

Wydział Biologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Rozprawa doktorska

**Identyfikacja mikroRNA specyficznych dla podkładek u jabłoni**

*Identification of rootstock-specific miRNAs in apple tree*

Elżbieta Kaja

Praca napisana pod kierunkiem  
**prof. dr hab. Izabeli Makałowskiej**  
w Zakładzie Bioinformatyki  
Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Promotor pomocniczy: **dr Michał Szcześniak**

Poznań 2016

*Składam serdeczne podziękowania:*

*Pani Promotor **prof. dr hab. Izabeli Makalowskiej** za naukowe inspiracje, wsparcie, przekazaną wiedzę i motywację w trakcie całych studiów doktoranckich,*

*Promotorowi pomocniczemu, **dr Michałowi Szczęśniakowi** za merytoryczną pomoc na każdym etapie projektu oraz za liczne naukowe dyskusje,*

*Panu **prof. dr hab. Arturowi Jarmołowskiemu** za umożliwienie udziału w programie Międzynarodowych Projektów Doktoranckich Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej,*

*Pani **prof. dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej** za wieloletnie wsparcie w karierze naukowej,*

*Panu **prof. Michaelowi Axtellowi** i Panu **prof. Timothy'emu McNellisowi** za możliwość odbycia stażu na Uniwersytecie Penn State w Stanach Zjednoczonych,*

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu Bioinformatyki, a w szczególności:*

***dr Joannie Ciomborowskiej** za nieocenioną pomoc i wsparcie w kwestiach naukowych i organizacyjnych,*

***mgr Magdalenie Kubiak** za owocną współpracę, dyskusje i cenne rady w laboratorium,*

***mgr Michałowi Kabzie** i **mgr Wojciechowi Rosikiewiczowi** za pomoc w kwestiach informatycznych,*

*Pracownikom i Doktorantom Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii.*

*Wyrazy wdzięczności kieruję w stronę mojej Rodziny za wyrozumiałość i wsparcie każdego dnia.*

*Pracę dedykuję Mężowi i Dzieciom*

## **Finansowanie**

Projekt doktorski jest częścią Międzynarodowych Programów Doktoranckich (MPD) pt. „From genome to phenotype: A multidisciplinary approach to functional genomics” (MPD/2010/3) uzyskanego z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (FNP).

Praca została również dofinansowana w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki (UMO-2013/09/N/NZ1/01037), Wojewódzkiego Urzędu Pracy (Projekt „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 PO KL realizowanego w latach 2012–2013; nr umowy PO KL 8.2.2/30-203-12/13) oraz Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) Poznańskiego Konsorcjum RNA (01/KNOW2/2014).

## Spis treści

Streszczenie.....	7
<i>Summary</i> .....	9
<b>1 Wstęp .....</b>	<b>10</b>
1.1 Cząsteczki mikroRNA (miRNA) – biogeneza i funkcja.....	10
1.2 Metody identyfikacji cząsteczek mikroRNA.....	16
1.3 Cząsteczki mikroRNA u jabłoni.....	20
1.4 Uprawa jabłoni w Polsce i na świecie .....	21
1.5 Wpływ podkładki na ekspresję genów w zrazie.....	22
1.6 Zaraza ogniowa .....	22
<b>2 Cel pracy.....</b>	<b>25</b>
<b>3 Materiały i metody .....</b>	<b>26</b>
3.1 Materiał roślinny.....	26
3.2 Inokulacja .....	27
3.3 Izolacja RNA.....	27
3.4 Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS).....	28
3.5 Analiza bioinformatyczna .....	28
3.5.1 Wstępna obróbka danych pochodzących z wysokoprzepustowego sekwencjonowania .....	28
3.5.2 Identyfikacja cząsteczek mikroRNA jabłoni.....	30
3.5.3 Identyfikacja transkryptów docelowych dla cząsteczek mikroRNA jabłoni .....	30
3.5.4 Przypisywanie terminów GO otrzymanym transkryptom docelowym dla cząsteczek mikroRNA.....	31
3.6 Metody eksperymentalne.....	31
3.6.1 <i>Stem-loop</i> RT-PCR w czasie rzeczywistym.....	31
3.6.2 Reakcja RT-PCR dla nowych prekursorów cząsteczek mikroRNA .....	36
3.6.3 Elektroforeza.....	38
3.7 Sprzęt komputerowy.....	38
<b>4 Wyniki.....</b>	<b>39</b>
4.1 Identyfikacja i analiza ekspresji cząsteczek mikroRNA specyficznych dla podkładki u zdrowych jabłoni odmiany „Gala” .....	39
4.1.1 Materiał biologiczny.....	39

4.1.2	Charakterystyka bibliotek małych RNA.....	40
4.1.3	Identyfikacja cząsteczek mikroRNA .....	43
4.1.4	Eksperymentalne potwierdzenie zidentyfikowanych cząsteczek mikroRNA.....	46
4.1.5	Analiza ekspresji cząsteczek mikroRNA w zrazach jabłoni rosnących na różnych podkładkach.....	47
4.1.6	Transkrypty docelowe cząsteczek mikroRNA u jabłoni i ich funkcja.....	55
4.1.7	Przyporządkowanie terminów GO transkryptom docelowym i analiza ich nadreprezentacji.....	55
4.1.8	Baza danych cząsteczek mikroRNA jabłoni.....	56
<b>4.2</b>	<b>Identyfikacja i analiza ekspresji cząsteczek mikroRNA w odpowiedzi na inokulację liści jabłoni „Gala” .....</b>	<b>58</b>
4.2.1	Materiał roślinny .....	58
4.2.2	Charakterystyka bibliotek małych RNA.....	59
4.2.3	Identyfikacja cząsteczek mikroRNA na podstawie danych z osiemnastu bibliotek jabłoni „Gala” .....	62
4.2.4	Analiza ekspresji zidentyfikowanych cząsteczek mikroRNA.....	64
<b>5</b>	<b>Dyskusja.....</b>	<b>73</b>
5.1	Identyfikacja cząsteczek mikroRNA .....	73
5.2	Długie cząsteczki mikroRNA (lmiRNA) .....	74
5.3	Eksperymentalne potwierdzanie wyników NGS.....	74
5.4	Analiza transkryptów docelowych oraz potencjalna rola cząsteczek mikroRNA w kształtowaniu odporności jabłoni na zarazę ogniową .....	76
5.5	Odpowiedź cząsteczek mikroRNA na inokulację bakteriami <i>Erwinia amylovora</i> .....	78
5.6	Rola wybranych cząsteczek mikroRNA w kształtowaniu odporności na zarazę ogniową oraz w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne .....	81
5.6.1.	Cząsteczka mdm-miR535b,c.....	81
5.6.2.	Cząsteczka mdm-miR168a,b .....	83
5.6.3.	Cząsteczka mdm-miR169a.....	84
5.6.4.	Cząsteczka mdm-miR167b-g.....	84
<b>6</b>	<b>Wnioski końcowe .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Suplement.....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Spis rysunków.....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>Spis tabel.....</b>	<b>90</b>
<b>10</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>91</b>

## Streszczenie

Cząsteczki mikroRNA (miRNA) odgrywają niezwykle istotną rolę w regulacji ekspresji genów u roślin i zwierząt poprzez wyciszanie ekspresji transkryptów docelowych. Dla jabłoni (*Malus domestica*) jest obecnie znanych i dostępnych w bazie „miRBase” 206 cząsteczek miRNA. Identyfikacja nowych cząsteczek, jak również poznawanie funkcji już istniejących może przyczynić się do ich praktycznego wykorzystania w celu lepszej ochrony roślin przed patogenami.

Celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie cząsteczek miRNA jabłoni odmiany „Gala” i określenie ich zróżnicowanej ekspresji w zależności od podkładki. Zwrócono szczególną uwagę na miRNA zaangażowane w kształtowanie odporności na zarazę ogniową, chorobę wywołowaną przez bakterię *Erwinia amylovora*. W badaniach opierano się głównie na metodach głębokiego sekwencjonowania i analizach bioinformatycznych, których wyniki potwierdzano przy użyciu metod eksperymentalnych. Materiałem badawczym były drzewa odmiany „Gala” rosnące na podkładkach o różnej odporności na zarazę ogniową (M.27, B.9, M.111 i G.30). W pierwszym etapie pracy, poprzez porównanie ekspresji miRNA zidentyfikowanych w zdrowych drzewach, skoncentrowano się na wytypowaniu cząsteczek charakterystycznych dla poszczególnych podkładek. Następnie zidentyfikowano transkrypty docelowe dla miRNA oraz przeanalizowano potencjalny związek pomiędzy profilem ekspresji miRNA a odpornością jabłoni na zarazę ogniową. Spośród dwustu pięćdziesięciu dwóch zidentyfikowanych w tej części pracy cząsteczek, biorąc pod uwagę wszystkie późniejsze wyniki, wytypowano cztery cząsteczki potencjalnie zaangażowane w kształtowanie odporności na zarazę ogniową: mdm-miR535b,c, mdm-miR169a, mdm-miR167b-g oraz mdm-miR168a,b.

Celem drugiego etapu pracy było zidentyfikowanie miRNA zaangażowanych w odpowiedź jabłoni na zakażenie bakteryjne poprzez porównanie poziomów ekspresji miRNA pochodzących z drzew zakażonych i niezakażonych bakteriami *E amylovora*. W tej części pracy wytypowano trzy cząsteczki wykazujące zróżnicowaną ekspresję w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne: mdm-miR168a,b, mdm-miR194C i mdm-miR1392C. Dodatkowo, analiza transkryptów docelowych wymienionych cząsteczek potwierdziła ich potencjalną rolę w odpowiedzi na stres biotyczny.

Przeprowadzone badania znacznie poszerzyły katalog znanych dla jabłoni cząsteczek miRNA oraz pozwoliły wysnuć hipotezę o udziale cząsteczki mdm-miR535b,c i noduliny w reakcjach obronnych jabłoni na zakażenie zarazą ogniową. Ponadto

przyczyniły się do lepszego poznania funkcji innych cząsteczek miRNA, zwłaszcza w odniesieniu do choroby jaką jest zaraza ogniowa.



## **Summary**

*Micro RNAs (miRNAs) play crucial role in gene expression regulation in plants and animals through the silencing mechanism of target genes. Currently, there are 206 miRNA records for apple tree (Malus domestica) available in the miRBase database. The identification of novel miRNAs, as well as discovery of functions of already known molecules may help in developing practical applications of miRNAs in order to protect plants against pathogenes.*

*The main goal of this research was to identify miRNAs from “Gala” apple and to characterize rootstock-specific miRNA expression. Particularly, miRNAs involved in fire blight resistance, disease caused by Erwinia amylovora, were analyzed and described. The project methodology was based on Next Generation Sequencing and bioinformatics analyses followed by the experimental validation. The plant material was “Gala” apple scions grafted on four rootstocks with various fire blight resistance (M.27, B.9, M.111 and G.30). In the first part of the project, through the comparison of miRNA expression profiles in non-inoculated scions, rootstock-dependent miRNAs were indicated. Then, miRNA targets were identified and the relation between miRNA expression and fire blight resistance was analyzed. Out of 252 newly identified miRNAs, taking into consideration also following results, four miRNAs were indicated as potentially involved in fire blight resistance of apple: mdm-miR535b,c, mdm-miR169a, mdm-miR167b-g and mdm-miR168a,b.*

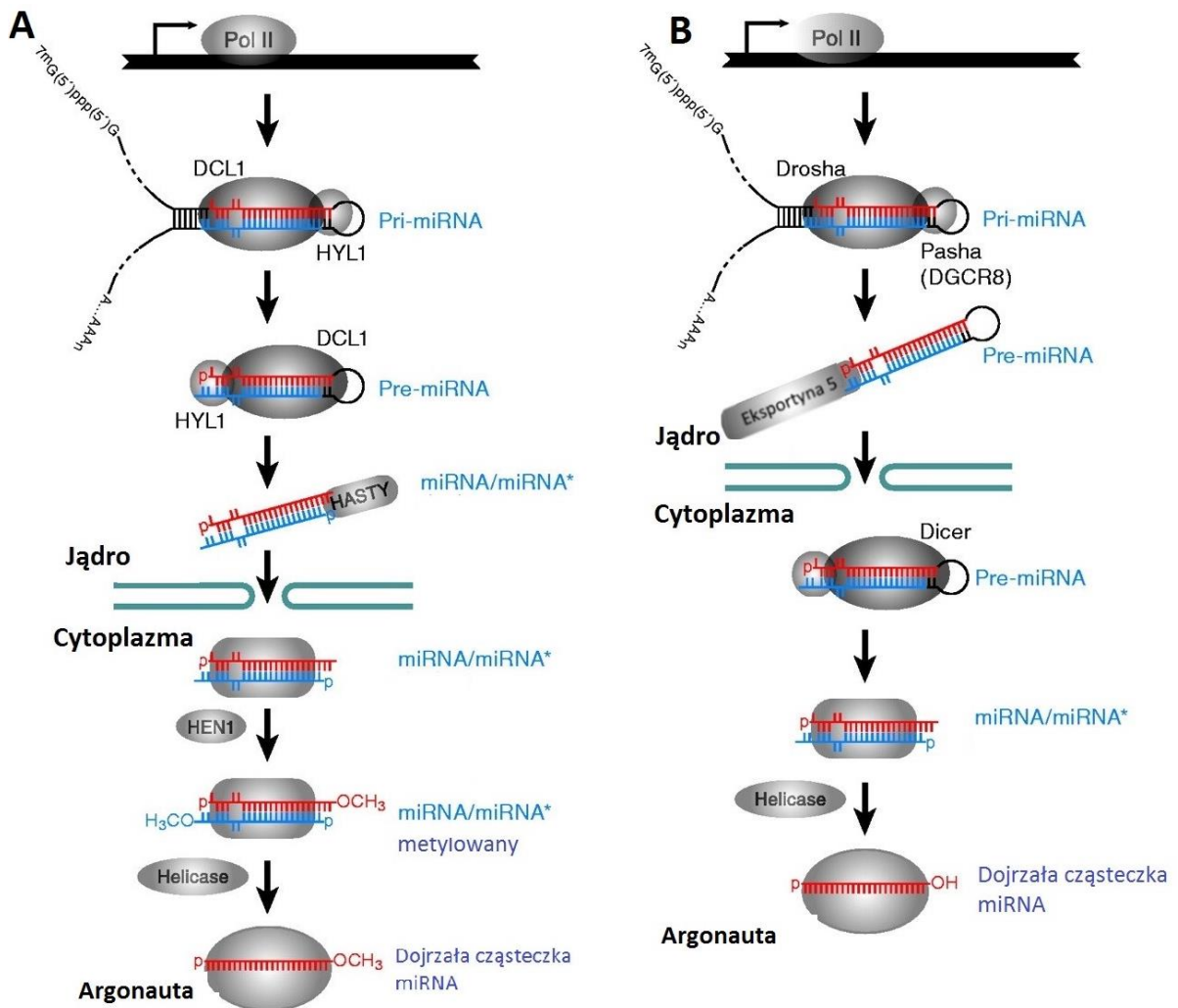
*The goal of the second part of the project was the identification of miRNAs involved in apple response to bacterial infection through the comparison of miRNA expression levels from E. amylovora infected and non-infected trees. Three miRNAs showing differential expression in response to bacterial infection were selected: mdm-miR168a,b, mdm-miR194C i mdm-miR1392C. Additional analysis of their targets confirmed their role in response to biotic stress.*

*Performed analyses significantly extended apple miRNA repertoire and allowed to create the hypothesis that mdm-miR535b,c and nodulins are involved in apple defense mechanisms in response to fire blight infection. Additionally, the results shed light on other miRNA functions, especially in relation to fire blight disease.*

# 1 Wstęp

## 1.1 Cząsteczki mikroRNA (miRNA) – biogeneza i funkcja

Cząsteczki mikroRNA (miRNA) odkryto w latach pięćdziesiątych XX wieku (Lee i in., 1993; Reinhart i in., 2000). Od tego czasu cieszą się dużym zainteresowaniem naukowców i są przedmiotem intensywnych badań. Cząsteczki miRNA są jednoniciowe i mają długość od 20 do 24 nukleotydów (nt.). Należą do grupy małych, endogennych, niekodujących RNA, występujących u rośliny, zwierząt, grzybów, a nawet u niektórych wirusów. O ich niezwykle istotnej roli w organizmach żywych może świadczyć fakt, że około jednej trzeciej ludzkich genów jest przez nie kontrolowane (Lewis i in., 2005; Friedman i in., 2009). Cząsteczki mikroRNA u roślin zostały po raz pierwszy zidentyfikowane w 2002 (Reinhart i in., 2002) u gatunku modelowego *Arabidopsis thaliana*. Do dnia dzisiejszego badania prowadzone na dziesiątkach gatunków roślin pozwoliły opisać setki roślinnych cząsteczek miRNA, jak również wykazać odmienną w stosunku do ich zwierzęcych odpowiedników biogenezę (Rysunek 1; (Reinhart i in., 2002; Axtell i in., 2011).



Rysunek 1. Biogeneza cząsteczek mikroRNA u roślin (A) i u zwierząt (B). Zmodyfikowano za (Du i Zamore, 2005)

Geny kodujące cząsteczki miRNA nazywane są genami *MIR* (u roślin) lub *mir* (u zwierząt). Mogą znajdować się w oddaleniu od siebie lub tworzyć klastry i wspólne jednostki transkrypcyjne (Lee i in., 2002; Reinhart i in., 2002). U roślin geny *MIR* najczęściej stanowią niezależne jednostki transkrypcyjne (Bartel i Bartel, 2003). Od niedawna u *A. thaliana* znane są jednak także przykłady genów miRNA zlokalizowanych w rejonach intronowych innych genów. Uznaje się, że około 8% miRNA u tego gatunku jest kodowanych w ten sposób (Szweykowska-Kulinska i in., 2013). W genomach zwierząt natomiast geny miRNA są najczęściej zlokalizowane w intronach innych genów – zarówno kodujących, jak i niekodujących (Kim i in., 2009). Mogą być również zlokalizowane w egzonach niekodujących genów. Oznacza to, że zwierzęce miRNA najczęściej nie mają swoich odrębnych jednostek transkrypcyjnych (Rodriguez i in., 2004). Geny miRNA w komórkach roślinnych i zwierzęcych są transkrybowane przez polimerazę II RNA, przy czym niektóre miRNA u człowieka są transkrybowane przez polimerazę III RNA

(Borchert i in., 2006) Ich pierwotny transkrypt (pri-miRNA) ma więc najczęściej strukturę kapu na końcu 5' oraz ogon poli(A) na końcu 3' i tworzy strukturę spinki do włosów, co jest bardzo charakterystyczną cechą miRNA. (Lee i in., 2004). W strukturze tej można wyróżnić pętlę oraz rejon dwuniciowy (trzon), w obrębie którego zlokalizowana jest sekwencja dojrzałego miRNA, komplementarna do niego sekwencja miRNA „star” (miRNA\*) oraz pętle i wybrzuszenia wywołane brakiem komplementarności niektórych rejonów. Całkowita długość roślinnych prekursorów miRNA jest bardzo zróżnicowana i waha się w zakresie od 70 do kilkuset nukleotydów (Axtell i in., 2011). U zwierząt natomiast zwykle jest mniejsza i wynosi około 70 nt. (Lee i in., 2003; Denli i in., 2004; Gregory i in., 2004).

