

**Profilowanie ekspresji genów pozwala na poznanie genów i szlaków metabolicznych uaktywnianych podczas odpowiedzi na zróżnicowaną uprawę. Celem było zidentyfikowanie genów o zróżnicowanej ekspresji, związanych z uprawą pszenicy w siewie czystym i w żywym mulczu.**

### **Materiały i metody:**

Materiał do RNAseq: materiał z 7 linii pszenicy z uprawy czystej, 8 linii z uprawy w komonicy, 8 linii z uprawy w koniczynie. Doświadczenie zostało przeprowadzone w szklarni. Całkowity RNA z liści został wyizolowany za pomocą zestawu do izolacji RNA. Stężenie i jakość matryc została oznaczona z wykorzystaniem Bioanalyzer RNA 6000 Nano Assay (Agilent Technologies).

Jakość materiału została potwierdzona po przesłaniu przez usługobiorcę. Również przez usługobiorcę została przygotowana biblioteka TruSeq mRNA stranded. Sekwencjonowanie wykonane zostało na NovaSeq6000 w konfiguracji 2x150bp, 40M odczytów. Dane zostały zapisane na dysku przenośnym i przekazane wykonawcy.

Grupa bioinformatyczna przeprowadziła analizę uzyskanych danych. Surowe dane zostały odniesione do sekwencji referencyjnej [sekwencja genomu pszenicy *Triticum aestivum*. Złożone sekwencje zostały scharakteryzowane funkcjonalnie. Wyznaczone zostały geny o ekspresji zróżnicowanej w odpowiedzi na sposób uprawy (DEGs). Została wykonana analiza typu KEGG (the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), która pozwoliła na identyfikację poszczególnych szlaków metabolicznych, do których należą wytypowane geny (charakterystyka funkcjonalna).

### **Wyniki:**

Wybrano 7 linii pszenicy z uprawy czystej, 8 linii pszenicy z uprawy w komonicy i 8 linii pszenicy z uprawy w koniczynie. Ich dobrą jakość po izolacji potwierdzono parametrem RIN.

**Tabela 5.** Linie, wybrane do doświadczenia, z warunków szklarniowych wraz z parametrem jakości matrycy.

Próba	Name on the list	ng/ul	RIN	Próba	Name on the list	ng/ul	RIN
1	Psz1_5	645	5.6	15	Psz_kom10_76	958	6
2	Psz3_7	488	5.9	16	Psz_kon2_14	140	5
3	Psz4_8	713	5.8	17	Psz_kon5_35	250	6.3
4	Psz2_6prime	22	4.6	18	Psz_kon6_36	122	4.6
5	Psz5_28	144	6.9	19	Psz_kon7_37	271	5.4
6	Psz6_29	480	5.8	20	Psz_kon9_78	255	6.7
7	Psz7_30	622	7.1	21	Psz_kon10_79	177	7
8	Psz_kom1_9	739	6.8	22	Psz_kon11_80	166	6.7
9	Psz_kom4_12	373	5.8				
10	Psz_kom5_31	200	5.8				
11	Psz_kom6_32	316	7.5				
12	Psz_kom7_33	583	7.7				
13	Psz_kom8_34	334	8.1				
14	Psz_kom9_75	459	6.5				

Odczytane sekwencje często zawierają odczyty o niskiej jakości lub odczyty z adapterami, które wpływają na jakość i wiarygodność biblioteki. Aby tego uniknąć niezbędne jest „przefiltrowanie” odczytów i uzyskanie odczytów czystych. Usuwane są odczyty z adapterami, odczyty, w których zawartość nukleotydów z odczytem niepewnym wynosi >10% i odczyty o niskiej jakości (**Tab. 6**). Duża liczba uzyskanych odczytów (min. 80 mln) gwarantuje wysoką jakość analiz transkryptomycznych.

