

## ZADANIE 43

# POSZUKIWANIE REGIONÓW DNA SPRZĘŻONYCH Z WAŻNYMI CECHAMI UŻYTKOWYMI (BEZKOLCOWOŚĆ, WIELKOŚĆ OWOCÓW, ZAWARTOŚĆ W OWOCACH EKSTRAKTU I KWASU ASKORBINOWEGO) U MALINY WŁAŚCIWEJ (*RUBUS IDAEUS* L.) POPRAZECZ ANALIZĘ TRANSKRYPTOMÓW

**OKRES REALIZACJI BADAŃ: 2024**

**KIEROWNIK ZADANIA:**

dr Anita Kuras

e-mail: [anita.kuras@inhort.pl](mailto:anita.kuras@inhort.pl)

### ZESPÓŁ WYKONAWCÓW:

dr hab. Agnieszka Masny, dr hab. Stanisław Pluta, dr Marek Szymajda,  
dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, dr Mariusz Lewandowski,  
dr Łukasz Seliga, dr Michał Oskiera, mgr Jolanta Kubik,  
mgr Bogusława Idczak, mgr Agnieszka Walencik, mgr Renata Czarnecka,  
Piotr Skręta, Krystyna Strączyńska, Krzysztof Pęzik, Marzena Śnieguła,  
Katarzyna Skrzeczkowska

**Instytut Ogrodnictwa –  
Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3  
96-100 Skierniewice**

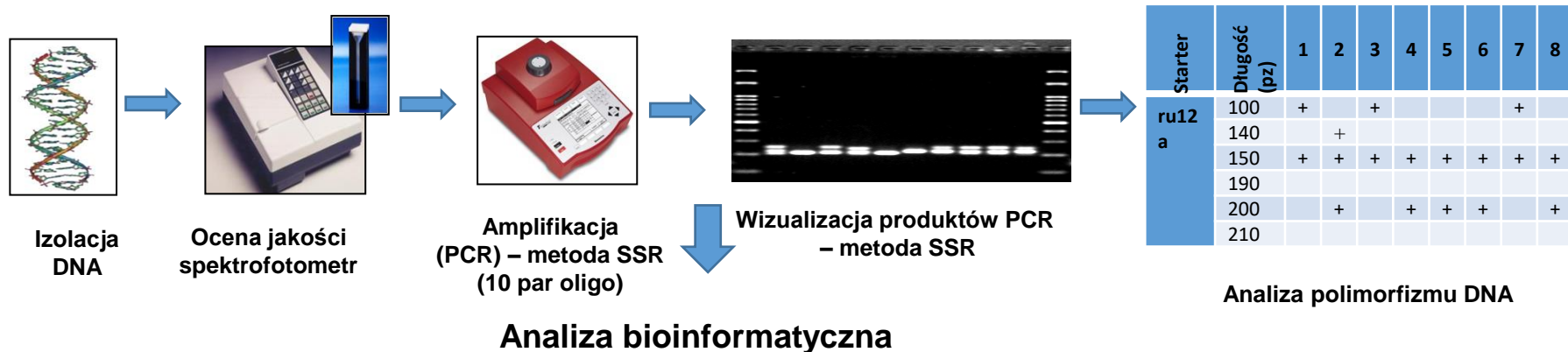


# CELE PROJEKTU

1. Ocena mieszańców populacji segregującej uzyskanej w wyniku krzyżowania dwóch zróżnicowanych genetycznie genotypów maliny (odmiany 'Heritage' i klonu M-258), pod względem wybranych cech fenotypowych, jak: kolczastość pędów (uwzględniająca ilość i „agresywność” kolców), sposób owocowania (letnie, jesienne, dwukrotne), wielkość owoców, zawartość w owocach ekstraktu i kwasu askorbinowego. **(temat badawczy 1)**
2. Wytypowanie i weryfikacja metodą RT-qPCR, genów o zróżnicowanej ekspresji, zgromadzonych w bazie sekwencyjnej uzyskanej w wyniku sekwencjonowania transkryptomu *Rubus idaeus* (sezony 2021 i 2022) oraz potencjalnie sprzężonych z cechami bezkolcowości/kolcowości pędów i jakości owoców. **(temat badawczy 2)**
3. Ocena polimorfizmu DNA roślin mieszańcowych pokolenia F<sub>1</sub>, należących do populacji: 'Heritage' × M-258 w regionie genomu warunkującego jakość owoców. **(temat badawczy 3)**

# MATERIAŁY I METODY

- Badaniom poddane zostały rosnące w doświadczeniu polowym siewki populacji segregującej ‘Heritage’ × M-258, odznaczającej się wysokim udziałem potomstwa charakteryzującego się brakiem lub małą „agresywnością” kolców, a także rośliny obu genotypów rodzicielskich.
- Wykonano indywidualną ocenę instrumentalną lub bonitacyjną wszystkich siewek i ich form rodzicielskich.
- Oceniono sposób owocowania siewek i wielkość owoców, kolcowość pędów oraz zawartość ekstraktu i kwasu askorbinowego w owocach po ich ok. 3 miesięcznym przechowywaniu w stanie zamrożonym.
- Analiza polimorfizmu DNA.