U roślin (Rysunek 1. A) po powstaniu transkryptu pri-miRNA jest on poddawany dalszej obróbce na terenie jądra komórkowego, prowadzącej do powstania dojrzałej miRNA. Przy udziale enzymu DCL-1 (DICER LIKE-1), w obecności białek HYL1 (HYPERNASTIC LEAVES-1) oraz SE (SERRATE) (Kurihara i in., 2006; Yang i in., 2006; Dong i in., 2008), jak również z udziałem białek CBP20 i CBP80 (CAP BINDING PROTEIN 20 i 80) i TGH (TOUGH)(Ren i in., 2012) oba końce pri-miRNA zostają odcięte i powstaje cząsteczka pre-miRNA (Park i in., 2005; Jones-Rhoades i in., 2006; Winter i in., 2009). Następnie struktura zostaje ponownie przycięta na końcach do długości około 20–30 nt., pętla spinki zostaje usunięta, a powstały dwuniciowy kompleks (dupleks miRNA:miRNA\*) zawierający reszty fosforanowe na końcach 5' ulega metylacji przy udziale enzymu HEN1 i jest transportowany do cytoplazmy przy udziale białek: HASTY i Ran (Bartel, 2004). Dupleks miRNA:miRNA\* łączy się z białkami z rodziny AGO (Argonautów) (Hammond i in., 2001; Meister, 2013) tworząc kompleks RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). W kompleksie RISC jedna z nici dupleksu (miRNA\*) ulega degradacji i powstaje aktywny kompleks rybonukleoproteinowy (miRNP), który może wiązać się z komplementarnym fragmentem docelowego mRNA. Dalsze wyciszenie jego ekspresji odbywa się poprzez jego degradację lub hamowanie translacji (Bartel, 2004). U roślin pierwszy mechanizm występuje częściej. Miejsce wiązania cząsteczki miRNA u roślin może znajdować się w rejonie transkryptu niepodlegającego translacji na końcu 5' (5'UTR; ang. *untranslated region*), ORF (ang. *open reading frame*), 3'UTR, a nawet w transkryptach niekodujących białek (Axtell i in., 2011).

Przecięcie nici transkryptu docelowego zachodzi pomiędzy nukleotydami komplementarnymi do 10 i 11 nukleotydu sekwencji miRNA dzięki endonukleazie obecnej w kompleksie RISC (AGO1). W ten sposób dochodzi do szybkiego obniżenia poziomu docelowego transkryptu (Llave i in., 2002; Voinnet, 2009). Co ciekawe, roślinne miRNA

mogą również wpływać na epigenetyczną regulację ekspresji genów, działając na kompleks białek modyfikujących chromatynę. Może to skutkować zwiększoną metylacją DNA w rejonie własnego genu *MIR* (działanie w *cis*) lub w rejonie genu docelowego (działanie w *trans*) i w rezultacie – wyciszeniem ekspresji genu (Bao i in., 2004; Wu i in., 2010).

Dla roślinnych cząsteczek miRNA docelowymi transkryptami są najczęściej mRNA czynników transkrypcyjnych (Palatnik i in., 2003; Bartel, 2004). Cząsteczki mikroRNA biorą udział w regulacji wielu ważnych procesów metabolicznych oraz odgrywają kluczową rolę w sygnalizacji hormonalnej i rozwoju roślin. Na przykład u rzodkiewnika (*A. thaliana*), kukurydzy i ryżu miR172 bierze udział w rozwoju kwiatów, a miR164 w rozwoju korzeni (Unver i in., 2009). Roślinne miRNA mają także wpływ na funkcjonowanie merystemów wierzchołkowych i powstawanie wiązek przewodzących u roślin (Emery i in., 2003; Carra i in., 2009). Co bardzo charakterystyczne, miRNA biorą również udział w odpowiedzi komórek roślinnych na stres, zarówno biotyczny (np. na zakażenie wirusami, bakteriami, grzybami, nicieniami); (Navarro i in., 2008), jak i abiotyczny (np. susza, zasolenie, zmiany temperatur, obecność metali ciężkich, promieniowanie UV); (Jones-Rhoades i in., 2006; Kruska K i in., 2012), a poziom ekspresji wybranych miRNA może być regulowany przez czynniki stresowe (Unver i in., 2010). Zaangażowanie cząsteczek miRNA w odpowiedź na stres abiotyczny jest szeroko opisane w literaturze. Udowodniono, że miR398 bierze udział w odpowiedzi rośliny na stres oksydacyjny oraz stres zwiększonego zasolenia (Sunkar i in., 2006; Jagadeeswaran i in., 2009). Natomiast miR393, miR319, miR397, miR169 i miR171 mogą być zaangażowane w odpowiedź rośliny na stres suszy (Sunkar i Zhu, 2004; Zhao i in., 2007; Jian i in., 2010). Ponadto kilkanaście roślinnych cząsteczek miRNA zostało powiązanych ze stresem zimna (Zhang i in., 2009; Lv i in., 2010). Udział cząsteczek miRNA w odpowiedzi na stres biotyczny również został szeroko opisany w literaturze naukowej. Dla wielu gatunków roślin zidentyfikowano miRNA zaangażowane w odpowiedź na infekcję wirusową. U *Arabidopsis* zauważono, że podczas infekcji wirusem ORMV (ang. *oilseed rape mosaic virus*) zwiększeniu ulega poziom ekspresji wielu sRNA, w tym miRNA (np. miR164), ta-siRNA (ang. *trans-acting siRNA*), miRNA\* oraz pojawiają się nowe cząsteczki siRNA (powstające z prekursorów miRNA) nazwane ml-siRNA (ang. *miRNA-like siRNAs*) (Hu i in., 2011) (Bazzini i in., 2009). U gatunku *Brassica rapa* zauważono, że bra-miR1885 może być indukowany infekcją wirusa TuMV (ang. *Turnip Mosaic Virus*; (He i in., 2008). Cząsteczki miRNA zaangażowane w odpowiedź na infekcję wirusową zostały również zidentyfikowane dla ryżu (Du i in., 2011) i pomidora

(Lang i in., 2011). Wydaje się, że w przypadku infekcji wirusowej odpowiedź cząsteczek miRNA jest masowa i odgrywa pomocniczą w stosunku do cząsteczek siRNA rolę w mechanizmie wyciszania (Perez-Quintero i in., 2010; Kruszka K i in., 2012). Z tego względu trudno wyróżnić pojedyncze miRNA zaangażowane w tę odpowiedź (Kruszka K i in., 2012). W porównaniu do doniesień dotyczących infekcji wirusowych udział miRNA w odpowiedzi roślin na zakażenie bakteryjne jest precyzyjniej określony. Wykazano, że miR393 bierze udział w kształtowaniu odporności na bakterie u *A. thaliana* poprzez hamowanie szlaku sygnalizacyjnego auksyn, co ogranicza wzrost bakterii (Navarro i in., 2006). Inne przykłady cząsteczek miRNA zaangażowanych w odpowiedź roślin na stres bakteryjny to: miR160, miR167, miR159, miR319, miR825 i miR398 (Fahlgren i in., 2007; Jagadeeswaran i in., 2009; Zhang i in., 2011; Eldem i in., 2013).

Biogeneza miRNA u zwierząt przebiega nieco inaczej niż u roślin (Rysunek 1. B). Na terenie jądra komórkowego pierwotny transkrypt miRNA (pri-miRNA) zostaje przycięty przez rybonukleazę III (RNAza III) Drosha, dając pre-miRNA. Precyzyjna obróbka pri-miRNA jest możliwa dzięki białku zawierającemu domenę dsRBD (z ang. *double-stranded RNA-binding domain*), które współpracuje z Drosha. U *Drosophila* jest to białko Pasha, u *C. Elegans* – Pash-1, a u ssaków – DGCR8 (Denli i in., 2004; Gregory i in., 2004; Han i in., 2004). Powstała cząsteczka pre-miRNA ma kształt spinki do włosów i dłuższy o dwa lub trzy nukleotydy koniec 3' i w przeciwieństwie do roślinnego odpowiednika jest transportowana z jądra do cytoplazmy. Odbywa się to przy udziale białek Eksportyny 5 i Ran (GTP-azy), które rozpoznają specyficzną strukturę na końcu pre-miRNA (Yi i in., 2003; Bohnsack i in., 2004). W cytoplazmie druga RNAza III o nazwie Dicer wraz z towarzyszącym jej białkiem z domeną dsRDB (Loquacious u *Drosophila* lub TRBP u człowieka) przycinają pre-miRNA do dupleksu miRNA:miRNA\* o długości około 22 nt. (Bernstein i in., 2001; Grishok i in., 2001; Chendrimada i in., 2005). W kolejnym etapie dochodzi do degradacji miRNA\*, natomiast dojrzałe miRNA łączy się z białkami Ago tworząc kompleks RISC (Pratt i MacRae, 2009).

Aktywne kompleksy miRNP u zwierząt mogą przecinać transkrypty docelowe, jak to się dzieje np. w przypadku miR127, miR136, miR196 czy miR431 (Mansfield i in., 2004; Yekta i in., 2004). Jednakże ze względu na krótszy odcinek sparowania pomiędzy miRNA a transkryptem docelowym częściej spotykany u zwierząt jest mechanizm hamowania translacji (Olsen i Ambros, 1999). Cząsteczki miRNA wiążą się głównie do rejonu 3'UTR transkryptu docelowego. Do sparowania dochodzi tylko w części sekwencji miRNA na końcu 5', w tzw. rejonie *seed* obejmującym nukleotydy 2–7 lub 2–8 (Lewis i in., 2003;

Brennecke i in., 2005; Lewis i in., 2005). Ze względu na krótki odcinek sparowania pomiędzy miRNA a transkryptem przewiduje się również, że pojedyncza miRNA może u zwierząt regulować ekspresję stosunkowo większej liczby genów niż u roślin (Lewis i in., 2005).

Cząsteczki miRNA u zwierząt są zaangażowane w liczne procesy rozwojowe. Wśród nich można wyróżnić: procesy metaboliczne, proliferację komórek, apoptozę, różnicowanie neuronów (Klein i in., 2005), morfogenezę mózgu (Giraldez i in., 2005), różnicowanie się komórek tkanki mięśniowej (Naguibneva i in., 2006) czy podział komórek macierzystych (Hatfield i in., 2005). Wiele z powyższych funkcji miRNA zaobserwowano na podstawie badań nad mutantami białek biogenezy miRNA. Na przykład u *Drosophila* osobniki z mutacją genu *Dicer* przejawiają zaburzony podział komórek linii zarodkowej (Hatfield i in., 2005). Podobnie u *C. elegans* w wyniku mutacji genu *Dicer* dochodzi do uszkodzenia linii zarodkowej, a u Danio pręgowanego i u myszy do zaburzonej morfogenezy embrionów (Knight i Bass, 2001; Bernstein i in., 2003; Wienholds i in., 2003; Hatfield i in., 2005). Podobne efekty zaobserwowano u *Drosophila* i *C. elegans* posiadających mutacje w genach kodujących białka Ago (Cox i in., 1998; Grishok i in., 2001).

U człowieka zaburzenia w funkcjonowaniu miRNA powiązane z licznymi chorobami (Ardekani i Naeini, 2010). Przede wszystkim zbyt duża lub zbyt mała ekspresja miRNA jest charakterystyczna dla wielu typów nowotworów, m.in.: jajnika, jelita grubego czy krwi (Naeini i Ardekani, 2009). Ponadto nadmiar lub niedobór miRNA został zaobserwowany w wielu innych chorobach, w tym w chorobach sercowo-naczyniowych oraz zawale mięśnia sercowego (Ikeda i in., 2007), chorobach autoimmunologicznych (O'Connell i in., 2007; Tili i in., 2008), chorobach neurorozwojowych (Chang i in., 2009) i chorobach wątroby (Chen, 2009). Przewiduje się, że miRNA będą w bliskiej przyszłości używane do diagnostyki i leczenia nowotworów (Naeini i Ardekani, 2009). Szczegółowe informacje na temat wpływu miRNA na choroby u człowieka zebrano w bazie miR2Disease (Jiang i in., 2009).

## 1.2 Metody identyfikacji cząsteczek mikroRNA

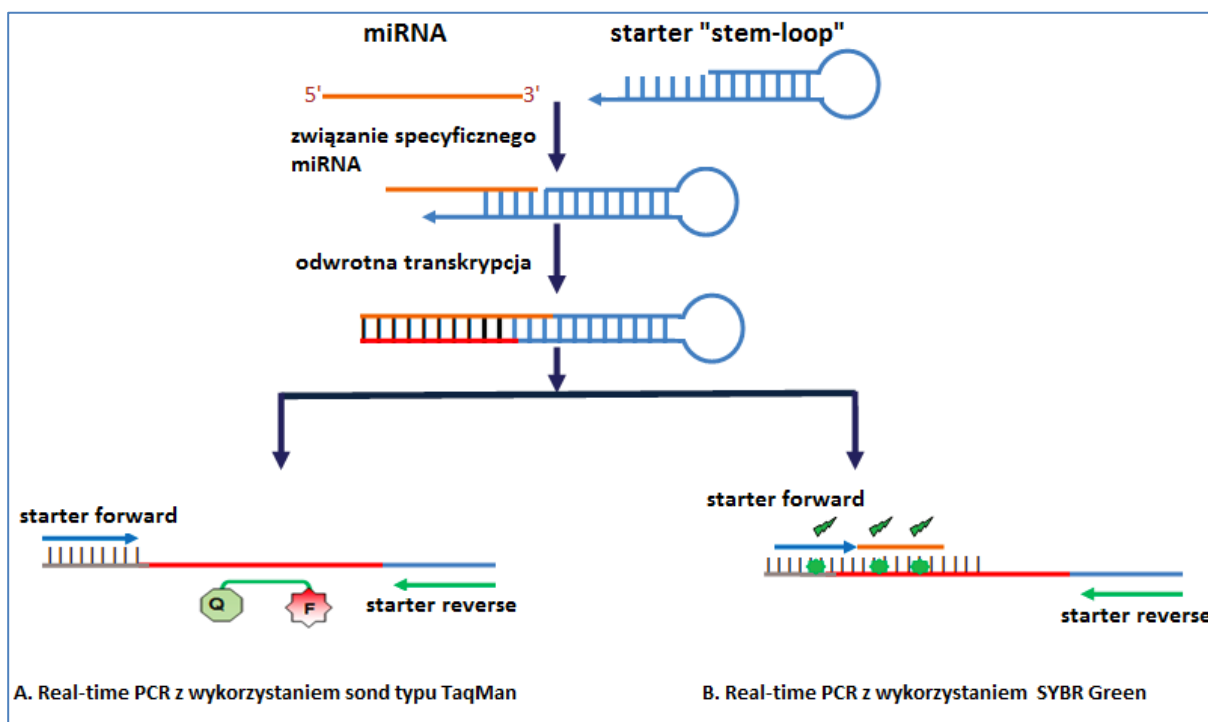
W celu zrozumienia mechanizmów regulacji ekspresji genów przez miRNA i lepszego poznania ich funkcji, niezbędne jest posiadanie pełnego katalogu tych cząsteczek. W tym celu niezbędne jest rozwijanie metod ich precyzyjnej identyfikacji. Wśród metod identyfikacji miRNA możemy wyróżnić metody *in silico* oraz metody eksperymentalne, przy czym połączenie obu metod jest obecnie uważane za najbardziej wiarygodne. Do metod *in silico* można zaliczyć metody oparte na homologii, czyli szukające sekwencji podobnych do znanych miRNA (Szczesniak i Makalowska, 2014) oraz metody *de novo* pozwalające odkryć nieznaną wcześniej miRNA (Gudys i in., 2013). Metody eksperymentalne natomiast można podzielić na cztery kategorie: 1) klonowanie, 2) reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction* – *real-time PCR*), 3) sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next generation sequencing* – NGS), 4) metody oparte na hybrydyzacji, w tym mikromacierze, hybrydyzacja typu *northern* oraz hybrydyzacja *in situ* (Eldem i in., 2013). Należy nadmienić, że mimo różnorodności dostępnych metod identyfikacja miRNA nadal niesie ze sobą trudności związane z ich długością, często bardzo niskim poziomem ekspresji oraz występowaniem licznych rodzin miRNA, czyli cząsteczek miRNA jedynie nieznacznie różniących się sekwencją oraz przejawiających najczęściej podobny wzór ekspresji (Eldem i in., 2013).

Klonowanie (ang. *direct cloning*) to jedna z pierwszych metod identyfikacji miRNA (Lau i in., 2001). Metoda jest wieloetapowa i polega m.in. na wyizolowaniu z żelu poliakrylamidowego puli krótkich RNA, przeprowadzeniu odwrotnej transkrypcji, wklonowaniu do wektora bakteryjnego (np. TOPO TA) i zsekwencjonowaniu insertów (Lau i in., 2001). Pozwala na zidentyfikowanie zarówno nowych cząsteczek, jak i potwierdzenie już znanych, jest jednak bardzo czasochłonna.

