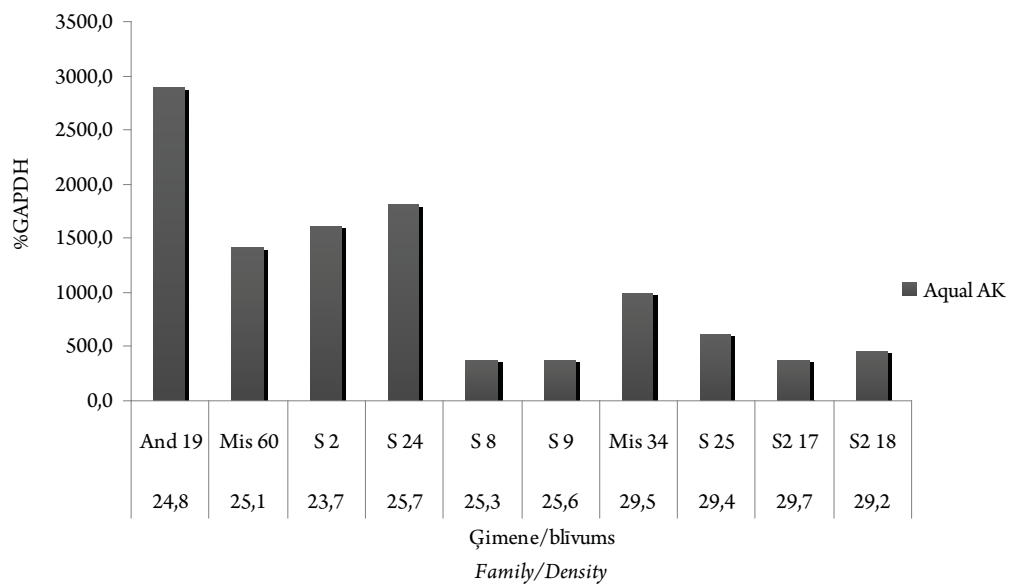
Kandidātģēnu *CCR*, *PAL1*, *CAD*, *Aqual* un *Susy* vidējā ekspresija izvēlētajās brīvapputes ģimenēs agrīnās un vēlinās koksnes veidošanās laikā
Average expression of candidate genes CCR, PAL1, CAD, Aqual and Susy in selected open pollinated families during early wood and late wood formation

Gēns / gadalaiks <i>Gene / season</i>	Ģimenes <i>Families</i>									
	S 2	And 19	Mis 60	S 8	S 9	S 24	Mis 34	S 25	S2 17	S2 18
<i>Aqual</i> AK *	1613,2	2898,7	1426,2	380,8	380,5	1818,0	994,4	620,7	374,0	461,8
<i>Aqual</i> VK	126,0	88,9	56,6	25,7	150,1	17,2	25,5	140,9	79,2	74,9
<i>CAD</i> AK	34,0	113,0	178,1	181,6	202,7	104,6	102,9	70,0	134,1	116,4
<i>CAD</i> VK	45,8	98,4	52,2	75,1	6,4	27,5	25,0	15,4	92,4	20,9
<i>CCR</i> AK	3,5	5,2	38,5	44,8	3,8	5,7	16,5	4,0	36,1	44,9
<i>CCR</i> VK *	11,6	8,3	10,5	9,5	4,7	2,1	19,0	16,6	8,4	27,3
<i>PAL1</i> AK	17,6	24,0	34,8	30,7	12,9	21,7	28,1	9,2	572,6	158,4
<i>PAL1</i> VK	79,1	79,3	53,4	69,4	66,5	16,2	0,9	43,6	49,6	119,7
<i>Susy</i> AK	41,1	60,7	148,4	41,6	42,0	58,5	104,0	59,0	147,2	84,7
<i>Susy</i> VK	0,9	5,2	4,2	2,1	2,3	0,9	0,3	2,3	4,6	7,1
Blīvums, mm Density, mm	23,7	24,8	25,1	25,3	25,6	25,7	29,5	29,4	29,7	29,2
	Zemāks blīvums / <i>Lower density</i>						Augstāks blīvums / <i>Higher density</i>			

Paskaidrojumi / *Legend*: VK – vēlinā koksne / *late wood*; AK – agrīnā koksne / *early wood*;