- Wygenerowane amplikony poddano analizie bioinformatycznej pod kątem oceny stopnia ich powinowactwa genetycznego. Obecność lub brak polimorficznych fragmentów DNA była podstawą do określenia pokrewieństwa genetycznego badanych genotypów maliny.
- Dystans genetyczny określono na podstawie analizy kodów binarnych 0/1, gdzie „0” oznaczał brak fragmentu DNA o określonej długości, a „1” - jego obecność (metoda Jaccarda). Dendrogram obrazujący pokrewieństwo badanych genotypów skonstruowano stosując metodę UPGMA.
- Przeprowadzono analizę głównych składowych PCA (metoda Pirsona).

**MATERIAŁ DO BADAŃ WALIDACYJNYCH (NGS vs. RT-QPCR)** - odmiany wzorcowe 'Sokolica' i M-258 (łodygi kocowe i bez kolców, owoce niedojrzałe i dojrzałe).

**MATERIAŁ DO WERYFIKACJI PRZYDATNOŚCI GENÓW** – (próbki łodyg z kolcami i bez, owoce niedojrzałe i dojrzałe) 10 wyselekcjonowanych siewek (różne pod względem badanych cech) z populacji ,Heritage' x M-258



**Izolacja RNA**

**Zestaw Qiagen /lub metoda Zeng&Yang 2000**

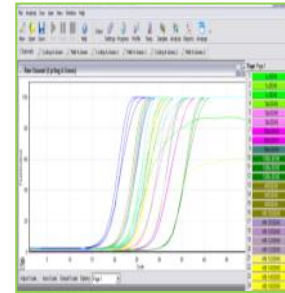


**Optymalizacja RT-qPCR,**  
gen ref. Ru18

F: ACGTCATCCTCCGGCAAAGC

R: ACGACGAAGCTCGCAAGTACAC

**Profil termiczny:** 95°C/30s;  
60°C/20s;  
72°C/20s (40x)



**Wytypowano 15 genów o rozpoznanej funkcji (A) i o zróżnicowanej ekspresji w porównywanych próbach roślinnych (NGS – 2021-2022) (do testów RT-qPCR zaprojektowano oligonukleotydy (B) (Primer3PRO))**

CECHA	IDR GENU	FUNKCJA
<b>kolcowość</b>	Ro04_G00062	Ribonukleaze I
	Ro04_G36126	Glutathione S-transferase U18
	Ro04_G06366	Acyl carrier protein 1, chloroplastic
	Ro02_G03106	F-box/FBD/LRR-repeat protein
	Ro03_G31839	Protein DETOXIFICATION 30
	Ro01_G18291	Endoglucanase 13
	Ro02_G02344	Dihydroflavonol 4-reductase
	Ro02_G20701	Putative laccase-1
	Ro03_G10620	Transcription repressor OFP17
	Ro07_G06503	Peroxidase 66
	Ro02_G04086	Probable inactive patatin-like protein 9
	Ro04_G36746	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic
	Ro02_G12616	Putative laccase-1
	Ro04_G04810	Cellulose synthase A catalytic subunit 7
	<b>A</b>	Ro01_G07665

NAZWA	SEKWENCJA 5'	SEKWENCJA 3'
RO04_G00062F	ATGCAAGAAGAATGGCCAAC	CTTGATGTTCCGCGGGTAT
RO04_G36125F	GAGCCAGTAGTTGTGCCTCAC	GAAGCCTCTAGCGTGGAGAA
RO04_G06356F	GCCAAACCAGAGACTCTCAAC	TGTCAGAGAGTCAGCTCCAAG
RO04_G36746F	CCGTTATTCGACGTTGGACT	AGCCAGATCACCCATGAAAC
RO04_G04810F	GAAGGAGTGACGGGCATGT	TGCGTTCTCATCCTCAGTTG
RO02_G02344F	GTTGCGAAATTGCTACGTGA	GATATGGACCGCATTGGTCT
RO01_G18291F	CATGGTAGCAGCAAAGCTGA	TCAAAGGCCTGCTTGATCTT
RO03_G31839F	CAACCAAACGTGCAATGTTC	AAGGCCTGCTTGATCTTTGA
RO01_G07665F	ACAGGAACATGGACGAGGAC	ATGTGCCTGGCTTCTCCTTA
RO02_G04086F	AGGCCTTTGGATTGGCTAGT	ATCCTTGACGGACTAGGTG
RO02_G12616F	GCTTCTGCTTGAAACCAACC	CCTTTGTGAGCCGTAATGGT
RO03_G10620F	GCAGCGGTCAAGAGTTTCTC	ACATCCGTCAAGTCCCTCAC
RO07_G09503F	CAAGCGATTAGTGGGAGGAA	CACTCGGCAATTCAGTCTCA
RO02_G20701F	GATGAGGAAGGAACGCTTTG	GAGCGAGGAGTGTCAGAACC
RO02_G03105F	CAACTCTGCCTGGCTACTCC	CCCCGGTGAATCTGAAATG