*Real-time PCR* to metoda uznawana za dokładną, czułą i specyficzną w kontekście analiz dojrzałych miRNA. Pozwala na określenie poziomu ekspresji miRNA o niskich poziomach ekspresji. Dla większości miRNA możliwe jest precyzyjne określenie ich ekspresji z puli całkowitego RNA nawet jeśli ich ilość sięga zaledwie 25 pg (Chen i in., 2005). Jako metoda PCR ilościowej nie pozwala jednak na zidentyfikowanie nowych miRNA. Ponadto ma pewne niedoskonałości wynikające głównie z cech miRNA. Na przykład ich krótka sekwencja czy brak ogona poli(A) w dojrzałym miRNA są przyczyną konieczności przeprowadzenia złożonej reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem startera *stem-loop* (Benes i Castoldi, 2010). Niemniej jednak, *real-time PCR* jest metodą



powszechnie stosowaną do potwierdzania poziomów ekspresji określonych wcześniej metodami NGS i dlatego wykorzystano ją również w niniejszej pracy. Główne etapy metody to: 1) reakcja odwrotnej transkrypcji przeprowadzona z użyciem startera *stem-loop* specyficznego dla danego miRNA i 2) właściwa RT-PCR z wykorzystaniem sond typu TaqMan lub odczynnika SYBR Green (Rysunek 2). Sondy typu TaqMan są bardziej specyficzne, gdyż wiążą się i dają sygnał tylko po związaniu z oczekiwanym produktem reakcji, podczas gdy SYBR Green wiąże się z każdym dwuniciowym DNA i może dawać sygnał również dla niespecyficznych produktów reakcji lub ze sparowanych starterów. Niemniej jednak, SYBR Green jest szeroko stosowany do identyfikacji miRNA ze względu na niski koszt oraz wysoką czułość (Raymond i in., 2005; Varkonyi-Gasic i in., 2007; Sharbati-Tehrani i in., 2008).



Rysunek 2. Schemat reakcji *stem-loop* RT-PCR. F – znacznik fluorescencyjny; Q – cząsteczka wygaszająca fluorescencję; zielone trójkąty – sygnał emitowany przez SYBR Green; zmodyfikowano za (Eldem i in., 2013)

Sekwencjonowanie nowej generacji jest techniką nowoczesną i wysokoprzepustową. Jest obecnie szeroko stosowana m. in. do sekwencjonowania genomów (ang. *DNA-seq*; (Velasco i in., 2010), transkryptomów (ang. *RNA-seq*; (Wei i in., 2011; Hansey i in., 2012), resekwencjonowania genomów (Ashelford i in., 2011), analizy oddziaływań DNA-białko (ang. *ChIP-seq*; (Kaufmann i in., 2010) oraz analiz epigenomu, np. metylacji DNA (Masser i in., 2015). Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie małych RNA (ang. *sRNA-seq*) stało się również powszechną metodą identyfikacji cząsteczek

miRNA oraz innych małych RNA – ze względu na wysoką czułość oraz coraz niższe koszty. Od 2005 roku, kiedy firma 454 Life Sciences wyprodukowała pierwszy sekwenator w technologii NGS (aparatury GS20), powstało i nadal powstaje coraz więcej platform i urządzeń tego typu. Różnią się przede wszystkim stosowanymi metodami amplifikacji i samego sekwencjonowania, a w konsekwencji takimi parametrami, jak długość odczytów, ilość błędów w wynikach sekwencjonowania, liczba generowanych odczytów czy koszty użytkowania (Liu i in., 2012). Dlatego różne platformy znalazły zastosowania do różnych metod. Obecnie najpopularniejszymi platformami stosowanymi do sekwencjonowania małych RNA są: Illumina, Roche 454 i SOLiD (Applied Biosystems; Eldem i in., 2013). Technologia NGS ma tę przewagę nad innymi metodami identyfikacji miRNA, że nie mają na nią wpływu takie cechy miRNA, jak ich mała długość, niski poziom ekspresji, niestabilność czy zanieczyszczenia innymi rodzajami RNA. Ponadto, w odróżnieniu od większości metod *in silico*, umożliwia identyfikację nowych rodzin miRNA oraz szacunkową informację o poziomie ekspresji miRNA. Zaletą jest również możliwość analizy całego transkryptomu małych RNA jednocześnie. Do wad metody *sRNA-seq* można zaliczyć potrzebę obróbki bioinformatycznej i związane z nią niejasne kryteria identyfikacji wynikające z dużej ilości dostępnych programów. Bazując na różnych podejściach i parametrach programy te generują często odmienne wyniki.

Otrzymane w wyniku analizy wyników NGS, tzw. surowe odczyty wymagają złożonej obróbki bioinformatycznej w celu odróżnienia cząsteczki miRNA od innych krótkich cząsteczek RNA oraz możliwie najtrafniejszego zadnotowania genu *MIR*. Niemniej jednak, wyniki uzyskane metodami NGS, ze względu na niską specyficzność, wymagają dodatkowego potwierdzenia eksperymentalnego. Kryteria eksperymentalnej identyfikacji miRNA u roślin i zwierząt zostały po raz pierwszy opisane w 2003 roku (Ambros i in., 2003). Autorzy podzielili je na kryteria ekspresji (potwierdzenie ekspresji metodą hybrydyzacji *northern* lub klonowania) oraz biogenezy (dotyczące parametrów prekursora oraz ewolucyjnego zakonserwowania sekwencji miRNA). Ze względu na różną charakterystykę prekursorów miRNA u roślin i zwierząt, jak również lepsze poznanie innych małych RNA podobnych do miRNA (np. siRNA), z czasem kryteria musiały zostać uszczegółowione. Meyers i in. (2008) określili kryteria identyfikacji miRNA dla roślin. Według autorów podstawowym kryterium jest precyzyjne wycinanie dupleksu miRNA:miRNA\* o długości około 21 nt. z trzonu spinki prekursora. Mimo że długość roślinnych prekursorów miRNA jest bardzo zróżnicowana (Bartel, 2004), zdaniem Meyersa i wsp. prawidłowo zidentyfikowane prekursory powinny charakteryzować się następującymi

cechami: 1) dojrzała cząsteczka miRNA powinna znajdować się na przeciwległym ramieniu spinki w stosunku do miRNA\* z przesunięciem ich sekwencji względem siebie o 2 nt., 2) sekwencja dojrzałej miRNA musi być komplementarna do przeciwległego rejonu trzonu spinki, przy czym dopuszczalne są cztery niesparowania pomiędzy zasadami, 3) w obrębie trzonu spinki mogą pojawiać się asymetryczne wybrzuszenia, jednak powinny być niewielkie (1–2 nt.), zwłaszcza w rejonie sekwencji miRNA. Autorzy zwrócili również uwagę na warunek, aby zsekwencjonowane sRNA w rejonie dupleksu miRNA:miRNA\* stanowiły przynajmniej 25%. Ponadto zdefiniowano kryteria pomocnicze dotyczące: 1) konserwacji struktury prekursorów oraz sekwencji dojrzałej miRNA, 2) występowania funkcjonalnych sekwencji docelowych dla miRNA, 3) biogenezy zależnej od białka DCL1 oraz 4) biogenezy niezależnej od polimeraz RDR, PolIV i PolV (Meyers i in., 2008). Ze względu na złożoność procesu przewidywania cząsteczek miRNA powstało wiele narzędzi bioinformatycznych ułatwiających tę analizę. Wśród obecnie dostępnych narzędzi przeznaczonych dla roślinnych miRNA warto wymienić: miRDeep-P (Yang i Li, 2011), ShortStack (Axtell, 2013b), „UEA sRNA workbench” (Stocks i in., 2012), miRPlant (An i in., 2014) czy miRA (Evers i in., 2015).

Metody oparte na hybrydyzacji, podobnie jak te oparte na PCR, bazują na znanych już sekwencjach dojrzałych miRNA, nie pozwalają więc na zidentyfikowanie nowych cząsteczek. Ich głównym celem jest określenie poziomów ekspresji miRNA w konkretnym materiale. Wśród metod opartych na hybrydyzacji wyróżnić można: hybrydyzację typu *northern*, hybrydyzację *in situ* oraz mikromacierze. Podczas hybrydyzacji typu *northern* miRNA hybryduje z radioaktywną sondą komplementarną na całej długości lub w jej części. Metoda pozwala wskazać względne ilości miRNA w puli całkowitego RNA. Jej wadą natomiast jest potrzeba dużej ilości RNA oraz czasochłonny protokół (Pall i Hamilton, 2008; Varallyay i in., 2008; Lopez-Gomollon, 2011). Hybrydyzacja *in situ* (ang. *in situ hybridisation* - ISH), w przeciwieństwie do innych metod opartych na hybrydyzacji, pozwala zlokalizować miRNA w czasie i przestrzeni w tkankach i komórkach. Metoda jest również bardzo czasochłonna, gdyż składa się z wielu etapów (Kidner i Timmermans, 2006). Została jednak z powodzeniem zastosowana do badań nad udziałem miRNA w procesach rozwojowych u *Arabidopsis* i kukurydzy (Juarez i in., 2004; Kidner i Martienssen, 2004). Metody oparte na mikromacierzach pozwalają określić ekspresję tysięcy miRNA w pojedynczym eksperymencie. Jest to technika stosunkowo tania, jednakże analiza statystyczna i normalizacja danych jest dość trudna i czasochłonna. W badaniach na roślinach mikromacierze były stosowane m.in. do analizy roli miRNA

w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego (Liu i in., 2008; Ding i in., 2009; Ding i in., 2011; Guo i in., 2011).

### 1.3 Cząsteczki mikroRNA u jabłoni

Pierwsze doniesienia dotyczące miRNA u jabłoni bazowały na ich identyfikacji opartej na sekwencjach EST (sekwencyjnych znacznikach ekspresji; z ang. *expressed sequence tags*) z wykorzystaniem metod bioinformatycznych. W ten sposób zespół A.P. Gleave zidentyfikował w 2008 roku 10 pierwotnych transkryptów miRNA należących do siedmiu zakonserwowanych rodzin (miR156, miR159, miR162, miR167, miR172, miR393, miR398) i potwierdził ich obecność w tkankach jabłoni za pomocą analizy *northern blot* (Gleave i in., 2008). Również na podstawie sekwencji EST jabłoni zidentyfikowano i potwierdzono eksperymentalnie za pomocą techniki miR-RACE 31 miRNA należących do 16 rodzin (Yu i in., 2011). Natomiast zespół Varkonyi-Gasic potwierdził ekspresję 18 sekwencji zakonserwowanych miRNA z uwzględnieniem ekspresji różnicowej w sześciu różnych tkankach jabłoni przy użyciu techniki *northern blot* (Varkonyi-Gasic i in., 2010). Zsekwencjonowanie genomu jabłoni w 2010 roku (Velasco i in., 2010) umożliwiło wykorzystanie technik głębokiego sekwencjonowania do identyfikacji zarówno zakonserwowanych, jak i specyficznych dla jabłoni – cząsteczek miRNA. Po raz pierwszy zostało to wykonane przez zespół R. Xia (Xia i in., 2012), który zidentyfikował 33 zakonserwowane oraz 42 specyficzne dla jabłoni miRNA lub ich rodziny, jak również 118 docelowych dla nich transkryptów. Jest to do tej pory najobszerniejszy zbiór miRNA stworzony dla jabłoni. Stanowi zdecydowaną większość miRNA obecnie dostępnych w bazie danych miRBase (wersja 21), w której jest zarejestrowanych 206 miRNA jabłoni (*Malus domestica*). W literaturze można jednak znaleźć wiele innych, niezdeponowanych w miRBase miRNA dla jabłoni zidentyfikowanych przy użyciu klonowania, głębokiego sekwencjonowania lub/i metod bioinformatycznych. Na przykład Ma i in. (2013), wykorzystując klonowanie małych RNA, a następnie analizę ich prekursorów, zidentyfikowali dziewięć nowych cząsteczek miRNA (Ma i in., 2013). Visser i in. (2014) wykorzystali metodę NGS do potwierdzenia 195 znanych dla jabłoni miRNA oraz zidentyfikowania 85 *loci* nowych miRNA (Visser i in., 2014). Natomiast bioinformatyczna analiza sekwencji EST dostępnych dla jabłoni pozwoliła zidentyfikować 27 nowych dojrzałych miRNA (Szczesniak i Makalowska, 2014).

## 1.4 Uprawa jabłoni w Polsce i na świecie

Jabłoń domowa (*Malus domestica*) to gatunek należący do rodziny różowatych wywodzący się z terenów Azji Centralnej. Powstał ze skrzyżowania dwóch dziko rosnących jabłoni *Malus pumila* i *Malus sieversii*. Pierwsze doniesienia o sadach jabłoniowych można znaleźć już w *Odysei* Homera, sięgają więc okresu 800–900 lat p.n.e. (Elzebroek i Wind, 2008). Początkowo jabłonie uprawiane były głównie w strefach klimatu umiarkowanego. Jednakże różnorodne techniki sadownicze, jak np. szczepienie, przycinanie, stosowanie środków ochrony roślin oraz nowoczesnych technik nawadniania, przyczyniły się do powstania odmian coraz bardziej odpornych na wysoką temperaturę. Obecnie, dzięki zastosowaniu zarówno konwencjonalnych metody uprawy i tworzenia nowych odmian, jak i inżynierii genetycznej, powstają coraz to nowe odmiany jabłoni odpornych nie tylko na wysoką temperaturę, ale także na inne stresy abiotyczne i biotyczne. Aktualnie znanych jest ponad 7500 odmian jabłoni (Elzebroek i Wind, 2008).

W sadownictwie w celu zachowania cech fenotypowych drzew rozmnaża się je bezpłciowo. W tym celu stosuje się przeszczepianie jabłoni na rośliny zwane podkładkami. Zauważono, że rodzaj podkładki ma wpływ na wiele cech fenotypowych zrazu (rośliny przeszczepianej), m.in. na wielkość drzewa, aktywność fotosyntetyczną tolerancję temperatury jak również na podatność na choroby, np. na zarazę ogniową (Fallahi i in., 2002; Ferree i in., 2003; Jensen i in., 2012). Ponadto podkładki wpływają na wielkość plonu, jakość owoców, wejście rośliny w okres owocowania i regularność owocowania (Terpiński, 1984). W celu zintensyfikowania produkcji w sadownictwie zwykle dąży się do uzyskania niskich drzew. Z tego względu stosuje się podkładki skarłające. Niestety, są one bardziej podatne na zarazę ogniową niż te, które nie ograniczają wielkości drzewa (Autio i Southwick, 1986).

Polska jest wiodącym producentem jabłek w Unii Europejskiej z wyrobioną pozycją na arenie międzynarodowej, gdzie wraz z Chinami, Stanami Zjednoczonymi i Turcją znajduje się w pierwszej czwórce największych producentów jabłek na świecie (FAO, 2012). Z siedmiu tysięcy hektarów upraw sadowniczych w Wielkopolsce aż 71% to właśnie jabłonie (GUS, 2013). Istotnym wydaje się więc prowadzenie intensywnych badań mających na celu utrzymanie konkurencyjności polskiego sadownictwa, jak również nawiązanie współpracy z innymi krajami doświadczonymi zarówno w produkcji, jak i w badaniach naukowych dotyczących jabłoni. Mimo że w ostatnich latach plony w Polsce okazały się bardzo udane (w następstwie dobrych warunków pogodowych),

ważnym elementem jest ochrona drzew przed chorobami oraz identyfikacja takich podkładek, które będą się najlepiej sprawdzały w naszych warunkach klimatycznych.

## 1.5 Wpływ podkładki na ekspresję genów w zrazie

Mechanizmy leżące u podstaw regulowania cech fenotypowych zrazu przez podkładkę nie zostały jeszcze dokładnie poznane. Wiadomo jednak, że rodzaj podkładki ma wpływ na poziom ekspresji wielu transkryptów w pędach zrazu. Mikromacierzowe analizy profilu ekspresji genów jabłoni odmiany „Gala” rosnącej na różnych podkładkach wykazały, że profil ten w pędach jabłoni znacznie się różni pomiędzy zrazami szczepionymi na podkładki warunkujące różną wysokość drzew oraz różną odporność na zarazę ogniową. Zidentyfikowano 116 transkryptów, których poziom ekspresji jest skorelowany z wysokością drzewa. Natomiast z odpornością na zarazę ogniową skorelowano aż 690 transkryptów (Jensen i in., 2012). Może z tego wynikać, że podatność na choroby jest cechą, której określenie jest możliwe jeszcze przed infekcją na podstawie wzoru ekspresji genów. Mogłoby to być wykorzystane w przyszłości do oceny siewek jabłoni przed rozpoczęciem ich uprawy, pozwalając zaoszczędzić czas i ograniczyć uprawę podatnych na infekcję drzew (Jensen i in., 2012). Dokładnie nie wiadomo, jakie są mechanizmy regulacji ekspresji tych genów. Jednakże odkrycia dotyczące długodystansowego transportu miRNA pozwalają wysunąć hipotezę, że mogą one być transportowane z podkładki do zrazu i wpływać na ekspresję jego genów (Kim i in., 2001). Autorzy tej pracy zauważyli również, że większość transkryptów wykazujących zwiększoną ekspresję w odpornych na zarazę ogniową drzewach w innych badaniach wykazywała obniżoną ekspresję podczas infekcji bakterią *E. amylovora* (Norelli i in., 2009; Baldo i in., 2010; Sarowar i in., 2011). Może to oznaczać, że obniżona ekspresja tych genów jest wywołana obecnością bakterii.

## 1.6 Zaraza ogniowa

Zaraza ogniowa należy do najbardziej szkodliwych chorób jabłoni i grusz. Może również pojawiać się na takich krzewach, jak: pigwa, irga czy nieśplik japoński. Jest to choroba bakteryjna wywoływana przez Gram-ujemną bakterię *Erwinia amylovora*. Bakterie mogą wnikać do rośliny przez aparaty szparkowe, przetchlinki, uszkodzenia tkanek lub znamiona słupków. Następnie transportowane są wiązkami przewodzącymi

(infekcja systemiczna), wywołując nekrozę liści, pędów, korzeni, kwiatów lub owoców. Zainfekowane zawiązki owoców stają się gąbczaste, natomiast liście brunatnieją i usychają, wyglądają jak spalone i stąd nazwa choroby (Vanneste, 2000). Bakterie zimują najczęściej w korze i jej naroślach, aby na wiosnę zacząć intensywnie się namnażać. Objawia się to rozrostem narośli i wydzielaniem z nich klejącego płynu zawierającego bakterie i polisacharydy ułatwiające rozprzestrzenianie się bakterii (Geider, 2000).