**Tabela 6.** Analiza statystyczna wyników sekwencjonowania.

sample	library	raw_reads	raw_base s	clean_reads	clean_base s	error_rate
Psz1_5	MRRA240019657-1a	108979860	16.35G	106090914	15.91G	0.01
Psz3_7	MRRA240019659-1a	105145268	15.77G	102416782	15.36G	0.01
Psz4_8	MRRA240019660-1a	111285340	16.69G	108218682	16.23G	0.01
Psz2_6prime	MRRA240019662-1a	90336494	13.55G	87294048	13.09G	0.01
Psz5_28	MRRA240019665-1a	109338862	16.4G	106287664	15.94G	0.01
Psz6_29	MRRA240019666-1a	91733330	13.76G	89030068	13.35G	0.01
Psz7_30	MRRA240019667-1a	109511058	16.43G	106872010	16.03G	0.01
Psz_kom1_9	MRRA240019697-1a	88176808	13.23G	84877852	12.73G	0.01
Psz_kom4_12	MRRA240019700-1a	94982980	14.25G	90767744	13.62G	0.01
Psz_kom5_31	MRRA240019705-1a	86757372	13.01G	80223756	12.03G	0.01
Psz_kom6_32	MRRA240019706-1a	102660974	15.4G	96086268	14.41G	0.01
Psz_kom7_33	MRRA240019707-1a	103763412	15.56G	96051348	14.41G	0.01
Psz_kom8_34	MRRA240019708-1a	101085858	15.16G	95907058	14.39G	0.01
Psz_kon2_14	MRRA240019710-1a	95793224	14.37G	88735178	13.31G	0.01
Psz_kon5_35	MRRA240019717-1a	87919386	13.19G	80196780	12.03G	0.01
Psz_kon6_36	MRRA240019718-1a	94069108	14.11G	85237058	12.79G	0.01
Psz_kon7_37	MRRA240019719-1a	93389628	14.01G	89909834	13.49G	0.01
Psz_kom9_75	MRRA240022551-1a	90255638	13.54G	87553736	13.13G	0.02
Psz_kom10_76	MRRA240022552-1a	93768350	14.07G	91112058	13.67G	0.02
Psz_kon8_77	MRRA240022553-1a	85689380	12.85G	83691926	12.55G	0.02
Psz_kon9_78	MRRA240022554-1a	85688376	12.85G	83386224	12.51G	0.02
Psz_kon10_79	MRRA240022555-1a	97710098	14.66G	95625340	14.34G	0.02
Psz_kon11_80	MRRA240022556-1a	95313190	14.3G	92254482	13.84G	0.02

Raw\_bases – liczba odczytów\*długość sekwencji

Clean reads – odczyty sekwencji po odrzuceniu odczytów o niskiej jakości.

Zmapowano uzyskane sekwencje do genomu referencyjnego *Triticum aestivum*. Udało się zmapować >81% sekwencji, z czego ~76% sekwencji to sekwencje unikalne (Tab. 7).

**Tabela 7.** Wyniki mapowania prób do genomu referencyjnego pszenicy.

Sample	Total_reads	Total_map	Unique_map	Multi_map
Psz1_5	106090914	96352374 (90.82%)	91027935 (85.8%)	5324439 (5.02%)
Psz3_7	102416782	86297142 (84.26%)	80320213 (78.42%)	5976929 (5.84%)
Psz4_8	108218682	91369982 (84.43%)	86288088 (79.73%)	5081894 (4.7%)
Psz2_6prime	87294048	79768321 (91.38%)	75327132 (86.29%)	4441189 (5.09%)
Psz5_28	106287664	94244389 (88.67%)	88547583 (83.31%)	5696806 (5.36%)
Psz6_29	89030068	81571225 (91.62%)	77152027 (86.66%)	4419198 (4.96%)
Psz7_30	106872010	97970616 (91.67%)	91686914 (85.79%)	6283702 (5.88%)
Psz_kom1_9	84877852	77457795 (91.26%)	73235683 (86.28%)	4222112 (4.97%)
Psz_kom4_12	90767744	82729129 (91.14%)	77805368 (85.72%)	4923761 (5.42%)
Psz_kom5_31	80223756	71781978 (89.48%)	67513560 (84.16%)	4268418 (5.32%)
Psz_kom6_32	96086268	85852914 (89.35%)	80251567 (83.52%)	5601347 (5.83%)
Psz_kom7_33	96051348	85826957 (89.36%)	80323208 (83.63%)	5503749 (5.73%)
Psz_kom8_34	95907058	86677615 (90.38%)	81340976 (84.81%)	5336639 (5.56%)
Psz_kon2_14	88735178	76484336 (86.19%)	72484201 (81.69%)	4000135 (4.51%)
Psz_kon5_35	80196780	72881959 (90.88%)	68850747 (85.85%)	4031212 (5.03%)
Psz_kon6_36	85237058	78051869 (91.57%)	74045845 (86.87%)	4006024 (4.7%)
Psz_kon7_37	89909834	81766131 (90.94%)	77471665 (86.17%)	4294466 (4.78%)
Psz_kom9_75	87553736	73625810 (84.09%)	69068451 (78.89%)	4557359 (5.21%)
Psz_kom10_76	91112058	78116918 (85.74%)	73654242 (80.84%)	4462676 (4.9%)
Psz_kon8_77	83691926	71506909 (85.44%)	67208019 (80.3%)	4298890 (5.14%)
Psz_kon9_78	83386224	68636670 (82.31%)	64597927 (77.47%)	4038743 (4.84%)
Psz_kon10_79	95625340	80577111 (84.26%)	75732901 (79.2%)	4844210 (5.07%)
Psz_kon11_80	92254482	74330155 (80.57%)	69779004 (75.64%)	4551151 (4.93%)