## **Temat badawczy 1: Indywidualna ocena cech fenotypowych roślin mieszańców maliny, należących do populacji segregującej wytypowanej do badań (około 100 pojedynków)**

- Wykazano duże zróżnicowanie badanych 102 genotypów należących do populacji segregującej 'Heritage' x M-258 pod względem: obecności i „agresywności” kolców na pędach i wielkości owoców.
- 46 genotypów zaklasyfikowano do grupy „jesiennych”, a więc owocujących na jednorocznych pędach.
- 19 genotypów odznaczało się owocowaniem na wierzchołkach bardzo wysokich, jednorocznych pędów, co pozwoliło zakwalifikować je do tzw. „dwupiętrowych”.
- 37 genotypów włączono do grupy „letnich”, owocujących na dwuletnich pędach.
- Stwierdzono, że 29 siewek wytworzyło owoce o wyższej masie jednostkowej od owoców obu form rodzicielskich. Owoce o największej masie (powyżej 5,0 g) posiadało 16 roślin.
- W rodzinie mieszańców uzyskanej z krzyżowania 'Heritage' x M-258:
  - spośród 102 siewek, bezkolcowe pędy w części środkowej i górnej tworzyło 41 roślin (40,2% badanej populacji segregującej);
  - 5 roślin (4,9% populacji) posiadało małe i delikatne kolce na pędach;
  - jedynie 11 siewek (10,8% populacji) charakteryzowało się ostrymi, „agresywnymi” kolcami.
- W żadnej z badanych populacji siewek nie stwierdzono roślin o bardzo silnych i agresywnych kolcach, które należałoby zaliczyć do 4 klasy kolcowości.
- Zawartość kwasu askorbinowego w owocach siewek populacji 'Heritage' x M-258, wynosiła od 25 mg/100 g do 45,5 mg/100 g świeżej masy owocu. Większą zawartością kwasu askorbinowego, w porównaniu do obu odmian rodzicielskich, odznaczały się owoce 35 siewek.



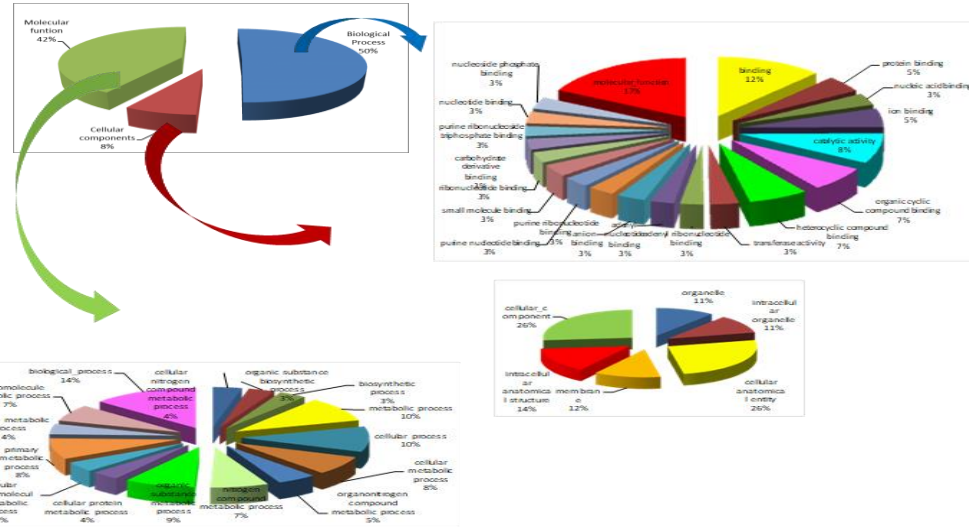
# Temat badawczy 2: Wytypowanie i weryfikacja metodą RT-qPCR, genów o zróżnicowanej ekspresji, zgromadzonych w bazie sekwencyjnej *Rubus idaeus*

## Analiza NGS (porównanie 'Sokolica' vs. M-258) oraz analiza funkcjonalna (GO enrichment)

bezkolcowość pędów maliny, 265 775 DEG's

Adnotacja funkcjonalna genów:  
GO enrichment

procesy biologiczne - 135 268 DEG's,  
czynniki molekularne - 109 143 DEG's, składniki komórkowe - 21 364 DEG's.