Mimo że *E. amylovora* została po raz pierwszy opisana ponad 200 lat temu, mechanizmy molekularne zachodzące pomiędzy patogenem a rośliną (żywicielem) nie zostały jeszcze poznane. Wiadomo, że komórki bakteryjne zawierają geny białek efektorowych wydzielanych do rośliny. Geny te zlokalizowane są w rejonie zwanym T3SS (ang. *type III secretion pathogenicity island*). W tej grupie genów znajdują się takie, które wywołują objawy chorobowe u podatnych drzew oraz reakcję nadwrażliwości zarówno u podatnych, jak i odpornych roślin (Oh i in., 2005). Należą do nich m.in. geny białek HrpA, HrpN, HrpW, AvrRpt2, HopC1, DspE/A (Zhao i in., 2005). Wyniki badań pokazują, że białka efektorowe regulują reakcje obronne roślin oraz wspomagają namnażanie i rozprzestrzenianie komórek bakteryjnych (Sarowar i in., 2011). Wskazuje się, że białka DspE i HrpN są zaangażowane w obumieranie komórek roślinnych, odkładanie kalozy, indukowanie wzrostu bakterii i akumulację reaktywnych form tlenu (Degraeve i in., 2008). Podjęto również próby identyfikacji białek roślinnych, na które oddziałują białka efektorowe. Wykazano, że u jabłoni koniec N białka DspE oddziałuje z czterema podobnymi kinazami serynowo-treoninowymi RLK (ang. *receptor-like kinase*) zawierającymi motyw LRR (ang. *leucine-rich repeat*; (Meng i in., 2006). Natomiast koniec C białka DspE oddziałuje z prekursorem ferredoksyny służącej jako nośnik elektronów w fotosystemie I. Doniesienia wskazują, że białko DspE może hamować transdukcję sygnałów i fotosyntezę w komórkach jabłoni w celu ułatwienia infekcji (Khan i in., 2012). Patogenność bakterii *E. amylovora* zależy więc od ekspresji genów rejonu T3SS, ale również od wytwarzania amyloworanu – polisacharydu syntetyzowanego na bazie grupy genów *ams* (z ang. *amylovoran synthesis gene cluster*). Amyloworan blokuje wiązki przewodzące rośliny, jak również hamuje jej reakcje obronne oraz przyczynia się do tworzenia biofilmu (Koczan i in., 2009).

W ciągu ostatnich 25 lat liczba zakażeń *E. amylovora* w sadach komercyjnych wzrosła ze względu na intensywną uprawę z użyciem karłowatych, podatnych na chorobę podkładek (Norelli i in., 2003). Zakażenia sadów jabłoniowych są przyczyną ogromnych strat w produkcji jabłek na całym świecie, sięgających nawet 100 mln dolarów rocznie

(Norelli i in., 2003). Z uwagi na swoje ekonomiczne znaczenie zaraza ogniowa została wpisana na listę dziesięciu najbardziej patogennych bakterii (Mansfield i in., 2012).

Nie opracowano jeszcze skutecznej metody leczenia zarazy ogniowej i wszelkie działania mają jedynie charakter profilaktyczny. W Unii Europejskiej stosowanie antybiotyków w sadach jest zakazane, natomiast w krajach gdzie stosowany był antybiotyk, doszło do wykształcenia szczepów bakterii opornych na streptomycynę (McManus i in., 2002; McGhee i in., 2011) i w rezultacie spadła skuteczność tej metody. Ponadto wykorzystanie różnych środków chemicznych (np. związków miedzi) do walki z *E. amylovora* często wywołuje skutki uboczne, takie jak brązowienie liści i owoców. Stosowane metody polegają więc głównie na zapobieganiu rozwojowi choroby, np. poprzez przycinanie i palenie zakażonych pędów. Innym kierunkiem badań nad odpornością na zarazę ogniową jest analiza *loci* cech ilościowych (ang. *quantitative trait loci* – QTL) w celu znalezienia markerów odporności. Selekcja odmian w oparciu o tę metodę (ang. *marker-assisted selection* – MAS) może doprowadzić do uzyskania odpornych odmian jabłoni. Mimo że metoda jest bardzo złożona i czasochłonna, kilka markerów zostało już zidentyfikowanych (Gardiner i in., 2012). Z uwagi na niedoskonałości powyższych metod stosowanie odpowiednich podkładek oraz poznawanie mechanizmów regulowania przez nie ekspresji genów w zrazach może doprowadzić do rozwoju skuteczniejszych i bezpieczniejszych dla środowiska i konsumentów metod walki z zarazą ogniową (Vogt i in., 2013). Poznanie udziału miRNA w regulacji reakcji obronnych roślin mogłoby się przyczynić do rozwoju skuteczniejszych metod ochrony upraw jabłoni.



## 2 Cel pracy

Celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie miRNA u jabłoni odmiany „Gala” i określenie zależnych od podkładki różnic w ich ekspresji, ze szczególnym uwzględnieniem miRNA zaangażowanych w kształtowanie odporności na zarazę ogniową. W badaniach opierano się głównie na metodach głębokiego sekwencjonowania oraz analizach bioinformatycznych. Praca została podzielona na dwa etapy odpowiadające dwóm podrzędnym celom projektu:

1. Zidentyfikowanie miRNA charakterystycznych dla badanych podkładek (M.27, B.9, M.111 i G.30) poprzez porównanie ekspresji miRNA zidentyfikowanych w zdrowych drzewach odmiany „Gala” rosnących na podkładkach o różnej odporności na zarazę ogniową.
2. Zidentyfikowanie miRNA zaangażowanych w odpowiedź jabłoni na zakażenie bakterią *Erwinia amylovora* poprzez porównanie poziomów ekspresji miRNA zidentyfikowanych w drzewach zakażonych i niezakażonych bakterią.

### 3 Materiały i metody

W niniejszym rozdziale opisane zostały użyte materiały oraz metody wspólne dla obu części projektu. Natomiast metody specyficzne dla każdej z części omówiono wraz z wynikami w odpowiednich podrozdziałach.

#### 3.1 Materiał roślinny

Materiałem roślinnym wykorzystanym do izolacji całkowitego RNA były jabłonie odmiany „Crimson Gala” rosnące w sadach Uniwersytetu Stanowego w Pensylwanii (ang. *Pennsylvania State University*) w miejscowości Rock Springs w Pensylwanii (USA). W 2005 roku pędy odmiany „Crimson Gala” zostały przeszczepione na następujące podkłádki:

- a) Malling EMLA 27 (M.27) – silnie redukująca wzrost drzew. Wyselekcjonowana została poprzez skrzyżowanie podkładek M.13 i M.9 w 1934 roku w Maidstone (Kent) w Anglii; jest wysoce podatna na zarazę ogniową (<http://articles.extension.org/pages/60917/apple-rootstock-info>);
- b) Budagovsky 9 (B.9) – otrzymana w wyniku skrzyżowania podkładek M.8 i Red standard w Rosji; nieco słabiej redukuje wzrost jabłoni niż M.27 i jest mniej podatna na zarazę ogniową, podatna jest natomiast na mszyce bawełnicowate (<http://articles.extension.org/pages/60917/apple-rootstock-info>);
- c) Malling merton 111 EMLA (M.111) – uzyskano ją w 1952 roku poprzez skrzyżowanie odmian Merton 793 i Northern Spy w Anglii; półskarłająca podkłádka, odporna na mszyce bawełnicowate i częściowo odporna na zarazę ogniową (<http://articles.extension.org/pages/60917/apple-rootstock-info>);
- d) Geneva 30 (G.30) – podkłádka uzyskana poprzez skrzyżowanie podkładek M.9 i Robusta 5, wprowadzona w Genewie (stan Nowy Jork); warunkuje wysoką odporność na zarazę ogniową, ale jest silnie podatna na mszyce bawełnicowate; ponadto wpływa na zwiększoną kruchość gałęzi, dlatego gałęzie drzew muszą być lepiej podpierane (<http://articles.extension.org/pages/60917/apple-rootstock-info>).

W przeprowadzonych badaniach wykorzystane zostały pędy i liście pochodzące ze zrazów odmiany „Crimson Gala”. Szczegółowe informacje dotyczące fragmentów roślin oraz sposób ich pobierania zostały opisane w rozdziale 4 („Wyniki”).

### 3.2 Inokulacja

Liście były inokulowane zgodnie z opublikowanym w 2009 roku protokołem (Norelli i in., 2009). Pięć górnych liści na każdym pędzie nacinane było nożyczkami zanurzonymi wcześniej w zawieszynie bakterii *Erwinia amylovora*, szczepu HKN06P1 o stężeniu  $1 \times 10^9$  CFU/ml, zawieszonych w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6,5. Materiał kontrolny nacinany był w ten sam sposób, ale roztwór nie zawierał bakterii. Następnie pędy umieszczono w wodzie zawierającej nawóz, nakryto folią, aby uchronić przed utratą wilgoci i przechowywano w temperaturze 18°C. Miały zapewnione 14 godzin światła i 10 godzin ciemności. Dwie i 72 godziny po nacięciu (ang. *hours post inoculation* – HPI) liście zostały zerwane, zawinięte w folię aluminiową, zanurzone w ciekłym azocie i umieszczenie w temperaturze –80°C do momentu izolacji RNA.

### 3.3 Izolacja RNA

Procedura izolacji RNA opracowana dla drzew owocowych o wysokiej zawartości polisacharydów i polifenoli (Hu i in., 2002) została zmodyfikowana i dostosowana do posiadanego materiału biologicznego. Zamrożony materiał roślinny został zmielony na proszek w schłodzonym ciekłym azocie mózdzierzu, a następnie zmieszany z buforem do ekstrakcji zawierającym: 2% bromku cetyltrimetyloamoniowego (CTAB), 2% poliwinylpyrolidonu (PVP), 100 mM buforu Tris o pH 8,0, 25 mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego (EDTA), 2 M chlorku sodu (NaCl), 0,5 g/l spermidyny, 2% beta-merkaptoetanolu. Mieszaninę inkubowano przez 15 minut w 60°C. Następnie próby poddano dwukrotnej ekstrakcji chloroformem i alkoholem izoamyłowym (proporcje 24 : 1). Na zakończenie próby precypitowano w 0,8 M LiCl i izopropanolu przez całą noc w 4°C. Pomiaru stężenia i czystości otrzymanego RNA dokonano z użyciem urządzenia NanoDrop (marki Thermo Fisher Scientific). Jakość RNA natomiast określono za pomocą aparatu

Agilent Bioanalyser. Pozwoliło to wybrać do dalszych analiz tylko próbki charakteryzujące się parametrem integralności RIN (z ang. *RNA integrity number*) powyżej 8.

### **3.4 Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)**

Sekwencjonowanie nowej generacji zostało przeprowadzone w laboratorium analiz genomowych przy Uniwersytecie Stanowym w Pensylwanii (USA).

1. W analizach mających na celu zidentyfikowanie miRNA specyficznych dla podkładki, biblioteki małych RNA zostały przygotowane za pomocą zestawu odczynników firmy Life Technologies („Total RNA-Seq Kit”) zgodnie z zaleceniami producenta. Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone na aparacie SOLiD 5500 xl z użyciem pięcionukleotydowych barkodów. Uzyskano odczyty długości 35 nt.
2. W analizach mających na celu zidentyfikowanie miRNA zaangażowanych w odpowiedź jabłoni na zakażenie bakteryjne 18 bibliotek małych RNA zostało przygotowanych z użyciem zestawu TruSeq Small RNA Preparation Kit (marki Illumina) według protokołu producenta. Otrzymano sekwencje długości 50 nt., sekwencjonowane z jednego końca (ang. *single end*) technologią Illumina HiSeq 2500.

### **3.5 Analiza bioinformatyczna**

#### **3.5.1 Wstępna obróbka danych pochodzących z wysokoprzepustowego sekwencjonowania**

Do analizy danych *sRNA-seq* zastosowano zestaw ogólnodostępnych narzędzi bioinformatycznych oraz własne skrypty napisane w języku Python i Perl. W przypadku danych pochodzących z aparatu SOLiD pierwszym etapem obróbki surowych odczytów była konwersja plików do formatu FASTQ. Następnie usunięto sekwencje adaptorów i przepisano oryginalny format *color space* na *base space*, czyli na sekwencję nukleotydową. Do wykonania powyższych etapów wykorzystano własne skrypty napisane w języku Perl. W przypadku danych otrzymanych technologią Illumina konwersja formatów nie była

konieczna, a sekwencje adaptorów zostały usunięte programem ShortStack. Za pomocą narzędzia Fastx collapser usunięto redundancję na poziomie sekwencji. Rozkład długości odczytów został obliczony przy użyciu własnego skryptu (Rysunek 3) zarówno dla odczytów nieredundantnych, jak i redundantnych.

```
import sys, fileinput

input = sys.argv[1]

##### redundant
dict_counts = {}

for line in fileinput.input(input):
    line = line.replace('\n', '')
    if '>' in line:
        count = int(line.split('-')[1])
    else:
        seq = line
        length = len(seq)
        try:
            dict_counts[length] += count
        except:
            dict_counts[length] = count

for length in dict_counts.keys():
    count = dict_counts[length]
    print str(length) + '\t' + str(count)

#### non-redundant
dict_counts = {}

for line in fileinput.input(input):
    line = line.replace('\n', '')
    if '>' in line:
        pass
    else:
        seq = line
        length = len(seq)
        try:
            dict_counts[length] += 1
        except:
            dict_counts[length] = 1

print "\n\n"
for length in dict_counts.keys():
    count = dict_counts[length]
    print str(length) + '\t' + str(count)
```

Rysunek 3. Skrypt napisany w celu obliczenia rozkładu długości odczytów dla każdej z bibliotek sRNA

### 3.5.2 Identyfikacja cząsteczek mikroRNA jabłoni

Etapy związane z identyfikacją cząsteczek miRNA zostały wykonane innymi metodami w obu częściach projektu. Cząsteczki specyficzne dla podkładki zostały zidentyfikowane przy pomocy własnego potoku analitycznego. Natomiast miRNA zaangażowane w odpowiedź jabłoni na zakażenie bakteryjne przeanalizowano przy użyciu programu ShortStack. Szczegóły dotyczące identyfikacji zostały opisane w odpowiednich podrozdziałach rozdziału 4 („Wyniki”).

### 3.5.3 Identyfikacja transkryptów docelowych dla cząsteczek mikroRNA jabłoni

Transkrypty będące potencjalnie regulowane przez miRNA były identyfikowane przy użyciu programu psRNATarget (Dai i Zhao, 2011) z ustawieniami domyślnymi, za wyjątkiem parametru *length for complementarity scoring*, który z domyślnie ustawionej wartości 20 zmieniono na wartość odpowiadającą długości dojrzałego miRNA, czyli od 21 do 24 nt. Zestaw transkryptów jabłoni użytych do analizy składał się z sekwencji kodujących (tzw. CDS, z ang. *coding DNA sequence*) przewidzianych dla genomu jabłoni (wersja 1.0) i pobranych z bazy GDR (ang. *Genome Database for Rosaceae*; (Jung i in., 2014). Ponadto do puli transkryptów dodano zidentyfikowane dla jabłoni transkrypty pochodzące z bazy UniGene (Wheeler i in., 2005) pobrane w lutym 2013 roku. W pierwszej części pracy transkrypty docelowe były przewidywane dla wszystkich zidentyfikowanych miRNA. W drugiej natomiast – tylko dla miRNA uznanych za nowe.

Dodatkowo przewidywano transkrypty docelowe w oparciu o dane degradomowe (ang. *degradome seq*) jabłoni pobrane z bazy GEO (ang. *Gene Expression Omnibus*; (Edgar i in., 2002) w postaci biblioteki GSM880656. Jako mRNA jabłoni użyto tego samego zestawu, co wspomniany powyżej, a analizę wykonano programem PAREsnip (Folkes i in., 2012). Parametry ustawiono tak, aby program zwracał tylko transkrypty docelowe o najwyższej jakości, czyli kategorii 0, 1 i 2. Minimalną długość odczytu w degradomie ustawiono na 20, a maksymalną na 21 nt., natomiast maksymalną liczbę niesparowań w dupleksie miRNA:target ustawiono na 4. Wartość *P-value* pozostała domyślna, czyli 0,05. Następnie usunięto redundantne pary miRNA i ich transkryptów docelowych za pomocą własnego skryptu napisanego w języku Python. Na zakończenie wykorzystano program Bowtie (Langmead i in., 2009) do zmapowania odczytów

degradomowych do transkryptów docelowych dla miRNA i w sposób graficzny przedstawiono zmapowane odczyty, co jest dostępne w stworzonej w ramach projektu doktoranckiego bazie danych.

### **3.5.4 Przypisywanie terminów GO otrzymanym transkryptom docelowym dla cząsteczek mikroRNA**

W celu poznania funkcji otrzymanych transkryptów docelowych dla miRNA jabłoni przypisano im terminy GO (ang. *gene ontology*) oraz przeprowadzono analizę funkcji nadreprezentowanych transkryptów (tzw. GSEA; ang. *gene set enrichment analysis*). Najpierw poszukano u rzodkiewnika potencjalnych homologów genów docelowych dla cząsteczek miRNA jabłoni. W tym celu pobrano zbiór komplementarnych DNA (cDNA) dla *A. thaliana* dostępny w bazie Ensembl Plants w wersji 17 (Kersey i in., 2010). Przy użyciu narzędzia BLASTN porównano te sekwencje z sekwencjami transkryptów docelowych miRNA jabłoni. Wybierano sekwencje o największym podobieństwie do danego transkryptu docelowego, przy czym parametr *E-value* musiał być mniejszy niż 0,001. Uzyskany w ten sposób zbiór genów *A. thaliana* posłużył jako dane wyjściowe do analizy terminów GO przeprowadzonej przy użyciu narzędzia GOrilla (Eden i in., 2009). Zidentyfikowanie homologów genów jabłoni wśród genów rzodkiewnika było niezbędne, gdyż większość programów do analiz GSEA bazuje na danych tylko dla organizmów modelowych. W analizie użyto następujących ustawień: *all ontologies: proces, function, component* i *two unranked lists of genes: target and background*, przy czym *background* stanowiła lista wszystkich genów pobrana z bazy Ensembl Plants przy użyciu narzędzia BioMart.

## **3.6 Metody eksperymentalne**

### **3.6.1 *Stem-loop* RT-PCR w czasie rzeczywistym**

Wybrane na podstawie analiz bioinformatycznych dojrzałe miRNA jabłoni były potwierdzane eksperymentalnie przy użyciu metody *stem-loop* RT (z ang. reverse transcription)-PCR w czasie rzeczywistym (ang. *real-time*), zgodnie z opublikowanym protokołem (Chen i in., 2005; Varkonyi-Gasic i in., 2007). Każda PCR w czasie

rzeczywistym była poprzedzona zwykłą PCR (ang. *end point PCR*) z obserwacją produktu na żelu agarozowym. Startery zostały zaprojektowane przy użyciu programu Primer BLAST (Ye i in., 2012) i Primer3Plus (Untergasser i in., 2007) i są zebrane w tabeli 1. Gen U6 RNA został użyty jako gen referencyjny do obliczenia względnej ekspresji wyrażonej parametrem  $\Delta Ct$ .