Total reads – wszystkie odczyty,

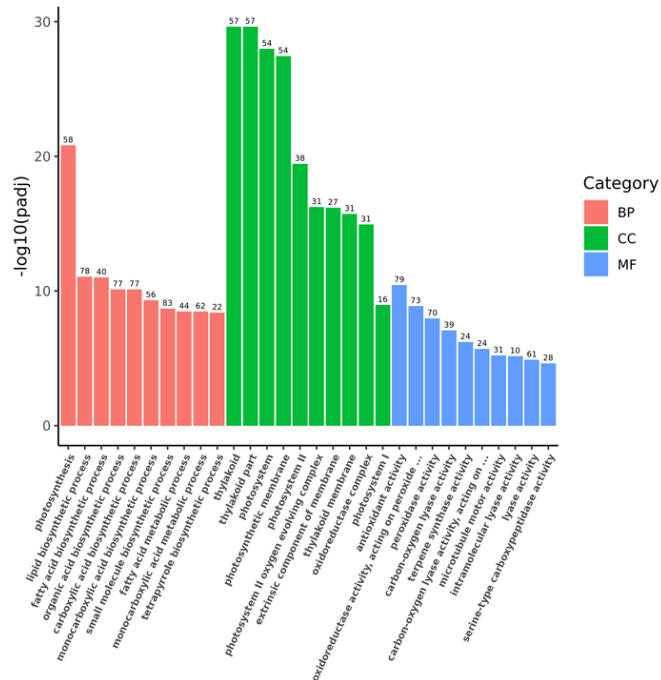
Total map – liczba odczytów, odniesiona do genomu referencyjnego,

Unique map – liczba odczytów, zmapowanych w miejsca unikalne w genomie,

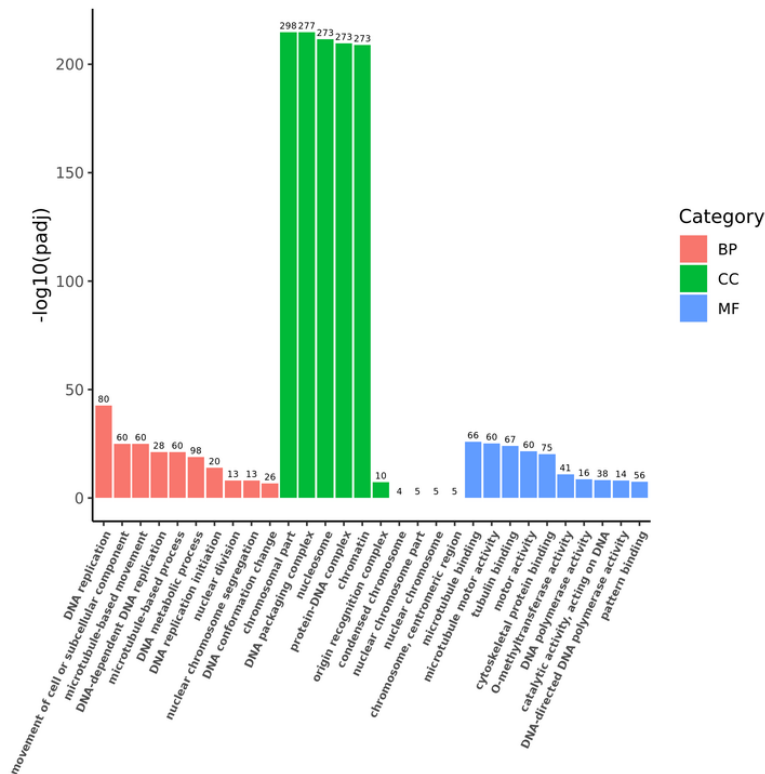
Multi-map – liczba odczytów, zmapowanych w liczne miejsca w genomie,