## Walidacja typu regulacji wytypowanych DEG's

## Cecha kolcowości pędów (15 genów)

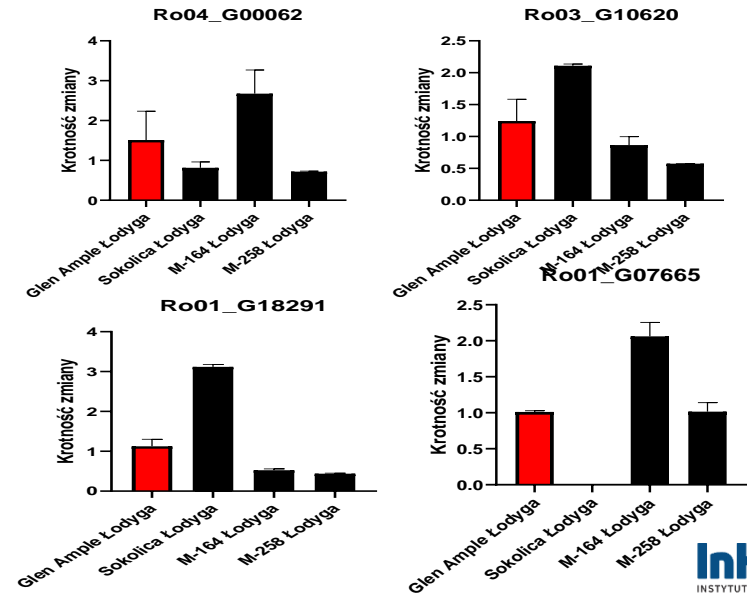
Dla genów, o rozpoznanych identyfikatorach:

Ro04\_G00062, Ro04\_G36126, Ro04\_G06366, Ro02\_G03106, Ro03\_G31839, Ro01\_G18291, Ro02\_G02344, Ro02\_G20701, Ro03\_G10620, Ro07\_G06503, Ro02\_G04086, Ro02\_G12616

➤ nadekspresja w eksperymencie RNA-seq i testach RT-qPCR w próbach odmiany 'Sokolica', która posiada pędy o agresywnych kolcach

Odmienny typ regulacji w obu testach dla genów o identyfikatorach Ro04\_G36746, Ro04\_G04810 i Ro01\_G07665

## Przykładowe profile ekspresji DEG's (QPCR)



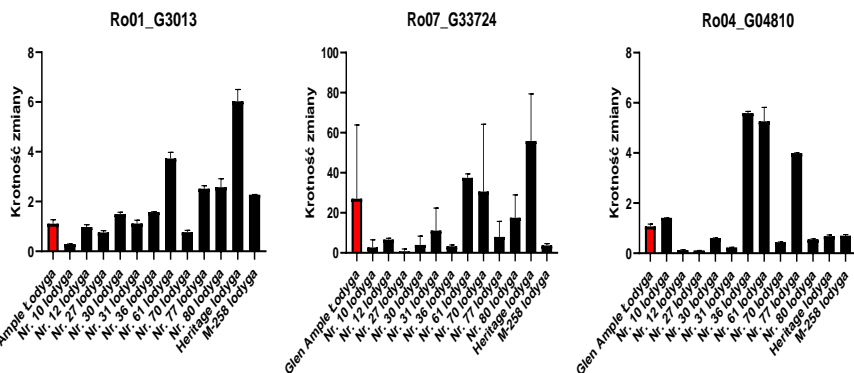
# Temat badawczy 2 cd. Ocena profili ekspresji wyłonionych genów w genomach roślin mieszańcowych populacji segregującej ,Heritage' x M-258

## Testy walidacyjne przeprowadzone dla prób cDNA wyizolowanych z łodyg (kolcowe, bezkolcowe) oraz owoców (niedojrzałe i dojrzałe) 10 genotypów mieszańcowych ,Heritage' x M-258

Ocena poziomu ekspresji wyłonionych genów, związanych z regulacją cechy kolcowości pędów

Wyniki normalizowano względem próby kontrolnej odmiany 'Glen Ample' (wytwarza pędy bez kolców)