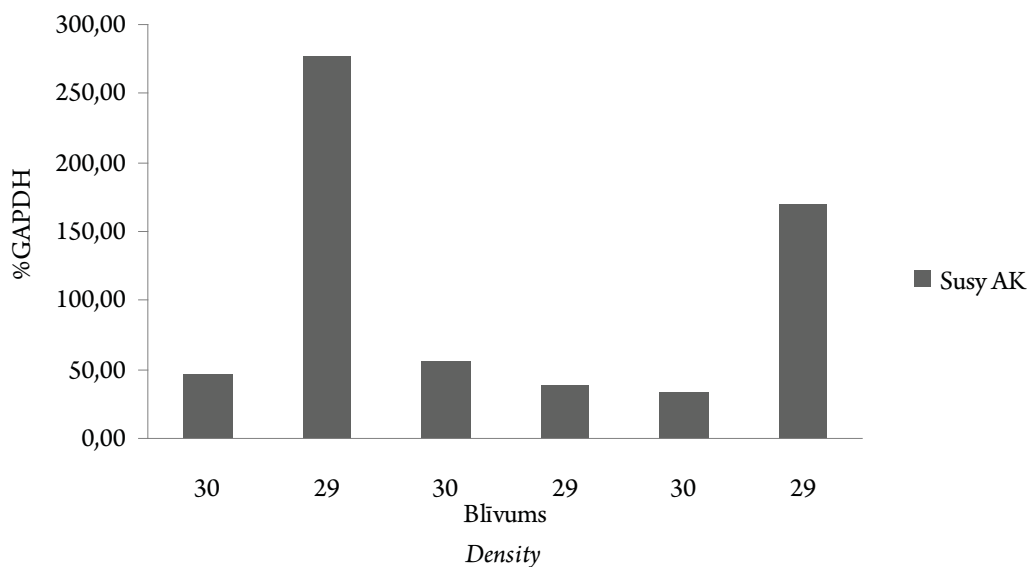
ekspresija izteikta procentos no gēna *GAPDH* ekspresijas / *formation as % of GAPDH expression*;

* apzīmē ģēnus, kuru ekspresijai ir būtiska korelācija ar koksnes relatīvo blīvumu kādā no sezonām / *genes with significant correlation between wood density and gene expression in one of seasons.*



1. attēls. Gēna *Aqual* ekspresija agrīnās koksnes veidošanās laikā izvēlētajās brīvapputes ģimenēs.

Figure 1. *Aqual* gene expression during early wood formation in open pollinated families.



2. attēls. Saharozes sintāzes gēna *Susy* ekspresijas variācija agrīnās koksnes veidošanās laikā Mis 34 ģimenē.

Figure 2. Gene expression variation of the sucrose synthase gene *Susy* during early wood formation in the Mis 34 family.

Secinājumi

Būtiskas gēnu ekspresijas atšķirības starp agrinās un vēlinās koksnes veidošanās periodiem konstatētas gēniem *Aqual*, *Susy* un *CAD*, bet lignīna biosintēzē iesaistītajiem gēniem *PAL* un *CCR* šī atšķirība statistiski nav būtiska.

Atšķirīgos gadalaikos vairāku kandidātģēnu vidējā ekspresija dažādās parastās priedes brīvapputes ģimenēs var atšķirties pat astoņas reizes.

Korelācija starp kandidātģēnu vidējo ekspresiju ģimenēs un relatīvo koksnes blīvumu konstatēta gēnam *Aqual* agrinās koksnes veidošanās laikā ($r = -0,55$) un gēnam *CCR* vēlinās koksnes veidošanās laikā ($r = 0,58$), tomēr, augstās gēnu ekspresijas variāciju dēļ ģimeņu ietvaros, tā ir vāja.

Noskaidrots, ka pastāv sakarības starp kandidātģēnu ekspresiju un relatīvo koksnes blīvumu dažādām parastās priedes brīvapputes ģimenēm, kas augušas dabiskos apstākļos. Tomēr, ņemot vērā lielo gēnu ekspresijas varietāti ģimeņu ietvaros, vēlams analizēt lielāku indivīdu skaitu no brīvapputes ģimenēm vai kontrolētu krustojumu pēcnācējiem.

Ģenētiskā daudzveidība ģimenes ietvaros būtiski ietekmē koksnes veidošanos un šī ģenētiskā daudzveidība, kas varētu būt potenciāls turpmāko pētījumu objekts.

Pateicība: pētījums veikts ESF projekta Nr. 2009/0200/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/146 „Ģenētisko faktoru nozīme adaptēties spējīgu un pēc koksnes īpašībām kvalitatīvu mežaudžu izveidē” ietvaros.