**Tabela 1. Startery zaprojektowane dla siedmiu dojrzałych cząsteczek mikroRNA do reakcji *stem-loop* RT-PCR**

miRNA	Starter	Sekwencja startera (5'–3')
mdm-miR167b-g	<i>stem-loop</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATAC GACTAGATC
	<i>forward</i>	CGCTTGAAGCTGCCAGCAT
mdm-miR169a	<i>stem-loop</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATAC GACCCGGCA
	<i>forward</i>	CGCTCAGCCAAGGATGACT
mdm-miR399a-c	<i>stem-loop</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATAC GACCAGGGC
	<i>forward</i>	CCGCTTGCCAAAGGAGAATT
mdm-miR227N	<i>stem-loop</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATAC GACACATGG
	<i>forward</i>	GCCGCTAAGTTCATTCAAACA
mdm-miR168a,b	<i>stem-loop</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATAC GACAGCGGT
	<i>forward</i>	TACTTGGTGCAGGTCGGGA
mdm-miR194C	<i>stem-loop</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATAC GACATTCGT
	<i>forward</i>	GCCCGCACGATATACGATGA
mdm-miR121C	<i>stem-loop</i>	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATAC GACCACAGA
	<i>forward</i>	CGGCGTTTTACCTATCCCAT
<b>Uniwersalny starter</b>	<i>reverse</i>	GTGCAGGGTCCGAGGT
<b>kontrola U6</b>	<i>forward</i>	GATAAAATTGGAACGATACAG
	<i>reverse</i>	GGACCATTCTCGATTTATGCG

1. Pierwszym etapem procedury *stem-loop* RT-PCR była reakcja DNazowania wyizolowanego RNA. Wykorzystano do tego zestaw odczynników firmy Thermo Fisher Scientific. Procedura DNazowania wykonana była zgodnie z protokołem, czyli zmieszano w probówce Eppendorfa po 1  $\mu\text{g}$  RNA, 1  $\mu\text{l}$  buforu  $10 \times$  DNaseI, 1  $\mu\text{l}$  DNaseI i uzupełniono do 10  $\mu\text{l}$  wodą wolną od RNaz. Następnie inkubowano przez 30 min w temperaturze 37°C. Do prób dodano po 1  $\mu\text{l}$  25 mM EDTA i inkubowano przez 10 min w temperaturze 65°C.



2. Drugim etapem procedury *stem-loop* RT-PCR była reakcja odwrotnej transkrypcji ze zmiennymi parametrami, tzw. *pulsed reverse transcription*, która zapewnia lepszą od standardowej procedury specyficzność reakcji. W etapie tym specyficzny dla danego miRNA starter tworzący spinkę jest najpierw hybrydyzowany do sekwencji dojrzałego miRNA, a następnie cały produkt przepisywany jest na cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji. Wykorzystano do tej reakcji zestaw odczynników firmy Invitrogen (SuperScript III RT) lub Lucigen (NxGen M-MuLV RT). Reakcję przeprowadzono dla każdej próby RNA. Każdorazowo przygotowano również kontrolę bez matrycy oraz dla każdej z prób RNA również kontrole bez odwrotnej transkryptazy w celu wykluczenia zanieczyszczeń genomowym DNA.

Na początku przygotowano mieszaninę o składzie przedstawionym w tabeli 2.

**Tabela 2. Składniki mieszaniny reakcyjnej do reakcji denaturacji poprzedzającej odwrotną transkrypcję**

Składnik	Ilość
RNA	1 µg
starter <i>stem-loop</i> (1 µM)	0,75 µl
starter <i>reverse</i> dla U6 (1 µM)	0,25 µl
dNTP Mix 10 mM	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>	11,5 µl

Następnie mieszaninę inkubowano przez 5 min w temperaturze 65°C, przeniesiono do lodu na przynajmniej 1 min, krótko zwirowano próby i do każdej dodano: 4 µl buforu 5 × FirstStrand, 2 µl DTT (0,1 M,) 0,1 µl RNasin Plus (40 U/µl), 0,25 µl enzymu SuperScript III RT (200 U/µl). Wymieszano próby przez delikatne pipetowanie i przeprowadzono odwrotną transkrypcję według profilu przedstawionego w tabeli 3.

**Tabela 3. Profil reakcji odwrotnej transkrypcji**

Etap	Temperatura[°C]	Czas [min]	Liczba powtórzeń
1	16	30:00	1
2	30	0:30	60
3	42	0:30	
4	50	0:01	
5	70	15:00	1
6	4	∞	1

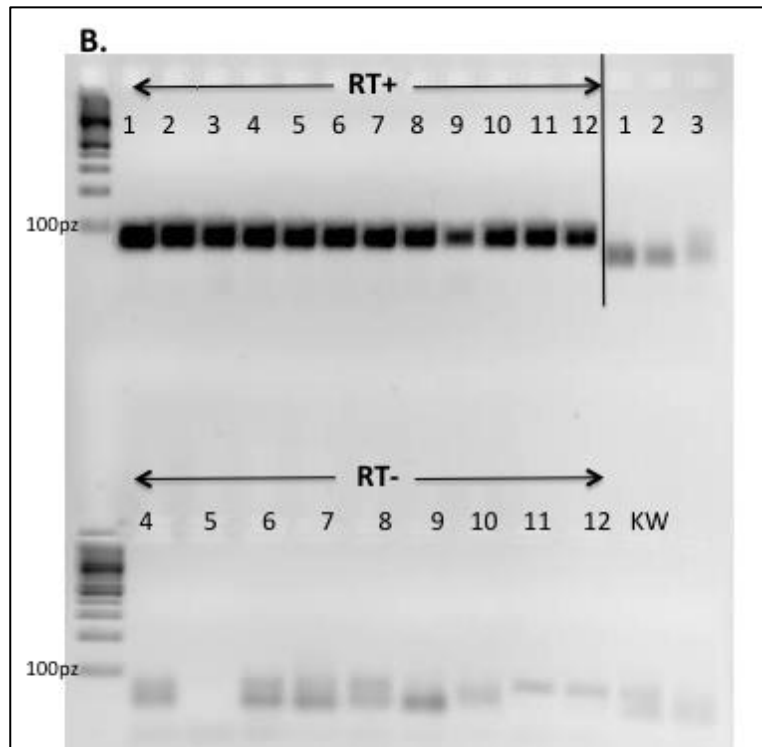
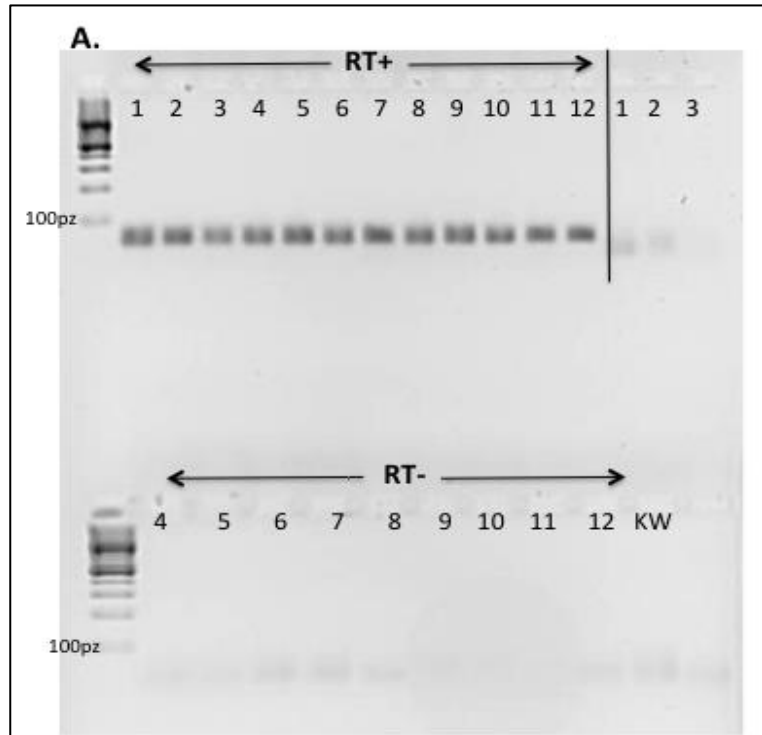
3. Trzecim etapem procedury *stem-loop* RT-PCR była *real-time* PCR przeprowadzona na aparacie Applied Biosystems 7900HT. Po reakcji odwrotnej transkrypcji otrzymane

matryce cDNA rozcieńczono dziesięciokrotnie. Zanim jednak nastawiono *real-time* PCR, dla każdego miRNA przeprowadzano kontrolnie standardową PCR (ang. *end point PCR*), w celu sprawdzenia na żelu agarozowym, czy zaprojektowane startery pozwalają uzyskać oczekiwanej długości produkt. Reakcję przeprowadzano w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 1 µl cDNA (matryca), 5 µl mieszaniny EconoTaq PLUS 2 × Master Mix firmy Lucigen, 1 µl odpowiednich starterów (10 µM) i 3 µl wody. Reakcja przeprowadzana była na aparacie Pro Flex PCR (Thermo Fisher Scientific) z zastosowaniem profilu przedstawionego w tabeli 4.

**Tabela 4. Profil kontrolnej PCR przeprowadzanej przed PCR w czasie rzeczywistym dla tych samych starterów**

<b>Etap</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Czas [min]</b>	<b>Liczba powtórzeń</b>
1	95	3:00	1
2	95	0:30	35–40
3	51–56	0:30	
4	72	1:00	
5	4	∞	1

Każdorazowo reakcja była przeprowadzana dla cDNA otrzymanego z RNA z udziałem odwrotnej transkryptazy (próby RT+), jak również dla prób kontrolnych bez dodatku odwrotnej transkryptazy (próby RT–) oraz dla prób z samą wodą. Przykładowy wynik, potwierdzający brak produktu dla prób RT– i kontroli wodnej dla mdm-miR227N oraz genu referencyjnego U6 przedstawiono na zdjęciach poniżej (Rysunek 4).



**Rysunek 4. Produkty PCR dla mdm-miR227N (A) i genu referencyjnego U6 (B) na 3-procentowym żelu agarozowym. Reakcję przeprowadzono na cDNA uzyskanym z udziałem odwrotnej transkryptazy (RT+) oraz kontrolnie bez jej udziału (RT-); kontrola wodna (KW)**

PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzano w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej matrycę oraz odczynnik Power SYBR Green PCR Master Mix firmy Applied Biosystems i po 0,4 µl starterów (10 µM). Do reakcji używano 384-dołkowych płytek. Wykorzystano przedstawiony w tabeli 5 profil reakcji wraz z analizą krzywej topnienia, która umożliwiła potwierdzenie specyficzności otrzymanych produktów.

**Tabela 5. Profil reakcji *stem-loop* RT PCR**

<b>Étap</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Czas [min]</b>	<b>Liczba powtórzeń</b>
1	95	15:00	1
2	95	0:15	35
3	53	0:30	
4	72	0:30	

Analizę wyników przeprowadzono na oprogramowaniu SDS Software 2.3. Otrzymane produkty dla wszystkich miRNA były specyficzne. Przygotowana seria rozcieńczeń matrycy posłużyła do obliczenia efektywności reakcji. Obliczony został względny poziom ekspresji dla każdego miRNA w stosunku do genu referencyjnego U6 RNA przy użyciu równania:  $2^{-\Delta Ct} \times 10^6$ , gdzie  $Ct = (Ct_{miRNA} - Ct_{U6RNA})$ .

### **3.6.2 Reakcja RT-PCR dla nowych prekursorów cząsteczek mikroRNA**

Reakcja PCR miała na celu potwierdzenie ekspresji prekursorów przewidzianych, nowych miRNA dla jabłoni. Poprzedzona była DNazowaniem całkowitego RNA jabłoni, a następnie reakcją odwrotnej transkrypcji przeprowadzanej według standardowego protokołu dostarczonego przez producentów (firmy Invitrogen lub Lucigen). Do reakcji użyto również losowych starterów (ang. *random primers*) firmy Promega w celu przepisania na cDNA różnych rejonów RNA. Następnie w PCR wykorzystano startery zaprojektowane na końcu prekursorów miRNA (Tabela 6).

**Tabela 6. Sekwencje starterów wykorzystanych do reakcji RT-PCR na prekursorzy wybranych cząsteczek mikroRNA**

<b>miRNA</b>	<b>Kierunek</b>	<b>Sekwencja startera (5'-3')</b>
mdm-miR227N	<i>forward</i>	AGGACTTGAATCATTGTATTTTGTG
	<i>reverse</i>	TCAAAGAAATGAAAAGTTCGGCA
mdm-miR260N	<i>forward</i>	ACTTACATGGAACATGAGATGCAA
	<i>reverse</i>	ACTGAGATGCCAAGGTGATAGT
mdm-miR285N	<i>forward</i>	CATCCTCAATATGGTGTGTTGGA
	<i>reverse</i>	ACAGGTCTCTTCTCAAAGCAA
mdm-miR200N	<i>forward</i>	AGGGAAGGGATCGATAAGTAGTA
	<i>reverse</i>	GGACGAGTTTTGTGGTGGTG
mdm-miR132N	<i>forward</i>	TGGAACATGAGATGCGATGGT
	<i>reverse</i>	CTCGAGAAGAGCTGACATGC
mdm-miR188C	<i>forward</i>	TCCCCACATCCTAGTCGTTT
	<i>reverse</i>	TGTATCGTGCAGTCAGAAATCA
mdm-miR143C	<i>forward</i>	TTGGAATACTCATCGAATTT
	<i>reverse</i>	TGTCAGAGTGTTCTAGCTGTGC
mdm-miR1185C(1)	<i>forward</i>	CGCAGATAGGAGCTGACGG
	<i>reverse</i>	AAGCTGAGCGTAGTTGACAGA
mdm-miR282C	<i>forward</i>	AAGGGAAAGGGAGGAACAGC
	<i>reverse</i>	GGGAAAGGGAGATTGGAGCT
mdm-miR455C	<i>forward</i>	TCCACTTCCCAACTTTTCCCT
	<i>reverse</i>	TGCAATGATGTAGTTCGCATGT
mdm-miR1406C	<i>forward</i>	TTTCATTCTACACTCCAAACTTTCT
	<i>reverse</i>	TCAAATCAAGTGTTATTGGTACTCC
mdm-miR1185C(2)	<i>forward</i>	CAGAAGAAGGATGGGGATGA
	<i>reverse</i>	AATTTGGTTGGGACTTAGGG
mdm-miR121C	<i>forward</i>	GCAGCCACTGCAAAAGAAACT
	<i>reverse</i>	GTTTCAAAGAGCGGGATGTGT
mdm-miR1392C	<i>forward</i>	GTACATCGTGCGGTCAGAAA
	<i>reverse</i>	ATCCCTGGATCCTTTGGTGA

Reakcję PCR przeprowadzano w 10 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 5 µl mieszaniny EconoTaq PLUS 2 × Master Mix firmy Lucigen, 1 µl cDNA, 1 µl odpowiednich starterów (10 µM) i 3 µl wody. Reakcja przeprowadzana była na aparacie Pro Flex PCR (Thermo Fisher Scientific) z zastosowaniem profilu przedstawionego w tabeli 7.

**Tabela 7. Profil reakcji łańcuchowej polimerazy dla nowych prekursorów cząsteczek miRNA**

<b>Etap</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Czas [min]</b>	<b>Liczba powtórzeń</b>
1	94	2:00	1
2	94	0:30	35–40
3	51–56	0:30	
4	72	0:30	
5	4	∞	1

Otrzymane produkty oczekiwanej długości były izolowane z żelu i oddawane do sekwencjonowania w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w celu potwierdzenia ich sekwencji.

### **3.6.3 Elektroforeza**

Elektroforezę produktów PCR w żelu agarozowym z bromkiem etydydy przeprowadza się w celu poznania wielkości cząsteczek DNA oraz oszacowania ich ilości, na podstawie analizy prążków w świetle UV.

Na 1-, 2- lub 3-procentowy żel agarozowy (Prona, Basica LE) nakładano odpowiednią ilość produktu PCR zmieszanego z 2  $\mu$ l obciążacza LB. Jako wzorzec długości fragmentów DNA stosowano marker 50 lub 100 bp (Thermo Fisher Scientific). Elektroforezę przeprowadzano w buforze 1  $\times$  TBE, przy natężeniu prądu 40 mA, w przybliżeniu przez 60 minut na aparacie marki Major Science.

### **3.7 Sprzęt komputerowy**

W celu zrealizowania obliczeń i analiz komputerowych zostały wykorzystane następujące zasoby obliczeniowe Zakładu Bioinformatyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu:

- komputer PC,
- dwa serwery o parametrach:
  - Sun Microsystems: 12 rdzeni,  $\times$ 86\_64; RAM: 16 GB; przestrzeń dyskowa: 1 TB,
  - Dell: 12 rdzeni,  $\times$ 86\_64; RAM: 8 GB; przestrzeń dyskowa: 2 TB.

## 4 Wyniki

Celem pracy doktorskiej było zidentyfikowanie miRNA u jabłoni odmiany „Gala” i wykazanie różnic w ich ekspresji pomiędzy podkładkami, ze szczególnym uwzględnieniem miRNA zaangażowanych w kształtowanie odporności na zarazę ogniową. Pierwszym etapem była identyfikacja i analiza cząsteczek miRNA jabłoni „Gala”, których ekspresja zależała od rodzaju stosowanej podkładki. Do badań użyto zdrowych pędów rosnących na czterech podkładkach o zróżnicowanej odporności na zarazę ogniową. Identyfikacja miRNA oraz porównanie ich poziomów ekspresji miało na celu zbadanie wpływu podkładki na profil ekspresji miRNA. W dalszej części przeprowadzono identyfikację, analizę i porównanie miRNA w liściach inokulowanych bakteriami *Erwinia amylovora* oraz liściach nieinokulowanych (kontroli) w celu wytypowania cząsteczek miRNA jabłoni zaangażowanych w odpowiedź rośliny na zakażenie bakteryjne.