### Przykładowe profile ekspresji wytypowanych genów



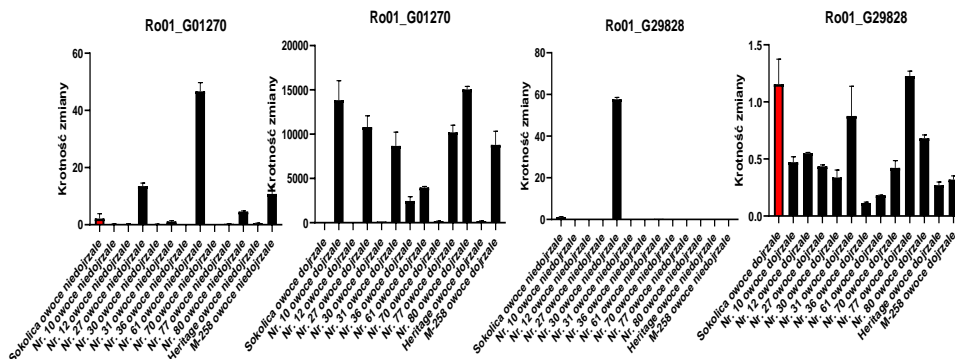
Istotna korelacja aktywności z cechą kolcowości pędów maliny ośmiu genów:

- Ro07\_G33724** (białko E3 ubikwityny/ ligazy listerinowej),
- Ro03\_G19195** (białko 6 transportujące jony miedzi),
- Ro01\_G3013** (nieznana funkcja),
- Ro02\_G20701** (białko lakazy 1),
- Ro02\_G02344** (reduktaza 4 Dihydroflawonolu), **Ro03\_G10620** (białko represorowe transkrypcji OFP17), **Ro04\_G06366** (białko nośnikowe akrylu w chloroplastach), **Ro04\_G04810** (podjed. katalityczna syntazy celulozy A).

Ocena poziomu ekspresji wybranych genów, sprzężonych z cechami jakości owoców

Wyniki normalizowano względem próby kontrolnej odmiany 'Sokolica' (wytwarza wysokiej jakości smaczne i duże owoce)

### Przykładowe profile ekspresji wytypowanych genów

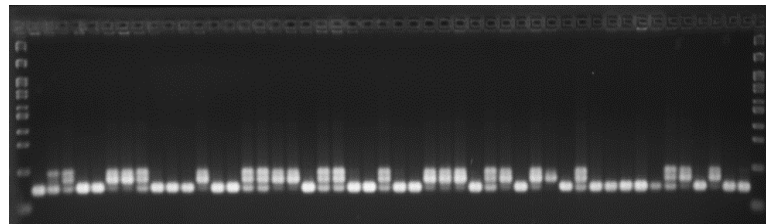


Istotna korelacja z cechami jakości i dojrzewania owoców siedmiu genów:

- Ro02\_G35794** (białko syntazy kofeiny 3, domena FLD),
- Ro06\_G24318** (czynn timer elongacji translacji),
- Ro07\_G04376** (syntaza 1-metylocyklopropanu-1-karboksylazy (1-MCP),
- Ro01\_G29828** (białko UDP-glukozytransferazy uczestniczące w transporcie cukrów),
- Ro05\_G30898** (koduje alfa-galakturonidazę),
- Ro04\_G36399** (funkcja nieznana),
- Ro01\_G01270** (funkcja nieznana).

## Temat badawczy 3: Ocena polimorfizmu DNA roślin mieszańcowych pokolenia F<sub>1</sub>, należących do populacji segregującej wytypowanej do badań