Wykonano kwalifikację zidentyfikowanych genów do poszczególnych kategorii funkcjonalnych (GO). W porównaniu pszenica w czystej uprawie vs pszenica w koniczynie najwięcej genów należało do kategorii „fotosynteza” i „biosynteza lipidów” (Ryc.4). W porównaniu pszenica w czystej uprawie vs pszenica w komonicy najwięcej genów należało do kategorii „replikacja DNA” i „ruch w oparciu o mikrotubule”.

**A**

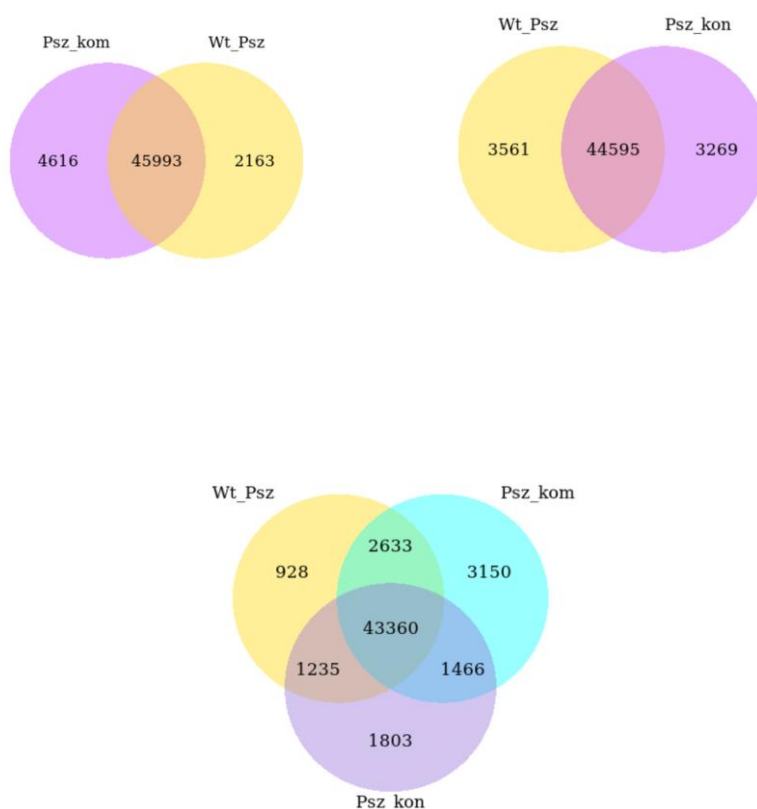


**B**



**Ryc.4.** Przyporządkowanie zidentyfikowanych genów do poszczególnych kategorii funkcjonalnych (GO). **A)** pszenica w czystej uprawie vs pszenica w koniczynie, **B)** pszenica w czystej uprawie vs pszenica w komonicy.