### 4.1 Identyfikacja i analiza ekspresji cząsteczek mikroRNA specyficznych dla podkładki u zdrowych jabłoni odmiany „Gala”

#### 4.1.1 Materiał biologiczny

W omawianej części projektu przeprowadzono procedurę *sRNA-seq* cząsteczek sRNA izolowanych z materiału roślinnego pochodzącego ze zdrowych drzew odmiany „Gala”. Materiał został pobrany z wierzchołków pędów drzew rosnących na czterech podkładkach warunkujących różną podatność jabłoni na zarazę ogniową. Wykorzystano następujące podkładki: M.27 i B.9 (uznawane za podatne na zarazę ogniową) oraz G.30 i M.111 (uznawane za odporne na zarazę ogniową). Wierzchołki pędów pobrane zostały latem 2011 roku w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdej podkładki, co dało dwanaście prób pochodzących z dwunastu różnych drzew. Materiał roślinny o masie około 0,5 g zawierał merystem i czubek młodego pędu do granicy pierwszego w pełni rozwiniętego liścia. Po odcięciu pędy został natychmiast zamrożone poprzez zanurzenie w ciekłym azocie i umieszczone w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu izolacji RNA.

#### 4.1.2 Charakterystyka bibliotek małych RNA

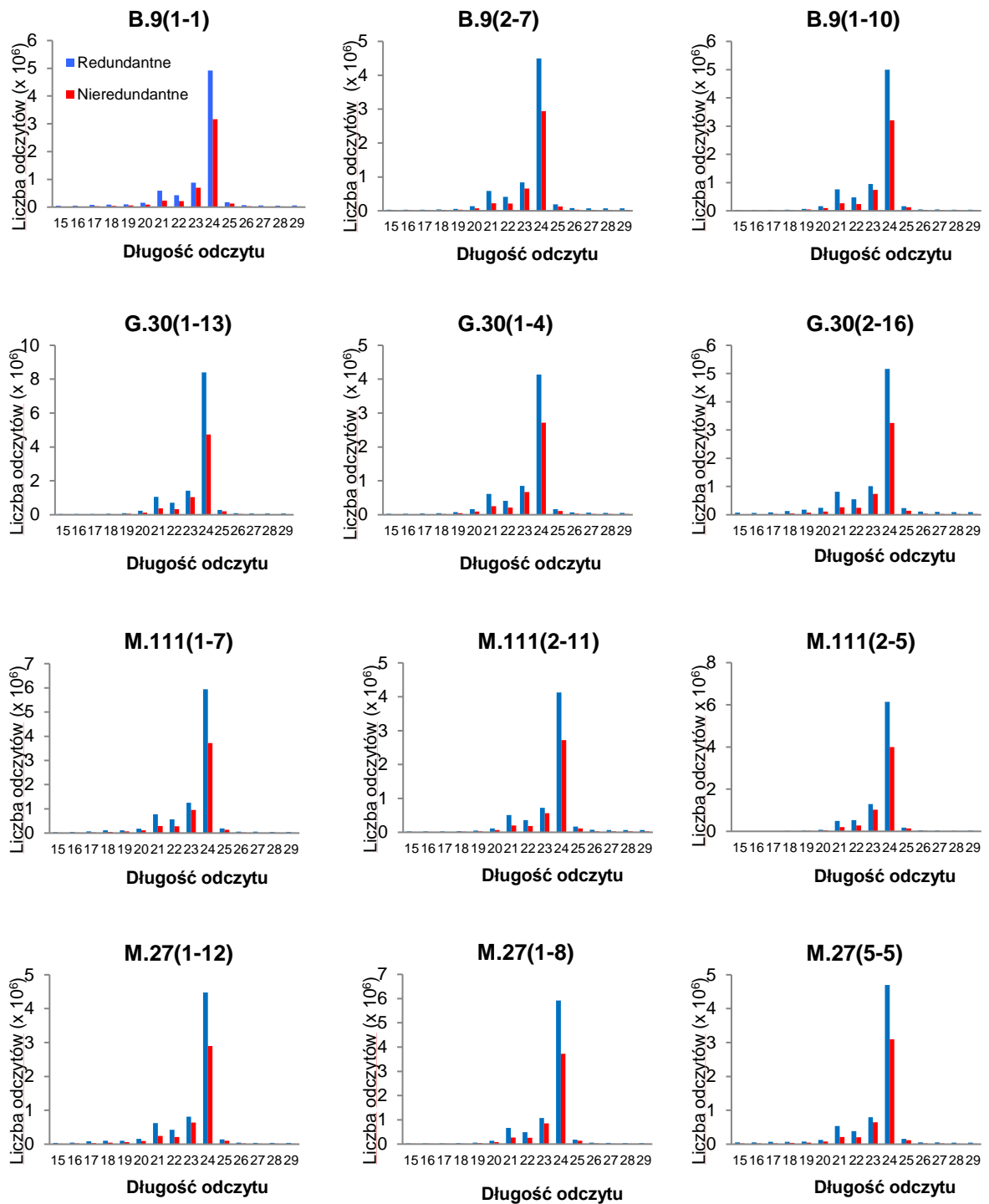
Po izolacji RNA przygotowano biblioteki sRNA i zsekwencjonowano. Otrzymane dane głębokiego sekwencjonowania przeprowadzonego na aparacie SOLiD poddano standardowej obróbce i filtrowaniu na podstawie parametrów jakości odczytów (patrz „Materiały i metody”). W sumie dla 12 bibliotek małych RNA otrzymano **105 646 291** dobrej jakości odczytów, w tym **63 365 291** różnych sekwencji. Tabela 8 zawiera podsumowanie liczby odczytów dla poszczególnych bibliotek na różnych etapach analizy. Wyniki zostały umieszczone w bazie danych GEO (ang. *Gene Expression Omnibus*), która jest międzynarodową bazą zarządzaną przez NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*) udostępniającą dane o ekspresji pochodzące z analiz wysokoprzepustowych i są dostępne poprzez identyfikator GSE59482.

**Tabela 8. Liczby odczytów dla dwunastu bibliotek małych RNA**

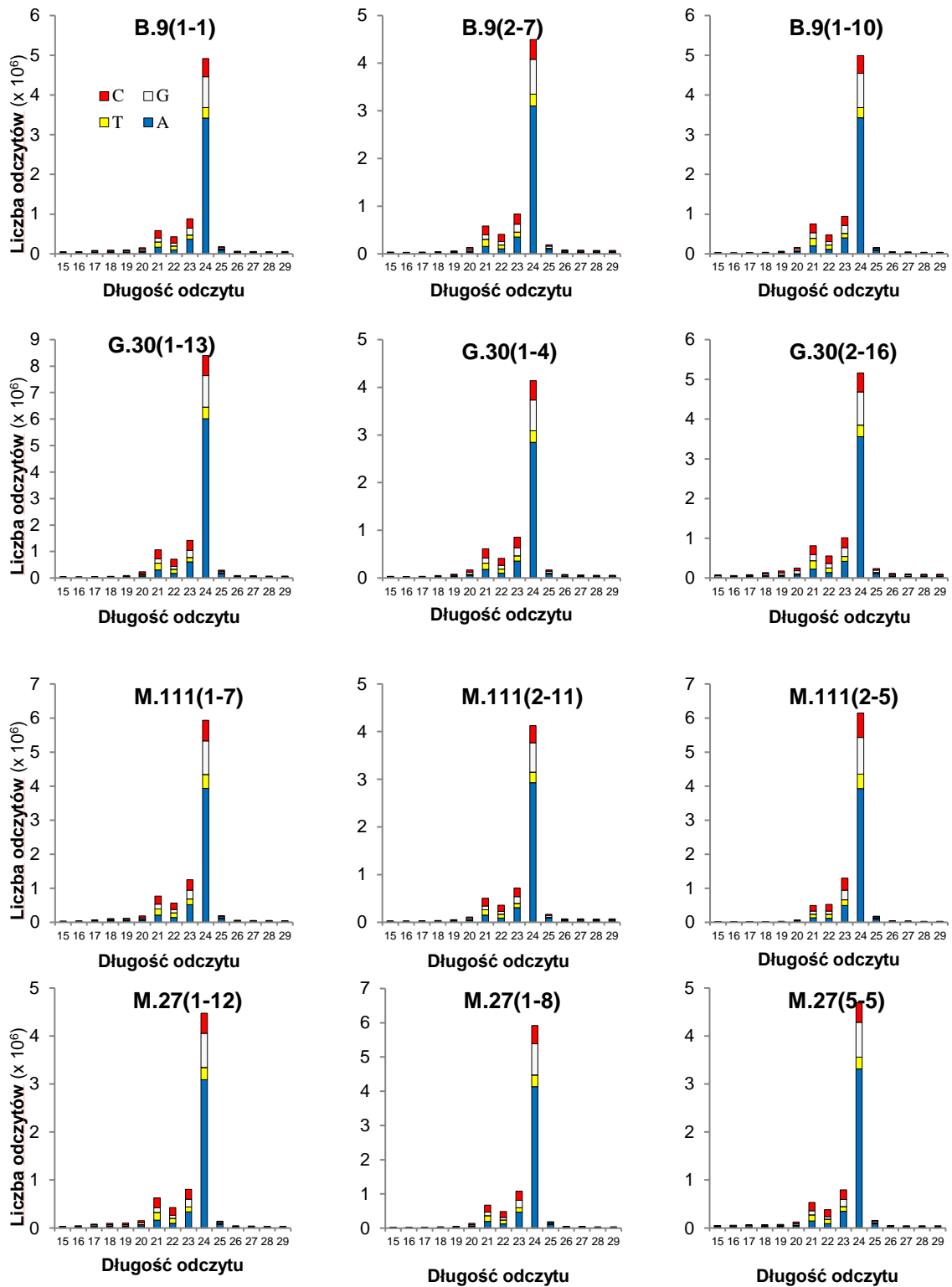
Podkładka	Powtórzenie biologiczne/ biblioteka	Wszystkie odczyty	Odczyty nie-redundantne	Odczyty zmapowane	Unikalnie zmapowane odczyty	GEO ID
G30	G30_1_13	13 508 088	7 476 433	3 331 410	2 005 324	GSM1437647
	G30_1_4	7 356 678	4 501 005	2 023 162	1 177 462	GSM1437648
	G30_2_16	9 658 863	5 297 527	2 444 320	1 421 477	GSM1437646
M111	M111_1_7	9 342 440	6 020 034	2 711 621	1 594 313	GSM1437650
	M111_2_11	6 972 702	4 257 823	1 982 604	1 158 505	GSM1437651
	M111_2_5	9 911 934	5 937 475	2 792 901	1 660 371	GSM1437649
M27	M27_1_12	7 454 766	4 565 541	2 160 985	1 257 201	GSM1437653
	M27_1_8	7 717 202	4 810 180	2 614 377	1 556 879	GSM1437654
	M27_5_5	9 244 238	5 695 331	2 241 778	1 319 054	GSM1437652
B9	B9_1_1	8 392 676	5 064 318	2 281 947	1 341 864	GSM1437644
	B9_2_7	7 776 382	4 709 566	2 194 291	1 290 793	GSM1437645
	B9_1_10	8 310 039	5 030 058	2 311 016	1 358 699	GSM1437643

Długość otrzymanych odczytów wynosiła od 17 do 29 nt., jednakże zdecydowaną większość we wszystkich bibliotekach stanowiły odczyty o długości od 21 do 24 nt., przy czym dominowały odczyty o długości 24 nt. Zarówno w przypadku odczytów redundantnych, czyli powtarzających się w danej bibliotece, jak i nieredundantnych odczytów długości 24 nt. stanowiły około 60% całkowitej liczby (Rysunek 5). Następne w kolejności pod względem liczby we wszystkich bibliotekach były sekwencje o długości 23 i 21 nt. Warto również zwrócić uwagę, że najczęściej pierwszym ich nukleotydem (na końcu 5') był nukleotyd adeninowy, co jest często obserwowane dla roślinnych endogennych siRNA (Rysunek 6; (Axtell, 2013a).





Rysunek 5. Liczba odczytów redundantnych i nieredundantnych w dwunastu bibliotekach małych RNA jabłoni

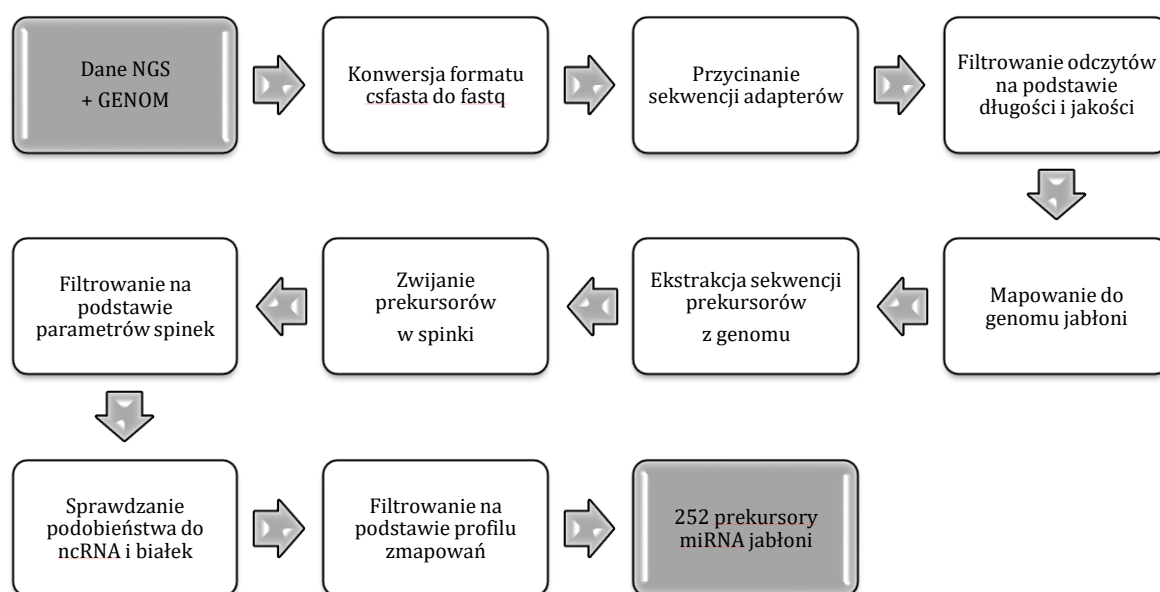


Rysunek 6. Rozkład długości i pierwszego nukleotydu w odczytach małych RNA w dwunastu bibliotekach jabłoni

### 4.1.3 Identyfikacja cząsteczek mikroRNA

W celu zidentyfikowania miRNA pochodzących z 12 bibliotek ze zdrowych pędów jabłoni opracowano schemat analityczny (Rysunek 7). Na początku przefiltrowane wcześniej odczyty zostały ze 100-procentową zgodnością sekwencji zmapowane do genomu jabłoni pobranego ze strony: [http://rosaceae.org/species/malus/malus\\_x\\_domestica/genome\\_v1.0](http://rosaceae.org/species/malus/malus_x_domestica/genome_v1.0). Następnie w oparciu o koordynaty zmapowanych odczytów z genomu wycięte zostały sekwencje odczytów wraz z flankującymi sekwencjami o długości 250 nt. powyżej oraz poniżej miejsca zmapowania. Odczyty te, stanowiące potencjalne cząsteczki dojrzałych miRNA, musiały mieć liczebność powyżej 2 RPM (z ang. *reads per million*) w danej bibliotece oraz długość w zakresie 19–22 nt., co pozwoliło ograniczyć liczbę wyników fałszywie dodatnich, tym bardziej że roślinne miRNA najczęściej są krótsze niż 23 nt. (Bartel, 2004). Otrzymane sekwencje genomowe stanowiące potencjalne sekwencje prekursorów miRNA, zwinięto w struktury drugorzędowe przy użyciu narzędzia *hybrid-ss-min* z pakietu UNAFold (Markham i Zuker, 2008) z domyślnymi ustawieniami. Na podstawie kryteriów identyfikacji miRNA u roślin (Meyers i in., 2008) do dalszych analiz zachowane zostały tylko te sekwencje, których struktury drugorzędowe: 1) miały nie więcej niż pięć niesparowań i dwa wybrzuszenia pomiędzy sekwencją dojrzałego miRNA i przeciwległym ramieniem spinki i 2) których dojrzałe miRNA były zlokalizowane w całości w jednym ramieniu spinki. Jeżeli otrzymana struktura drugorzędowa miała długie niesparowane końce, były one odcinane tak, aby ograniczyć się tylko do rejonu dwuniciowego, a dodatkowo długość ramienia spinki nie mogła być mniejsza niż 40 nt. Następnie sprawdzono, czy profil zmapowań odczytów do sekwencji genomowej jest zgodny z profilem charakterystycznym dla miRNA. Oznacza to, że do dalszych analiz zachowane zostały tylko te *loci* tworzące spinki, których: a) sekwencja uznana za dojrzałe miRNA stanowiła najliczniejszy zmapowany do spinki odczyt w co najmniej jednej bibliotece, b) liczebność każdego dojrzałego miRNA wynosiła przynajmniej 20% wszystkich odczytów zmapowanych do spinki w co najmniej jednej bibliotece, c) suma liczebności wszystkich sekwencji mających koniec 5' wspólny z sekwencją uznaną za dojrzałe miRNA była większa niż suma ekspresji odczytów zmapowanych w dowolnej innej pozycji (tzn. innym określonym końcu 5') spinki w co najmniej jednej bibliotece. Sekwencje mające więcej niż 60% rejonów o niskim poziomie złożoności (ang. *low complexity regions*) zostały zidentyfikowane przy użyciu programu Dustmasker z pakietu BLAST (Camacho i in., 2009), a następnie usunięte. Użyto ustawień domyślnych, za wyjątkiem

parametru *level* ustawionego na 15, zamiast sugerowanego 20, w celu zwiększenia czułości narzędzia. Na koniec za pomocą narzędzia BLAST wyszukano i usunięto sekwencje podobne do znanych białek (pobrane z bazy UniProtKB/Swiss-Prot) i innych niż miRNA niekodujących RNA (pobrane z bazy RFAM). Usunięte zostały sekwencje, których przyrównanie uzyskało wartość parametru *E-value* mniejszą niż  $1e-20$  dla białek i  $1e-10$  dla RNA.