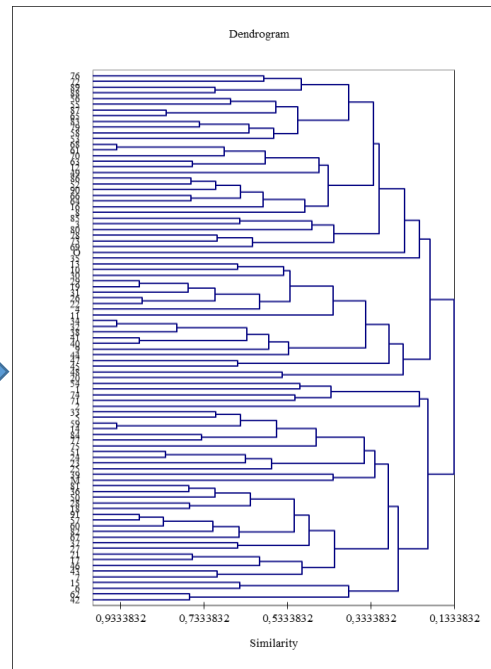
Łącznie przeprowadzono 5 580 reakcji amplifikacji na matrycach DNA wydzielonych z 91 roślin maliny należących do populacji 'Heritage' × M-258. W reakcji amplifikacji z wytypowanymi parami starterów uzyskano 48 polimorficznych amplikonów, rozróżniających formy rodzicielskie. Długość polimorficznych fragmentów DNA charakteryzujących testowane genotypy maliny wahała się od 140 do 290 pz (tab. 3). Pokrewieństwo badanych genotypów maliny z populacji 'Heritage' × M-258, określone w oparciu o dane wygenerowane metodą SSR, kształtowało się na poziomie 13-90% (ryc. 1). przeprowadzono 600 reakcji z 10 parami oligonukleotydów, uzyskano 52 polimorficzne amplikony o długości od 140 do 700 pz. W reakcji z oligonukleotydami: Rubus25a, Rubus166b, Rubus210a, RiM015 i Rubus222e, obserwowano fragmenty DNA o długości odpowiednio 150 i 160, 130, 110, 360 i 240 pz najprawdopodobniej skorelowane z wielkością owoców.



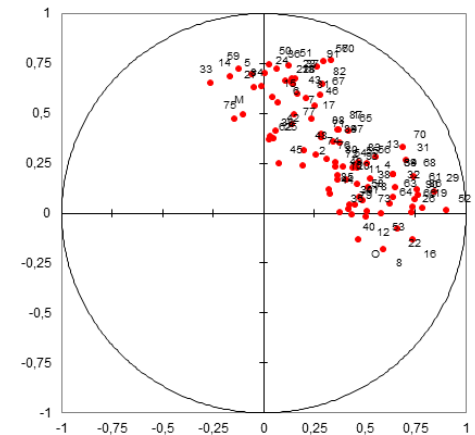
Przykładowy elektroforegram produktów amplifikacji metodą SSR na matrycach DNA z roślin maliny z testowanymi oligonukleotydem: rubusr19a

STARTER	DŁUGOŚĆ (p.z)	1	2	3	4	5	6	7	8
Rubusr 19a	200	+	+	+	+	+	+	+	+
	240	+	+	+	+	+			
Rubusr 35a	210	+	+	+	+	+			+
	220						+	+	
	280		+						
	290			+		+			+

Fragment tabeli z polimorficznymi amplikonami (metoda SSR z 10 parami oligonukleotydów)



Dendrogram obrazujący pokrewieństwo roślin populacji segregującej



(Analiza PCA obrazująca pokrewieństwo roślin należących do populacji: 'Heritage' × M-258, opracowany zgodnie z metodą Pirsona.




# WNIOSKI

- ✓ Uzyskanie genotypów o dużych, bogatych w ekstrakt i kwas askorbinowy owocach oraz bezkolcowych pędach metodą tradycyjnej hodowli krzyżówkowej jest możliwe, jednak ich liczebność w populacji siewek w znacznym stopniu zależy od właściwego doboru form rodzicielskich do programów krzyżowań.
- ✓ Wyłonione geny nie wykazały jednoznacznie stabilnej aktywności w badanych próbach, pochodzących z roślin zarówno kolcowych, jak i bezkolcowych.
- ✓ Sześć genów o znanej adnotacji wykazało potencjalny związek z regulacją badanych cech maliny właściwej *Rubus idaeus* tj: Ro01\_G01270, Ro04\_G36399, Ro01\_G29828 i Ro07\_G04376 skorelowanych z jakością owoców maliny oraz Ro02\_G20701 i Ro03\_G10620 -z wytwarzaniem kolcowych pędów.
- ✓ W wyniku przeprowadzonej oceny polimorfizmu DNA roślin mieszańcowych populacji F<sub>1</sub> 'Heritage' × M-258 w regionie genomu warunkującego jakość owoców, nie potwierdzono skuteczności testowanych markerów do selekcji genotypów maliny pod względem badanej cechy, istnieje zatem konieczność kontynuacji badań.


# PREZENTACJA WYNIKÓW BADAŃ NA KONFERENCJI

Poster prezentacji podczas Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej pt. „Innowacyjne Ogrodnictwo źródłem produktów wysokiej jakości”, Lublin, 4-6 czerwca 2024 r., Streszczenia, s. 69.