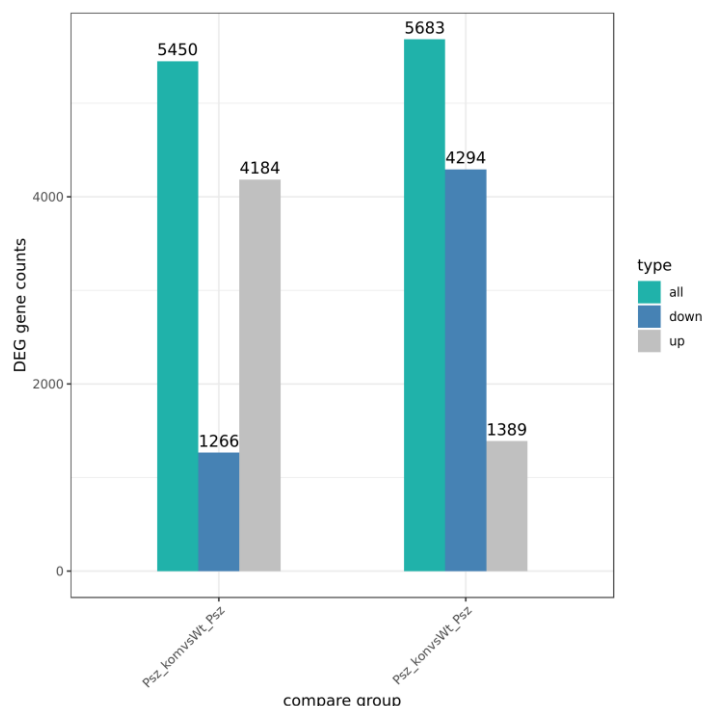
Porównano liczbę sekwencji aktywowanych w uprawie czystej i mieszanej, pszenica i pszenica w komonicy oraz pszenica i pszenica w koniczynie. W porównaniu pierwszym, sekwencji specyficznych tylko dla pszenicy w siewie czystym było 2163, dla pszenicy w komonicy 4616. W porównaniu drugim zidentyfikowano dla pszenicy w siewie czystym 3269 sekwencji versus 3561 w siewie z koniczyną. Porównanie trzecie – pszenica w siewie czystym vs pszenica w komonicy i pszenica w koniczynie wykazała 5881 sekwencji specyficznych wobec 43360 wspólnych (**Rys 5**).



**Ryc 5.** Diagram Venna, porównanie liczby sekwencji wspólnych i oddzielnych dla pszenicy w siewie czystym, siewie w komonicy i siewie w koniczynie

Zidentyfikowano sekwencje o zróżnicowanej ekspresji pomiędzy pszenicą w siewie czystym i mieszanym. Wskazano sekwencje, których ekspresja wzrosła lub zmalała oraz podsumowano wszystkie (**Rys.6**).

compare	all	up	down	threshold
Psz_konvsWt_Psz	5683	1389	4294	DESeq2 padj<=0.05  log2FoldChange >=1.0
Psz_komvsWt_Psz	5450	4184	1266	DESeq2 padj<=0.05  log2FoldChange >=1.0



**Ryc.6.**

Sekwencje o różnicowanej ekspresji pomiędzy pszenicą w siewie czystym i mieszanym.

Oddziaływanie licznych genów zebrano w poszczególne szlaki metaboliczne (analiza KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). W przypadku porównania pszenica w siewie czystym vs pszenica w koniczynie wskazano pięć najważniejszych szlaków metabolicznych: fotosynteza, biosynteza lipidów, kwasów tłuszczowych, kwasów organicznych i karboksylowych. Dla porównania pszenica w siewie czystym vs pszenica w koniczynie najważniejszym szlakiem okazała się replikacja DNA, ruch komponentów subkomórkowych, ruch oparty na mikrotubulach, podział komórkowy (**Tab. 8**).

**Tabela 8.** Najważniejsze szlaki metaboliczne, do których należą sekwencje o różnicowanej ekspresji pomiędzy pszenicą w uprawie czystej, a pszenicą w uprawie z koniczyną

Category	GOID	Description	Gene Ratio	BgRatio	pvalue	padj	Count	Up	Down
BP	GO:0015979	fotosynteza	58/1688	160/21452	2.70879399432771e-24	1.56568292872142e-21	58	2	56
BP	GO:0008610	biosynteza lipidów	78/1688	396/21452	2.9198636609878e-14	8.43840598025475e-12	78	1	77
BP	GO:0006633	biosynteza kwasów tłuszczowych	40/1688	133/21452	4.96497810105915e-14	9.56585780804062e-12	40	0	40
BP	GO:0016053	biosynteza kwasów organicznych	77/1688	411/21452	6.43375828196081e-13	7.4374245739467e-11	77	4	73
BP	GO:0046394	biosynteza kwasów karboksylowych	77/1688	411/21452	6.43375828196081e-13	7.4374245739467e-11	77	4	73

GeneRatio: stosunek liczby genów o zróżnicowanej ekspresji do liczby wszystkich genów, które mogą zostać odnalezione w bazie GO (Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>))  
BgRatio: stosunek wszystkich genów z danej kategorii GO do wszystkich genów  
padj: skorygowana wartość p-value, 0.05 oznacza istotność  
Count: liczba genów o zróżnicowanej ekspresji z danym nr anotacji GO