Literatūra

- Amor, Y., Haigler, C. H., Johnson, S., Wainscott, M., Delmer, D. P.** (1995). A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9353-9357.
- Bagal, U. R., Leebens-Mack, J. H., Lorenz, W. W., Dean, F. D. J.** (2012). The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm-specific lineage. *BMC Genomics*, 13(Suppl 3): S1.
- Bate, N., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassa, T., Doerner, P. W., Dixon, R. A., Lamb, C. J., Elkind, Y.** (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7608-7612.
- Baucher, M., Chabbert, B., Pilate, G., Van Doorselaere, J., Tollier, M. T.** (1996). Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar (*Populus tremula* × *P. alba*). *Plant Physiol.* 112: 1479-1490.
- Baud, S., Vaultier, M. N., Rochat, C.** (2004). Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 55: 397-409.

- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M.** (2003). Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54: 519-546.
- Butland, S. L., Chow, M. L., Ellis, B. E.** (1998). A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures *Plant Mol. Biol* 37: 15-24.
- Campbell, M. M., Ellis, B. E.** (1992). Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures. 1. Induction of phenylpropanoid metabolism. *Planta* 186: 409-417.
- Campbell, M. M., Sederoff, R. R.** (1996). Variation in lignin content and composition, mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants. *Plant Physiol* 110: 3-13.
- Cato, S., McMillan, L., Donaldson, L., Richardson, T., Echt, C., Gardner, R.** (2006). Wood formation from the base to the crown in *Pinus radiata*: Gradients of tracheid wall thickness, wood density, radial growth rate and gene expression. *Plant Molecular Biology* 60: 565-581.
- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J.** (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11, 113-116.
- Creber, G. T., Chaloner, W. G.** (1984). Influence of environmental factors on the wood structure of living and fossil trees. *Bot. Rev.* 50: 357-448.
- Dillon, S. K., Nolan, M., Li, W., Bell, C., Wu, H., Southerton, S. G.** (2010). Allelic variation in cell wall candidate genes affecting solid wood properties in natural populations and land races of *Pinus radiata*. *Genetics*, 185: 1477-1487.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Redd, M. S. S., Wang, L.** (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3: 371-390.
- Dvornyk, V., Sirvio, A., Mikkonen, M., Savolainen, O.** (2002). Low nucleotide diversity at the PAL1 locus in the widely distributed *Pinus sylvestris*. *Mol. Biol. Evol.* 19: 179-188.
- Gibson, G.** (2008). The environmental contribution to gene expression profiles. *Nature Rev. Genet.* 9: 575-581.
- Hannrup, B., Wilhelmsson, L., Danell, O.** (1998). Time trends for genetic parameters of wood density and growth traits in *Pinus sylvestris* L. *Silvae Genetica* 47, 4: 214-219.
- Hansen, C. P.** (2000). Application of the Pilodyn in Forest Tree Improvement. DFSC Series of Technical Notes. TN55. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark, pp. 1-11.
- Johansson, I., Karlsson, M., Johanson, U., Larsson, C., Kjellbom, P.** (2000). The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 324-342.
- Kalniņš, A.** (1930). Latvijas priedes (*Pinus sylvestris* L.) tehniskās īpašības. Latvijas mežzinātniskie raksti, 133.-136. lpp.
- Kien, N. D., Jansson, G., Harwood, C., Almqvist, C., Thinh, H. H.** (2008). Genetic variation in wood basic density and pilodyn penetration and their relationships with growth, stem straightness, and branch size for *Eucalyptus urophylla* in Northern Vietnam. *New*