## ANALIZA TRANSKRYPTÓW GENÓW DLA OKREŚLENIA FUNKCYJNALNYCH MARKERÓW MOLEKULARNYCH CECHY BEZKOLCOWOŚCI PĘDÓW MAŁINY WŁAŚCIWEJ (*RUBUS IDAEUS*)

Sylvia Keller-Przybyłkiewicz, Anita Kuras, Agnieszka Walencik  
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Konstytucji 3-go Maja 1/3, 96-100 Skierniewice



**WSTĘP**

Malina jest gatunkiem powszechnie uprawianym w wielu krajach świata, w tym również w Polsce i oceniany głównie ze względu na zdrowe i smaczne owoce, przydatne do konsumpcji w stanie świeżym, jak i przetwarzany na soki, przetworzone produkty i inne gatunki. Malina jest uprawiana w wielu krajach świata, w tym również w Polsce i oceniany głównie ze względu na zdrowe i smaczne owoce, przydatne do konsumpcji w stanie świeżym, jak i przetwarzany na soki, przetworzone produkty i inne gatunki. Malina jest uprawiana w wielu krajach świata, w tym również w Polsce i oceniany głównie ze względu na zdrowe i smaczne owoce, przydatne do konsumpcji w stanie świeżym, jak i przetwarzany na soki, przetworzone produkty i inne gatunki.

**MATERIAŁ I METODY**

Materiał roślinny: lodygi, skalkulowane z roślin odmiany 'Sokolica' (wytwarza pędy z kolcami) i kłosa (IO-PIB; M-258 (wytwarza pędy bez kolców)).

Materiał roślinny do wyselekcjonowania przydatności wyłonionych genów: próbki lodyg skalkulowane z 10 wysokiakolcowych siewek z populacji 'Heritage' x M-258 (nazwana jako H x M-258).

Materiał do analizy molekularnych: całkowite RNA hodowców prób. Genom ref: *R. occidentalis* v.3.0 ([www.montana.edu/agriculture/rubus.html](http://www.montana.edu/agriculture/rubus.html))

Metoda sekwencjonowania: analiza porównawcza odczytów FASTQ - 'Sokolica' i M-258 (L-próbki pędów).

Materiał do oceny liczy transkryptów DEGs: w genomach genotypów rodzicielskich i mieszańców z populacji segregującej 'Heritage' x M-258.

**WYNIKI**

W wyniku analizy porównawczej bibliotek cDNA uzyskanych dla odmiany 'Sokolica' oraz kłosa M-258 zidentyfikowano 2 441 genów z różnicami w ekspresji (DEGs - Differentially Expressed Genes).

GO enrichment - KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes: Funkcje genów przypisano do trzech grup obejmujących: procesy biologiczne - (51%), czynniki molekularne - (41%) oraz kodujących składniki komórkowe - (8%).

Na bazie odczytów DEGs uzyskanych z analizy porównawczej transkryptomów *R. idaeus* vs *R. occidentalis* wytypowano 15 genów (Tabela 1.), zmierzających na genom referencyjny maliny czarnej, dla których przeprowadzono testy weryfikacyjne na matrycach 10 genotypów mieszańcowych z populacji H x M-258.

**Tabela 1. Zestawienie funkcji genów wytypowanych do testów weryfikacyjnych**

CHR0030300 IDENTYFIKATOR GENU	FUNKCJA WYTYPOWANEGO GENU
RubI_034806	Aktynidaza cytoplazmatyczna (rodzajowa)
RubI_044559	Aktynidaza cytoplazmatyczna (rodzajowa)
RubI_048994	Integracja białka białej kolczkowatej, witamina jest białko podcała epiny i gęstości białko thornless
RubI_051950	Integracja białka białej kolczkowatej, transport jest witaminę oraz regulator biochemii kwasy
RubI_058313	nitazena
RubI_059594	Białko zawierające domenę KH wiążące RNA
RubI_061852	Trafikacja białka podcała do Drax, białko związane ze szkieletem
RubI_064571	nitazena
RubI_067123	Hipotezyzacja białko PRUB1, 10479960, białko odnosi białko RNA: DRAD/DR All box
RubI_068580	Rybosomalna białko S19 podobności 540
RubI_072359	Białko strasy strasy
RubI_073318	System kachowatodofosforowa (długi kolca)
RubI_074461	Białko WPT1
RubI_074608	Aktynidaza cytoplazmatyczna
RubI_074802	UDP-glikozyltransferaza RTA2

**PODSUMOWANIE**

Badania (oparte na genomie porównawczym) umożliwiły wstępny identyfikację genów o rozpoznanie odmiany, dla których podjęto próbę opracowania molekularnych markerów funkcjonalnych, umożliwiających monitorowanie występowania cechy bezkolcowości u nasion gatunku *Rubus idaeus*.

Wynikowe geny nie wykazały jedonaznacznie stabilnej aktywności w hodowcach próbkach, pochodzących z roślin zarówno kolcowych, jak i bezkolcowych.