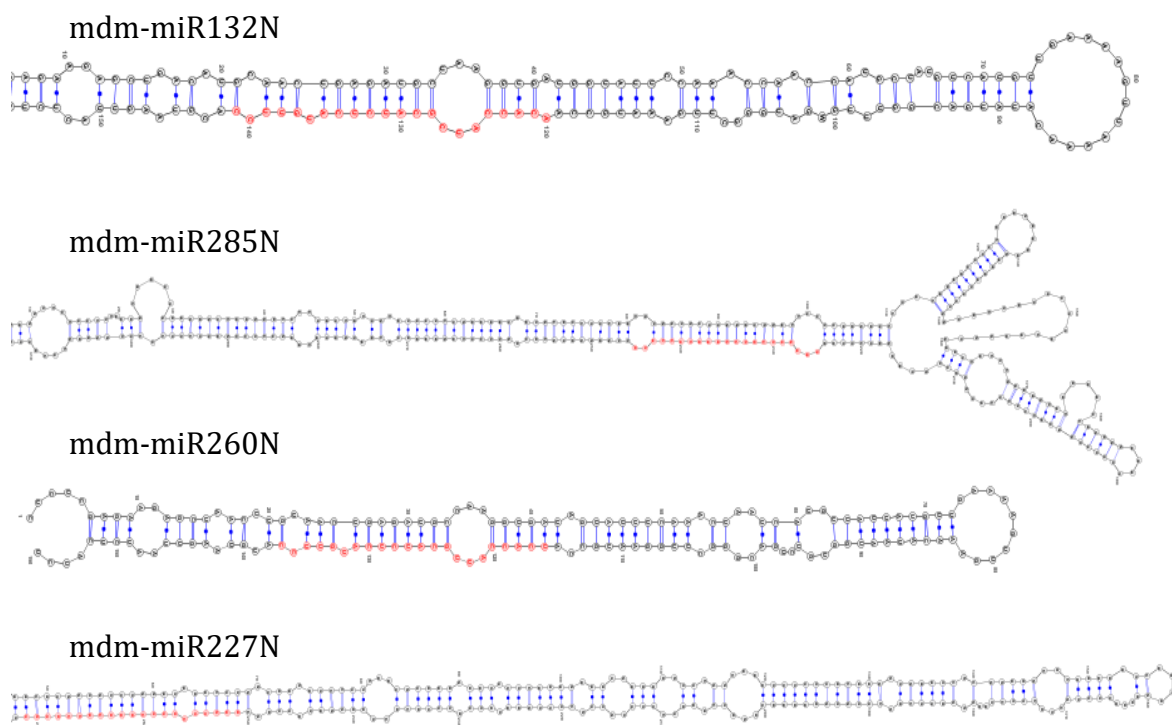
**Rysunek 7. Schemat analityczny zastosowany w celu identyfikacji prekursorów cząsteczek mikroRNA u jabłoni**

W rezultacie opisanej powyżej analizy otrzymano **252** miRNA, z czego 114 uznano za zakonserwowane wśród gatunków roślinnych, a pozostałe 138 za cząsteczki specyficzne dla jabłoni. Na podstawie podobieństwa do znanych miRNA jabłoni i innych gatunków podzielono miRNA na 4 grupy: 1) zakonserwowane i nowe (wykazujące podobieństwo do miRNA z innych gatunków, ale nieznanie wcześniej u jabłoni), 2) zakonserwowane i znane (wykazujące podobieństwo do miRNA z innych gatunków i znane już wcześniej u jabłoni), 3) nowe i specyficzne dla jabłoni miRNA (niewykazujące podobieństwa do miRNA z innych gatunków ani do żadnych znanych miRNA jabłoni) oraz 4) znane i specyficzne dla jabłoni (niewykazujące podobieństwa do miRNA u innych gatunków, ale zidentyfikowane wcześniej dla jabłoni; Tabela 9). Za podobne uznano cząsteczki, których przyrównanie programem BLAST do innych miRNA uzyskało wartość parametru *E-value* mniejszą niż

$10^{-10}$ . Wszystkim nowym cząsteczkom nadano nazwy, które oprócz liczby porządkowej zawierają literę „N” od „nowe”. Wszystkie przewidziane miRNA wraz ze szczegółowymi informacjami na ich temat zostały umieszczone w stworzonej przez zespół Zakładu Bioinformatyki bazie danych (patrz rozdział 4.1.8; Rysunek 12) oraz wysłane do bazy miRBase, gdzie nie zostały jeszcze upublicznione. Przykładowe struktury prekursorów przewidziane dla nowych miRNA zostały przedstawione na rysunku 8.

**Tabela 9. Liczba zidentyfikowanych cząsteczek mikroRNA dla jabłoni**

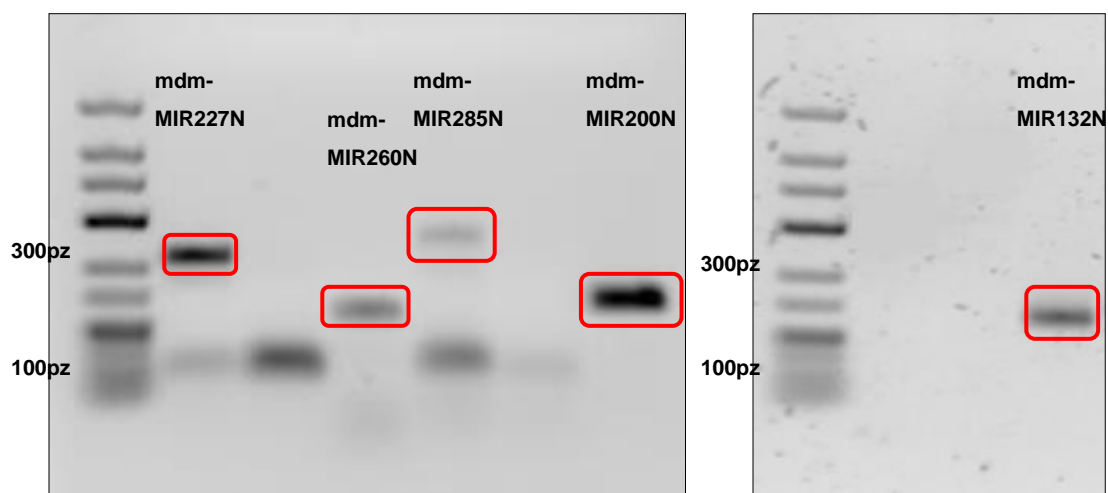
		Liczba zidentyfikowanych miRNA
<b>Zakonserwowane</b>	nowe	38
	znane	76
<b>Specyficzne dla jabłoni</b>	nowe	78
	znane	60
	<b>suma</b>	<b>252</b>



**Rysunek 8. Struktury przewidziane dla prekursorów wybranych cząsteczek mikroRNA. Kolorem czerwonym zaznaczono sekwencję dojrzalej cząsteczki miRNA**

#### 4.1.4 Eksperymentalne potwierdzenie zidentyfikowanych cząsteczek mikroRNA

Jak wynika z tabeli 9, niemal połowę zidentyfikowanych w tej części pracy prekursorów miRNA stanowią nowe, nieznane dotąd dla jabłoni cząsteczki, których jest aż 116. Niektóre z tych prekursorów generują te same dojrzałe miRNA, dlatego dają początek tylko 75 unikalnym dojrzałym miRNA. W celu dodatkowego potwierdzenia ich obecności w transkryptomie analizowanych pędów jabłoni wykonano analizę RT-PCR, projektując startery na końce przewidzianej sekwencji prekursora. Wybrano w tym celu trzynaście nowych miRNA wykazujących najwyższą ekspresję wyrażoną liczbą zsekwencjonowanych odczytów. Należy nadmienić, że ekspresja była relatywnie niska w porównaniu z zakonserwowanymi ewolucyjnie miRNA. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, że specyficzne dla danego gatunku miRNA na ogół charakteryzują się ekspresją dużo niższą niż zakonserwowane cząsteczki (Fahlgren i in., 2010; Axtell, 2013a). Najprawdopodobniej z tego powodu udało się potwierdzić ekspresję jedynie pięciu kandydatów: mdm-miR227N, mdm-miR260N, mdm-miR285N, mdm-miR200N i mdm-miR132N. Otrzymane w PCR produkty widoczne na żelu agarozowym przedstawionym na rysunku 9 zostały wycięte i zsekwencjonowane. Sekwencje wszystkich pięciu prekursorów okazały się zgodne z przewidywanymi.



Rysunek 9. Żel agarozowy przedstawiający rozdział elektroforetyczny cDNA prekursorów pięciu nowych cząsteczek mikroRNA: mdm-miR227N, mdm-miR260N, mdm-miR285N, mdm-miR200N i mdm-miR132N. Produkty otrzymano techniką RT-PCR

Dodatkowym potwierdzeniem dla przewidzianych prekursorów miRNA mogą być sekwencje EST jabłoni dostępne w bazie NCBI. Spośród przewidzianych 116 nowych sekwencji prekursorów miRNA, dziewięć znalazło takie potwierdzenie (Tabela 10).

**Tabela 10. Prekursory cząsteczek mikroRNA jabłoni, które potwierdzono techniką RT-PCR i/lub obecnością EST w bazie NCBI**

miRNA	Sekwencja dojrzałego miRNA	PCR	Numer identyfikacyjny EST
mdm-miR132N	ACACCATCGCATCTCATGTTCC	+	
mdm-miR200N	GTATTCTTTCATCTTCTACTA	+	
mdm-miR227N	AAGTTCATTCAAACACCATGT	+	CN488406
mdm-miR260N	TCACCATTGCATCTCATGTTCC	+	
mdm-miR285N	TAAGTTCATCCAAACACCATA	+	
mdm-miR36N	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA		EG999275,EG999267,EB132721,EB132717,CO755162
mdm-miR85N	TGGCACCAAAGTCACCACCCG		GO549341,GO533700,GO532749
mdm-miR134N	TAACCTTATTTGATTTACGA		CN494284
mdm-miR138N	ATCATGCTATCCCTTTGGATT		EG999273,EG999270,CN904957,CN904799
mdm-miR207N	TTGCGTTCCTGATTCTTTTCG		CO866843
mdm-miR212N	CATGCCTAATTCAAAGCCCT		CV628345,CO416991,CO414958
mdm-miR223N	AGTAACTATAGCTGTTTTCTA		CX024237
mdm-miR252N	AGAATCTTGATGATGCTGCAT		EG999280,EB120655

#### 4.1.5 Analiza ekspresji cząsteczek mikroRNA w zrazach jabłoni rosnących na różnych podkładkach

Uzyskane techniką głębokiego sekwencjonowania odczyty posłużyły również do określenia poziomów ekspresji dojrzałych miRNA w poszczególnych powtórzeniach biologicznych. Dane zostały w tym celu znormalizowane poprzez przeliczenie liczby odczytów na milion (RPM).

W celu wyznaczenia cząsteczek miRNA ulegających ekspresji specyficznej dla rodzaju stosowanej podkładki sprawdzono, czy któreś z cząsteczek ulegają ekspresji tylko w pędach rosnących na danym typie podkładki. Nie znaleziono takich cząsteczek. Jednakże zauważono, że mdm-miR535b,c nie ulega ekspresji (brak odczytów) w pędach rosnących na podkładce G.30, która warunkuje wysoką odporność na zarazę ogniową. W przypadku drugiej podkładki o podobnych właściwościach (M.111) w ekspresja była zerowa w dwóch z trzech powtórzeń biologicznych. Może to świadczyć o związku braku ekspresji mdm-miR535b,c z odpornością na zarazę ogniową.

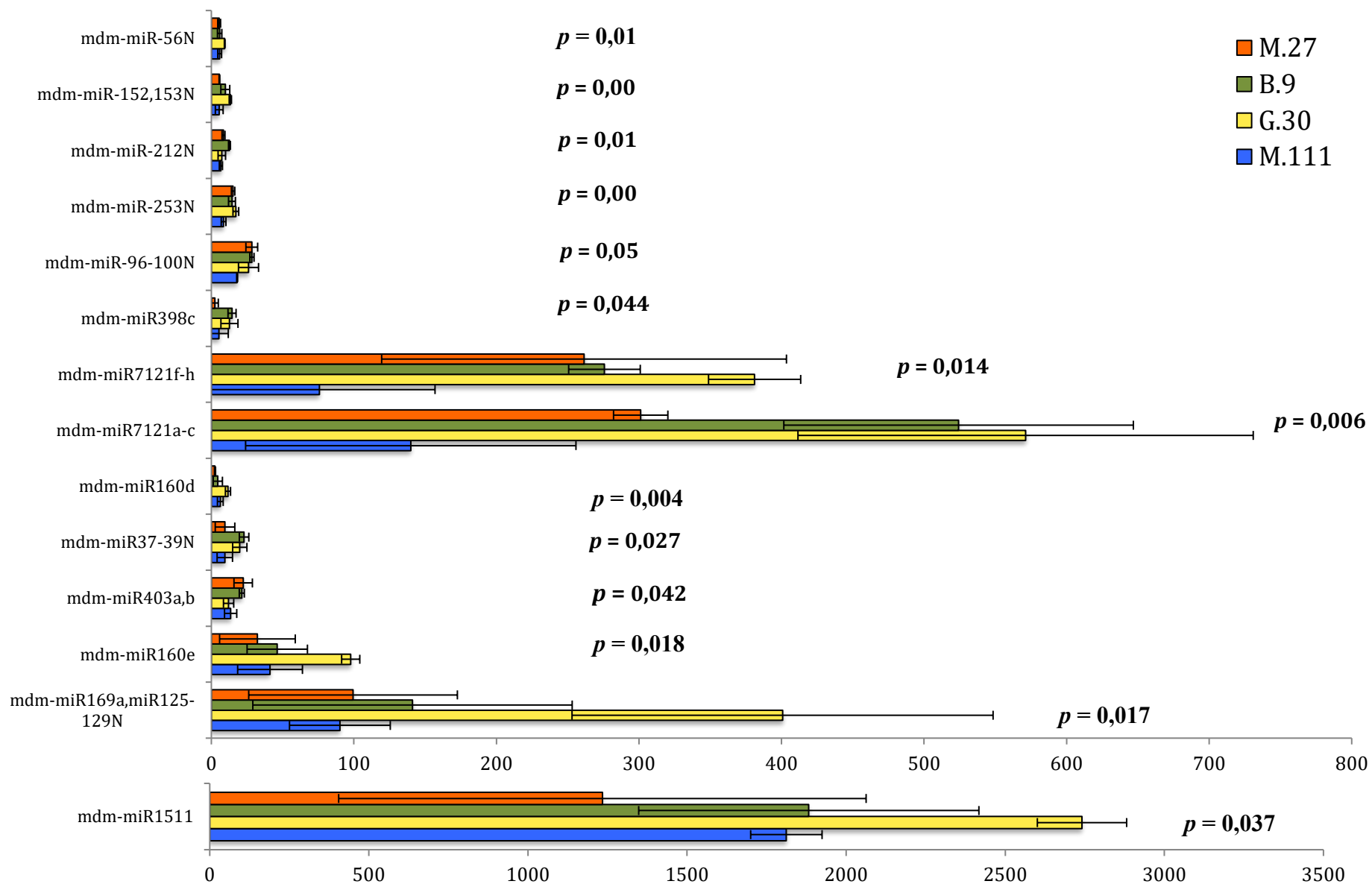
Średnie poziomy ekspresji we wszystkich analizowanych bibliotekach, wyrażone w RPM, posłużyły również do znalezienia miRNA najliczniej występujących we wszystkich typach analizowanych drzew. Zaobserwowano, że zestaw dziesięciu miRNA o najwyższej ekspresji jest podobny w jabłoniach rosnących na wszystkich czterech analizowanych podkładkach i prawie wszystkie te miRNA są zakonserwowane ewolucyjnie. Jest to zgodne z doniesieniami, iż zakonserwowane miRNA u roślin wykazują się najczęściej wyższą ekspresją niż te gatunkowo specyficzne (Fahlgren i in., 2010; Axtell, 2013a; Chavez Montes i in., 2014). Jedynym niezakonserwowanym ewolucyjnie miRNA znajdującym się w pierwszej dziesiątce miRNA o najwyższej ekspresji jest nowa dla jabłoni cząsteczka mdm-miR227N. Na podstawie średnich poziomów ekspresji dla wszystkich dwunastu bibliotek dziesięć miRNA o najwyższej ekspresji w pędach jabłoni to: mdm-miR482a, mdm-miR399a,b,c, mdm-miR172e,h, mdm-miR252N, mdm-miR1511, mdm-miR167b-h, mdm-miR482c, trzy miRNA należące do rodziny miR159 (mdm-miR34N, mdm-miR35N, mdm-miR36N), mdm-miR24N i mdm-miR395a-d, g-i (Tabela 11).



**Tabela 11. Cząsteczki mikroRNA jabłoni charakteryzujące się najwyższym poziomem ekspresji wyrażonym w RPM w pędach rosnących na poszczególnych podkładkach**

G.30		M.111		M.27		B.9	
miRNA	RPM	miRNA	RPM	miRNA	RPM	miRNA	RPM
miR399a-c	3809	miR482a	2340	miR252N	2546	miR482a	2764
miR1511	2741	miR1511	1812	miR482a	2543	miR399a-c	2593
miR252N	2185	miR482c	1261	miR167b,d-g	2216	miR252N	2310
miR482a	2091	miR252N	1355	miR482c	1557	miR167b,d-g	1966
miR167b,d-g	1528	miR34N,miR35N, miR36N	1200	miR399a-c	1412	miR1511	1882
miR482c	1214	miR167b,d-g	1020	miR34N,miR35N, miR36N	1239	miR482c	1261
miR24N	1203	miR399a-c	952	miR1511	1234	miR34N, miR35N, miR36N	1238
miR227N	820	miR395a-c,g-i	947	miR395a-c,g-i	943	miR24N	1104
miR396c-e	733	miR2118a-c	870	miR24N	881	miR396c-e	896
miR34N, miR35N, miR36N	697	miR24N	707	miR396c-e	754	miR395a-c,g-i	791

W kolejnym etapie przeanalizowano zróżnicowanie ekspresji dojrzałych miRNA pomiędzy drzewami rosnącymi na czterech badanych podkładkach. W tym celu wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), która pozwoliła określić istotne statystycznie różnice pomiędzy drzewami szczepionymi na czterech porównywanych podkładkach oraz zmienność pomiędzy powtórzeniami biologicznymi. Istotne statystycznie różnice w ekspresji zauważono dla 14 dojrzałych miRNA wykazujących poziom ekspresji powyżej 6 RPM, w tym sześciu nowych i ośmiu znanych (Rysunek 10). Warto zauważyć, że poziom ekspresji nowych cząsteczek miRNA był stosunkowo niski (poniżej 30 RPM), dlatego zaobserwowane istotne statystycznie różnice mogą nie mieć znaczenia biologicznego. Na rysunku 10 zaprezentowano średnie poziomy ekspresji 14 miRNA wykazujących istotne wraz z wartościami współczynnika  $p$  w teście ANOVA dla jabłoni rosnących na czterech analizowanych podkładkach.