- Zeal J ForSci 38: 160-174.
- Lev-Yadun, S., Sederoff, R.** (2000). Pines as model gymnosperms to study evolution, wood formation and perennial growth. *J Plant Growth Regul.* 19: 290-305.
- Li, X., Wu, H. X., Dillon, S., Southerton, S. G.** (2009), Generation and analysis of expressed sequence tags from six developing xylem libraries in *Pinus radiata* D. Don. *BMC Genomics* 10: 41.
- Li, X., Wu, H. X., Southerton, G. S.** (2010). Seasonal reorganization of the xylem transcriptome at different tree ages reveals novel insights into wood formation in *Pinus radiata*. *New Phytologist*, 187: 764-776.
- Li, X. G., Wu, H. X., Southerton, S. G.** (2011a). Transcriptome profiling of wood maturation in *Pinus radiata* identifies differentially expressed genes with implications in juvenile and mature wood variation. *Gene*, 487(1): 62-71.
- Li, X. G., Wu, H. X., Southerton, S. G.** (2011b). Transcriptome profiling of *Pinus radiata* juvenile wood with contrasting stiffness identifies putative candidate genes involved in microfibril orientation and cell wall mechanics. *BMC Genomics*, 12: 480.
- Li, X. G., Wu, H. X., Southerton, S. G.** (2012). Identification of putative candidate genes for juvenile wood density in *Pinus radiata*. *Tree physiology* 32: 1046-1057.
- MacKay, J. J., O'Malley, D. M., Presell, T., Booker, F. L., Campbell, M. M., Whetten, R. W., Sederoff, R. R.** (1997). Inheritance, gene expression, and lignin characterization in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8255-8260.
- Martin, T., Frommer, W. B., Salanoubat, M., Willmitzer, L.** (1993). Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *Plant J.* 4: 367-77.
- Nairn, C. J., Lennon, D. M.** (2008). Carbohydrate-related genes and cell wall biosynthesis in vascular tissues of loblolly pine (*Pinus taeda*). *Tree Physiol* 28: 1099-1110.
- Nicolov, N., Helmisaari, H.** (1992). Silvics of the circumpolar boreal forest tree species. In: A systems analysis of the global boreal forest, eds Shugart, H., Leemans, R. & Bowan, G. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 13-84.
- O'Malley, D. M., Porter, S., Sederoff, R. R.** (1992). Purification, characterization, and cloning of cinnamyl alcohol dehydrogenase in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Plant Physiol.* 98: 1364-1371.
- Palle, S., Seeve, C., Eckert, A., Cumbie, W., Goldfarb, B., Loopstra, C.** (2010). Natural variation in expression of genes involved in xylem development in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Genetics and Genomes* 7(1): 193-206.
- Plomion, C., Leprovost, G., Stokes, A.** (2001). Wood formation in trees. *Plant Physiol.* 127: 1513-1523.
- Pina, J. A. R., Perez, O. Z.** (2011). Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14.

URL – <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v14n5-10/1362>.

- Šķēle, K., Alksne, A., Cīrule, D., Hrols, J. (2002). Parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) koksnes anatomiskā uzbūve un fizikālās īpašības Latvijā. LLU Raksti 5, 68.-74. lpp.
- Šķipars, V., Krivmane, B., Ruņģis, D. (2011). Thaumatin-like protein gene copy number variation in Scots pine (*Pinus sylvestris*). Environmental and Experimental Biology 9: 75-81.
- Valsts meža dienesta dati (2012). URL – <http://www.vmd.gov.lv/?sadala=2> [izdrukāts 2012. gada 14. martā].
- Uggla, C., Magel, E., Moritz, T., Sundberg, B. (2001). Function and dynamics of auxin and carbohydrates during early wood/late wood transition in Scots pine. Plant Physiol 125: 2029-2039.
- Ukrainetz, N. K., Kang, K. Y., Aitken, S. N., Stoehr, M., Mansfield, S. D. (2008). Heritability and phenotypic and genetic correlations of coastal Douglas-fir (*Pseudotsugamenziesii*) wood quality traits. Canadian Journal of Forest Research – Revue Canadienne De Recherche Forestiere 38: 1536-1546.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. Plant Physiology Preview. URL – <http://www.plantphysiol.org/content/153/3/895.full>.
- Whetten, R., Sederoff, R. R. (1992). Phenylalanine ammonialyase from loblolly pine: Purification of the enzyme and isolation of complementary DNA clones. Plant Physiol. 98: 380-386.
- Whetten, R., Sederoff, R. R. (1995). Lignin biosynthesis. Plant Cell 7: 1001-1013.
- Whetten, R., Sun, Y. H., Zhang, Y., Sederoff, R. (2001). Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine. Plant MolBiol 47: 275-291.
- Yu, Q., Li, B., Nelson, C. D., McKeand, S. E., Batista, V. B., Mullin, T. J. (2006). Association of the cad-n1 allele with increased stem growth and wood density in full-sib families of loblolly pine. Tree Genetics & Genomes 2: 98-108.
- Yu, Q., McKeand, S. E., Nelson, C. D., Li, B., Sherrill, J. R., Mullin, T. J. (2005). Differences in wood density and growth of fertilized and nonfertilized loblolly pine associated with a mutant gene, cad-n1. Can. J. For. Res. 35:1723-1730.