Analiza transkryptów genów dla określenia funkcjonalnych markerów molekularnych cechy bezkolcowości pędów maliny właściwej (*Rubus idaeus*)

Sylvia Keller-Przybyłkiewicz, Anita Kuras, Agnieszka Walencik

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy  
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice  
e-mail: [sylwia.keller@inhort.pl](mailto:sylwia.keller@inhort.pl)

Celem badań było wytypowanie sekwencji markerowych dla cechy bezkolcowości pędów maliny (*Rubus idaeus*).

Przeprowadzono sekwencjonowanie NGS (Next Generation Sequencing) genomów: 'Autumn Treasure' (bezkolcowy), 'Heritage' (drobne kolce), M-164 i M-258 (bezkolcowe) oraz 'Sokolica' (standard, agresywne kolce). Łącznie uzyskano 609.1 mln. odczytów sekwencji, pokrywających genom *R. occidentalis*.

W analizie porównawczej prób pędów 'Sokolica' i M-258, zidentyfikowano 265 775 sekwencji DEGs (Differentially Expressed Genes). Dla DEG przypisano funkcje w procesach biologicznych, czynnikach molekularnych oraz składnikach komórkowych. Piętnaście genów poddano testom walidacyjnym (qRT-PCR).

Ocenę relatywnej ekspresji przeprowadzono metodą 2<sup>-ΔΔCt</sup>. W analizie uwzględniono geny o wysokiej aktywności w bezkolcowej lodydze kłosa M-258. W testach RNAseq i qPCR identyczny typ regulacji odnotowano dla 12, a odmienny dla 3 z wytypowanych genów.

Profile ekspresyjne genów zbadano na 10 roślinach populacji 'Heritage' x M-258 oraz form rodzicielskich (odmiennie pod względem kolcowości pędów). Dla sześciu genów odnotowano wysoką aktywność w genomach trzech roślin o pędach z kolcami. U mieszańców ekspresja tych genów była znacznie wyższa (krotność zmiany ekspresji w przedziale 5 do 600) w porównaniu do ich form rodzicielskich. Odwrótną zależność zaobserwowano dla 3 genów (u kolcowej 'Heritage') i jednego (u bezkolcowego M-258)-wyższa ekspresja u form rodzicielskich.

Wyłonione markery funkcjonalne posłużą do wczesnej selekcji materiałów hodowlanych.

*Badania w ramach zadań na rzecz postępu biologicznego refundowanych przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi – zadanie 43: „Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi (bezkolcowość, wielkość owoców, zawartość ekstraktu i kwasu askorbinsowego) u maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.) poprzez analizę transkryptomów”.*

**Gene transcripts analysis uncovered novel functional molecular markers for the trait of thornless shoots of the red raspberry (*Rubus idaeus*)**

Sylvia Keller-Przybyłkiewicz, Anita Kuras, Agnieszka Walencik  
The aim of the study was to select genes responsible for thornless shoots of the red raspberry (*Rubus idaeus*).

Next Generation Sequencing of 'Autumn Treasure' (thornless), 'Heritage' (small spines), M-164 and M-258 (thornless) and 'Sokolica' (standard, aggressive spines) was performed. In total 609.1 mln sequence reads, were mapped on the *R. occidentalis* reference genome. The comparative analysis of the RNAseq from 'Sokolica' and done M-258 root samples, uncovered 265 775 differentially expressed genes (DEGs). Gene functions were assigned to biological processes, molecular factors, and cellular components.

Fifteen genes were selected for validation tests (qRT-PCR). The assessment of relative expression was performed using the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method. Similar type of gene regulation in the tests of RNAseq vs. qPCR was found for 12 DEGs. For 3 selected genes inconsistencies between both tests were observed.

Gene expression profiles were evaluated for 'Heritage', M-258 and for 10 plants from their cross. Six genes showed high expression in the genomes of three hybrid plants with thorns. Their expression was much higher (expression fold-change ranged from 5 to 600) in comparison to parental forms. In case of four evaluated genes the higher activity was observed in thorny 'Heritage' and thornless M-258 (3 and one, respectively).

Functional markers could be applicable for early selection of breeding materials. The research in the frame of biological progress funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development - task 43: "Identification of genome regions linked to functional traits (thornlessness, fruit size, fruit extract and ascorbic acid content) in raspberry (*Rubus idaeus* L.) by transcriptome sequencing".

*The research in the frame of biological progress funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development - task 43: "Identification of genome regions linked to functional traits (thornlessness, fruit size, fruit extract and ascorbic acid content) in raspberry (*Rubus idaeus* L.) by transcriptome sequencing".*