Wybrano pięć sekwencji o największej różnicy ekspresji z doświadczenia z pszenicą w uprawie czystej, a pszenicą w uprawie z koniczyną (**Tab. 9**)

**Tabela 9.** Sekwencje o największej różnicy ekspresji pomiędzy pszenicą w uprawie czystej, pszenicą w uprawie z koniczyną i pszenicą w uprawie z komonicą

	Sekwencja	Wt_Psz	Psz_kon	log2FoldChange	Charakterystyka funkcjonalna
1	123166933	336.3	3.4	-6.5	Mannose/glucose-specific lectin
2	123163177	199.7	0	-10.0	Lecithin-cholesterol acyltransferase-like
3	123114541	80.0	0	-8.7	ARATH 3-ketoacyl-CoA synthase
4	123096494	434.2	85.2	-2.3	elongation factor P-like
5	123112831	125.1	0	-9.7	wax ester synthase/diacylglycerol acyltransferase

	Sekwencja	Psz_kon vs Wt_Psz_log2FoldChange	Psz_kom vs Wt_Psz_log2FoldChange	Charakterystyka funkcjonalna
1	732707	-0.56	-0.06	ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase
2	123086288	-0.80	-0.12	ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase
3	123091750	-0.48	-0.017	ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase
4	123103336	-1.27	-0.021	ribulose biphosphate carboxylase small subunit
5	123120782	-1.43	-0.079	ribulose biphosphate carboxylase small subunit

Log2FoldChange – wartość logarytmu z parametru określającego różnicę pomiędzy poziomem ekspresji jednej porównywanej grupy wobec drugiej

## **Podsumowanie analiz transkryptomycznych dla prób pszenicy:**

Do sekwencjonowania RNAseq wybrano linie pszenicy z uprawy czystej, uprawy z komonicyą i koniczyną. Po izolacji potwierdzono jakość i integralność uzyskanego materiału parametrem RIN>4.6. W wyniku sekwencjonowania uzyskano 80 mln odczytów, co gwarantuje wysoką jakość analiz transkryptomu. Odniesiono pozyskane sekwencje do genomu referencyjnego pszenicy. Zmapowano ok. 81% sekwencji. 76% z nich zostało ulokowanych w miejscach unikalnych w genomie. Wskazano sekwencje o największej różnicy ekspresji pomiędzy liniami w uprawie czystej i mieszanej. Scharakteryzowano funkcjonalnie wskazane sekwencje. Określono ich potencjalny udział w różnych szlakach metabolicznych: fotosynteza, biosynteza lipidów, kwasów tłuszczowych, kwasów organicznych i karboksylowych. Dla porównania pszenica w siewie czystym vs pszenica w komonicy najważniejszym szlakiem okazała się replikacja DNA, ruch komponentów subkomórkowych, ruch oparty na mikrotubulach, podział komórkowy.

Szlak metaboliczny wydłużania kwasów tłuszczowych jest kluczowy dla zdrowia i adaptacji roślin. Monokultury pszenicy narażają rośliny na stresy środowiskowe, które mogą zakłócać ten proces. Uprawa mieszana z koniczyną zapewnia lepsze warunki glebowe i odżywcze, wspierając metabolizm lipidowy, co przekłada się na lepsze plony i odporność roślin. W monokulturze intensywne pobieranie składników odżywczych (np. fosforu, magnezu, azotu) prowadzi do degradacji gleby. Niedobory kluczowych pierwiastków ograniczają procesy metaboliczne, w tym wydłużanie kwasów tłuszczowych. Brak roślin motylkowych, takich jak koniczyna, oznacza mniejszą dostępność biologicznie wiązanego azotu, który jest ważny dla biosyntezy koenzymów wspierających szlaki lipidowe. Rośliny w monokulturze są bardziej narażone na stres wodny i patogeny, co może prowadzić do zaburzeń w syntezie lipidów ochronnych, takich jak kutykula. Obniżona ekspresja genów związanych z fotosyntezą w pszenicy w uprawie z koniczyną w porównaniu z uprawą czystą może wynikać z zacienienia pszenicy w koniczynie.