

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

**Pusgada populārzinātnisks pārskats (1.03.2019.-30.08.2019.) par projekta īstenošanas gaitu
“Transponējamo elementu variāciju izpēte parastās priedes (*Pinus sylvestris* L.) gēnu rajonos”**

Ceturta pusgada laikā iepriekš izveidotie molekulārie marķieri tika pārbaudīti uz parastās priedes DNS paraugiem. DNS paraugi tika ievākti pluskoku priežu sēklu plantācijā (96 paraugu) un iepriekš pētītajā populācijā (150 paraugu), kur mežs atjaunojās dabīgi. Selekcijā izmantotās priedes ar zināmu izcelsmi no dažādām Latvijas vietām tika atlasītas pamatojoties uz mūsu institūtā iepriekš veiktajiem pētījumiem par izturību pret skujbiri (Jansons *et al.* 2008). Dabīgi atjaunojusies audze tika iepriekš pētīta saistībā ar abiotisko faktoru (ūdens režīma) ietekmi uz retrotranspozonu izplatību priedes genomā (Voronova&Rungis, 2014; Voronova *et al.* 2017). Tāpat, iepriekš tika atrasta somaklonālā variācija retrotranspozonu sekvencēs veģetatīvi pavairotiem pluskokiem augošajiem dažādās plantācijās. Tādā veidā būs iespējams salīdzināt transponējamo elementu atrastos polimorfismu frekvenci grupējot paraugus dažādos veidos: dabīgi atjaunojusies audze/ selekcijā izmantoti augi; augi ar paaugstinātu/samazinātu rezistenci pret skujbiri; pielāgošanās mikroklimatiskiem apstākļiem.

DNS paraugi tika izdalīti ar mūsu laboratorijā iepriekš optimizētām metodēm, paraugi tika kvantitēti un atšķaidīti. Katram praimeru pārim tika veikta gradienta PCR, kas palīdz optimizēt reakciju tā, lai amplificējas pēc iespējas specifiskāki fragmenti sagaidāmā garumā. Kopumā pārbaudīja 40 potenciālus marķierus gēnu tīklam, kas iespējams satur atrasto retrotranspozonu gēnu 5' un 3' flankējošā sekvencē attāluma līdz 1kB. Papildus, pārbaudīja otru atrasto *NPR* gēnu tīklu, kur transponējams elements atrodas gēnu intronos (ap 24 marķieriem), jo bioinformātiski atrastās atšķirības starp divām references genoma versijām ir ievērojamas. Gradienta PCR rezultātus analizēja ar elektroforēzi agarozes gēlā. Reakcijas, kuras bija nespecifiskas tika atkārtotas izmēģinot reaģentu optimizācijas iespējas. Transponējamā elementa praimera nespecifiskās amplifikācijas novēršanai tika piemeklēta praimeru pāru attiecība, kur gēnā esošs praimeris dominē. Taču tika izmantota arī papildus kontrole, kas palīdz pārliecināties par amplificēto produktu neesamību analizējamos paraugos, vai arī garmu atšķirību gadījumos, kad nespecifisku amplifikāciju nevar novērst.

Marķieri, kuru produkti bija specifiski, tika izmantoti priežu populāciju analīzēm (246 paraugiem). Priežu populācijas paraugus analizēja ar kapilāro gēlelektroforēzi izmantojot *LabChip GX* iekārtu (*PerkinElmer*), kas ir sensitīvāka un paātrina liela paraugu skaita analīzes. Analīzē tika iekļautas dažādas kontroles: *Pinus taeda* references genoma DNS paraugs; 4 reakcijas tikai ar transponējamā elementā noenkurotu praimeri (kas var amplificēt nespecifiskus produktus izplatības un dažādu virzienu pozīciju rezultātā); kā arī 2 negatīvās kontroles bez DNS parauga un 2 negatīvās kontroles bez PCR produkta kapilārās gēlelektroforēzes čipa tīrības kontrolei. Priedes genoms atšķiras kā ar transponējamo elementu izplatību, tā arī ar gēnu kopiju variāciju un skaitu un gēnu intronu garmu. Tāpēc vairākos gadījumos arī ļoti specifiski apstākļi nenovērsa vairāku fragmentu



amplifikāciju. Informācija par identificētiem fragmenti tika apkopota tabulā un to frekvences tika aprēķinātas. Rezultātā identificēja fragmentus, kuru izplatība statistiski būtiski atšķiras analizējamās paraugu kopās. Darba turpinājumā tiks noskaidrota šo fragmentu DNS sekvenca.

Sagatavota, iesniegta un apstiprināta projekta vidusposma atskaite. Sagatavošanas procesā veikta projekta izpildes risku apzināšana, pētnieciskā projekta pārplānošana, metodiku pielāgošanas iespējas. Literatūras izpēte saistībā ar alternatīvo metožu meklējumiem. Piedalījās jaunās aparatūras apgūšanas treniņos mūsu laboratorijā, jo šī aparatūra ir alternatīva projekta sākumā plānotajām metodēm. Dalība Eiropas dienās akcijā "Atpakaļ uz skolu 2019". Sagatavots radoši reprezentatīvi izdales materiāli. Uzstājos ar referātu par pētnieces profesiju un manu pētījumu skolas aktu zālē. Pasākumā piedalījās 10. -12. klašu skolnieki.

No 2019. gada 12. maija līdz 15. maijam piedalījās zinātniskajās debatēs par tēmu "Transpozonu un gēnu regulācijas krustpunkti" (*Crossroads between transposons and gene regulation*), kas notika Londonā (Lielbritānija). 13. maijā piedalījās posteru sesijā un prezentēju šī pētījuma rezultātus: "Investigation of TE enrichment of gene introns and flanking regions in the conifer reference genomes". Autori: Angelika Voronova, Martha Rendon, Par Ingvarsson, Dainis Ruņģis. Sagatavota komandējuma atskaite.

29.04.2019. Publicēts zinātnisks raksts: Voronova, A., 2019. Retrotransposon expression in response to *in vitro* inoculation with two fungal pathogens of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). BMC Research Notes 12: 243.

Salaspilī, 2019.gada 15. septembrī,

Pārskatu sagatavoja:



/Dr.Biol. Angelika Voronova/

Literatūras saraksts:

Jansons A, Neimane U, Baumanis I. Needlecast resistance of Scots pine and possibilities of its improvement. Mezzinatne. 2008;18(51):3-18.

Voronova A, Rungis D. (2014) Development and characterisation 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(6): 485-492.

Voronova A, Belevich V, Korica A, Rungis D. Retrotransposon distribution and copy number variation in gymnosperm genomes. Tree Genet Genomes. 2017;13(4):88.