Rysunek 10. Średnie poziomy ekspresji w zależności od podkładki dla czternastu cząsteczek mikroRNA wykazujących zróżnicowaną ekspresję według testu ANOVA

Powyższe wyniki wskazują, że stosunkowo niewiele miRNA wykazało zróżnicowaną ekspresję pomiędzy podkładkami. Może to wynikać z zaobserwowanej dużej zmienności w obrębie grup biologicznych, gdyż współczynnik zmienności dla większości z nich wynosił powyżej 35%. Dla czternastu miRNA o zróżnicowanej ekspresji wykonano test Tukeya w celu dokładniejszego wyodrębnienia par podkładek, które wpłynęły na zróżnicowaną ekspresję zaobserwowaną dla czterech podkładek. Test wykazał, że dla dziewięciu spośród czternastu miRNA skorygowana wartość  $p$  jest niższa niż 0,05 przynajmniej dla jednej pary podkładek. Pary różniące się istotnie to: M.27 vs G.30, M.111 vs G.30, M.27 vs B.9, G.30 vs B.9 i M.111 vs B.9. Spośród nich tylko pary M.111 vs G.30 i M.27 vs B.9 to podkładki o podobnych właściwościach odporności na zarazę ogniową, przy czym dla tej ostatniej pary istotne statystycznie różnice zaobserwowano tylko w przypadku mdm-miR212N. Pozostałe pary to pary odpornych i podatnych podkładek, co wskazywać może na udział tych miRNA w kształtowaniu odporności jabłoni na zarazę ogniową (Tabela 12).

**Tabela 12. Wyniki testu Tukeya dla czternastu cząsteczek miRNA wykazujących statystycznie istotną różnicę ekspresji między parami podkładek; wytluszczone pary podkładek różniące się istotnie**

miRNA	Sekwencja	Pary podkładek	Skorygowana wartość $p$ w teście Tukeya
mdm-miR56N	CAGAGCAAAACAGTCGTGGAA	<b>G30 – B9</b>	<b>0,039</b>
		M111 – B9	0,999
		M27 – B9	0,980
		<b>M111 – G30</b>	<b>0,039</b>
		<b>M27 – G30</b>	<b>0,025</b>
mdm-miR152,153N	GGGCGTGATATTCACACACCT	M27 – M111	0,977
		G30 – B9	0,155
		M111 – B9	0,084
		M27 – B9	0,092
		<b>M111 – G30</b>	<b>0,006</b>
mdm-miR212N	CATGCCTAATTCAAAAGCCCT	<b>M27 – G30</b>	<b>0,006</b>
		<b>M27 – B9</b>	<b>0,008</b>
		<b>M111 – B9</b>	<b>0,004</b>
		M111 – G30	0,917
		M27 – G30	0,675
mdm-miR253N	CATGGGAATTTTAAAGTCACCT	M27 – M111	0,363
		G30 – B9	0,310
		<b>M111 – B9</b>	<b>0,022</b>
		M27 – B9	0,940
		<b>M111 – G30</b>	<b>0,003</b>
		M27 – G30	0,560
		<b>M27 – M111</b>	<b>0,012</b>

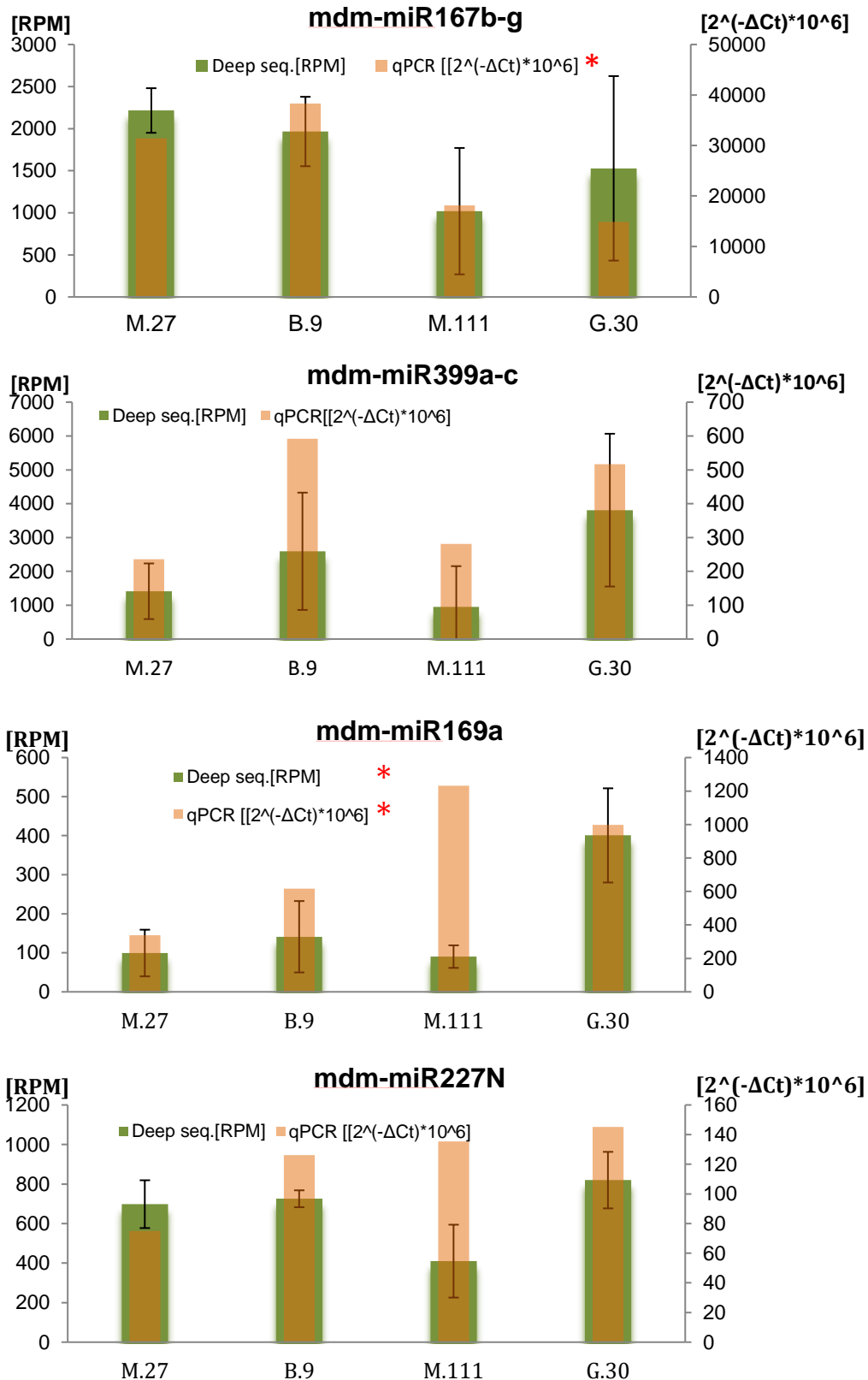
mdm- miR96-100N	CAAAGCTTTTAATATCAGTCGA	G30 – B9	0,868
		M111 – B9	0,061
		M27 – B9	0,999
		M111 – G30	0,151
		M27 – G30	0,882
		<b>M27 – M111</b>	<b>0,063</b>
mdm- miR398c	GGAGTGACCTGAGATCACATA	G30 – B9	0,952
		M111 – B9	0,140
		M27 – B9	0,055
		M111 – G30	0,260
		M27 – G30	0,101
		M27 – M111	0,858
mdm- miR7121f-h	TCCTCTTGGTGATCGCCCTGC	G30 – B9	0,501
		M111 – B9	0,108
		M27 – B9	0,997
		<b>M111 – G30</b>	<b>0,020</b>
		M27 – G30	0,407
		M27 – M111	0,138
mdm- miR7121a-c	TCCTCTTGGTGATCGCCCTGT	G30 – B9	0,966
		<b>M111 – B9</b>	<b>0,038</b>
		M27 – B9	0,238
		<b>M111 – G30</b>	<b>0,023</b>
		M27 – G30	0,138
		M27 – M111	0,464
mdm- miR160d	GCGTATGAGGAGTCAAGCATA	G30 – B9	0,037
		M111 – B9	0,801
		M27 – B9	0,728
		M111 – G30	0,108
		<b>M27 – G30</b>	<b>0,012</b>
		M27 – M111	0,298
mdm-miR37- 39N	TGCATTTGCACCTGCACTTGT	G30 – B9	0,920
		M111 – B9	0,108
		M27 – B9	0,112
		M111 – G30	0,229
		M27 – G30	0,237
		M27 – M111	1,000
mdm- miR403a,b	TTAGATTCACGCACAAACTCG	G30 – B9	0,162
		M111 – B9	0,256
		M27 – B9	0,993
		M111 – G30	0,979
		M27 – G30	0,119
		M27 – M111	0,188
mdm- miR160e	GCGTATGAGGAGCCATGCATA	G30 – B9	0,125
		M111 – B9	0,993
		M27 – B9	0,884
		M111 – G30	0,091
		M27 – G30	0,053
		M27 – M111	0,965
mdm- miR169a, miR125- 129N	CAGCCAAGGATGACTTGCCGG	<b>G30 – B9</b>	<b>0,042</b>
		M111 – B9	0,891
		M27 – B9	0,935
		<b>M111 – G30</b>	<b>0,020</b>
		<b>M27 – G30</b>	<b>0,022</b>
		M27 – M111	1,000
mdm- miR1511	ACCTAGCTCTGATACCATGAA	G30 – B9	0,313
		M111 – B9	0,998
		M27 – B9	0,517
		M111 – G30	0,260
		M27 – G30	0,056
		M27 – M111	0,599

Analiza poziomów ekspresji miRNA pokazała również, że sześć z nich wykazywała istotnie zwiększony poziom ekspresji w drzewach rosnących na podkładce G.30. Były to: mdm-miR56N, mdm-miR152,153N, mdm-miR169a (wraz z mdm-miR125N-129N), mdm-miR160d, mdm-miR160e i mdm-miR1511; mdm-miR403a,b ulegał najwyższej ekspresji na podkładkach M.27 i B.9 – obu podatnych na zarazę ogniową; mdm-miR7121a–c wykazywał zwiększoną ekspresję na podkładkach G.30 i B.9, natomiast mdm-miR7121f–h miał znacznie obniżoną ekspresję na podkładkach M.111 (Rysunek 10).

#### **4.1.5.1 Potwierdzanie poziomów ekspresji za pomocą stem-loop RT-PCR**

*Stem-loop* RT-PCR to technika pozwalająca w specyficzny sposób amplifikować cząsteczkę wybranego miRNA oraz określać poziom jego ekspresji. Często wykorzystywana jest jako potwierdzenie wyników ekspresji różnicowej miRNA opartej na metodach głębokiego sekwencjonowania (Chen i in., 2005). W pierwszy etapie niniejszej pracy podjęto próbę przeprowadzenia tej reakcji dla kilku miRNA charakteryzujących się wysoką i/lub zróżnicowaną ekspresją we wszystkich próbach. Udało się uzyskać wyniki dla czterech miRNA: mdm-miR167b–g, mdm-miR399a–c, mdm-miR169a oraz mdm-miR227N. Istotność statystyczną różnic w ekspresji miRNA obliczono testem ANOVA, podobnie jak dla wartości RPM z głębokiego sekwencjonowania. Na rysunku 11 przedstawiono średnie poziomy ekspresji dla ww. miRNA na podstawie wyników z reakcji *stem-loop* PCR (na rysunku oznaczonych jako „qPCR”) oraz na podstawie liczby odczytów głębokiego sekwencjonowania (na rysunku oznaczonych jako „Deep seq”) w celu zestawienia wyników obu metod.

Dla mdm-miR167b–g wyniki otrzymane metodą qPCR potwierdzają wyższy poziom ekspresji tej cząsteczki w podkładkach podatnych na zarazę ogniową (M.27 i B.9). W przypadku mdm-miR399a–c również można zaobserwować podobny wzór ekspresji mierzony dwiema metodami, choć nie zauważono różnic istotnych statystycznie. W tym przypadku najwyższą ekspresję zmierzono dla drzew B.9 i G.30, co sugeruje, że ta cząsteczka miRNA najprawdopodobniej nie jest związana z odpornością jabłoni na zarazę ogniową. Jeśli chodzi o mdm-miR169a, to zróżnicowanie istotne statystycznie pomiędzy grupami zaobserwowano zarówno w metodzie głębokiego sekwencjonowanie, jak i qPCR. Niemniej jednak wynik qPCR dla jednej z podkładek (M111) nie potwierdza wzoru ekspresji określonego metodą głębokiego sekwencjonowania. Podobnie dla nowej cząsteczki miRNA o nazwie mdm-miR227N wyniki obu metod nie są ze sobą spójne.



Rysunek 11. Średnie poziomy ekspresji dla mdm-miR167b-g, mdm-miR399a-c, mdm-miR169a oraz mdm-miR227N określone za pomocą liczby odczytów głębokiego sekwencjonowania (Deep seq.) oraz *stem-loop* RT-PCR (qPCR). Symbol \* przy legendzie wykresu – występowanie różnic istotnych statystycznie dla danej metody według testu ANOVA

#### **4.1.6 Transkrypty docelowe cząsteczek mikroRNA u jabłoni i ich funkcja**

Cząsteczki docelowe (ang. *targets*) dla miRNA to transkrypty, których ilość w komórce jest regulowana za pomocą miRNA poprzez ich degradację lub inhibicję translacji (patrz „Wstęp”). Dzięki ich zidentyfikowaniu możliwe jest poznanie potencjalnych funkcji konkretnych miRNA. W niniejszej pracy sekwencje docelowe zostały przewidziane za pomocą programu psRNATarget (Dai i Zhao, 2011) na zbiorze sekwencji kodujących jabłoni pobranych z bazy danych GDR oraz UniGene. W związku z faktem, że przewidziane w analizach 252 prekursorów miRNA są reprezentowane przez 143 różne dojrzałe miRNA, transkrypty docelowe były przewidywane dla tych 143 dojrzałych cząsteczek. Dla 120 z nich znaleziono w sumie 934 unikalnych sekwencji docelowych, w tym ponad 200 dla nowych miRNA jabłoni. Potwierdzeniem dla przewidzianych asocjacji miRNA-transkrypt była analiza degradacji jabłoni (Xia i in., 2012) wykonana przy użyciu programu PAREsnip (Folkes i in., 2012), która pozwoliła znaleźć 76 sekwencji docelowych dla 29 miRNA. Trzydzieści jeden z nich znajdowało się w zbiorze 934 transkryptów docelowych przewidzianych programem psRNATarget, czyli potwierdzało ich regulację przez cząsteczki miRNA. Szczegółowe informacje na temat wszystkich przewidzianych sekwencji docelowych są dostępne w stworzonej w ramach niniejszej pracy bazie danych miRNA jabłoni ([http://lemur.amu.edu.pl/share/apple\\_miRNAs/index.html](http://lemur.amu.edu.pl/share/apple_miRNAs/index.html)).

#### **4.1.7 Przyporządkowanie terminów GO transkryptom docelowym i analiza ich nadreprezentacji**

W kolejnym etapie analizy prawdopodobne transkrypty docelowe dla zidentyfikowanych miRNA jabłoni zostały poddane globalnej analizie nadreprezentacji przypisanych im terminów GO (ang. *gene ontology*). W tym celu najpierw zidentyfikowano wśród genów rzodkiewnika homologi genów jabłoni, których transkrypty są transkryptami docelowymi dla cząsteczek miRNA. Na podstawie przeprowadzonej analizy terminy GO genów rzodkiewnika przypisane zostały homologicznym genom jabłoni. Pozwoliło to na określenie przypuszczalnych funkcji kodowanych przez te geny białek. Następnie za pomocą narzędzia GOrilla zidentyfikowane zostały nadreprezentowane w badanej puli genów terminy GO. Warto przypomnieć, że ontologia genów służy ich dokładnemu opisowi

i składa się z trzech domen: **procesu biologicznego, funkcji molekularnej i elementu komórkowego**. Wśród zidentyfikowanych w niniejszej pracy transkryptów docelowych miRNA w procesie biologicznym nadreprezentowane były następujące terminy: odpowiedź obronna (ang. *defense response*), odpowiedź na stres (ang. *stress response*) i podstawowy proces biologiczny (ang. *primary metabolic process*). Wszystkie miały spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich (ang. *false discovery rate* – FDR) poniżej 0,05. Dominującą grupą genów w tej kategorii były natomiast geny białek odporności na choroby (tzw. geny *R*) z klasy NBS-LRR (ang. *nucleotide-binding site leucine-rich repeat*).

W funkcji molekularnej znalazło się sześć nadreprezentowanych terminów, wśród których dominuje termin „transporter ABC”. Transportery ABC działają przy udziale ATP jako eksportery lub importery metaboliczne. Odgrywają rolę w procesach odpowiedzi na stres abiotyczny, odporności na patogeny, detoksyfikacji komórek, jak również w procesach rozwojowych roślin i wzroście ich organów. Co więcej, zaobserwowano wcześniej, że ponad połowa transporterów ABC zwiększa swoją ekspresję podczas kontaktu rośliny z mikroorganizmami (Kang i in., 2011).

W elemencie komórkowym natomiast pojawiły się dla transkryptów docelowych dwa terminy: „kompleks proteasomu” oraz „cząsteczka regulatorowa proteasomu”. Udział proteasomu w regulacji ekspresji przez miRNA jest zrozumiały, ponieważ degradacja białek zależna od proteasomu zachodzi nieustannie podczas procesów wzrostu rośliny oraz jej odpowiedzi na stres.

#### **4.1.8 Baza danych cząsteczek mikroRNA jabłoni**

Wszystkie wyniki dotyczące pierwszej części pracy doktorskiej zostały zebrane w ogólnodostępnej i opublikowanej (Kaja i in., 2015) bazie danych dostępnej pod adresem [http://lemur.amu.edu.pl/share/apple\\_miRNAs](http://lemur.amu.edu.pl/share/apple_miRNAs). Na jej stronie głównej znajdują się następujące zakładki: miRNA table, miRNA deep seq, In silico targets, Degradome targets, GOrilla, Introns, Download i Contact. Zakładka *miRNA table* umożliwia dostęp do wszystkich zidentyfikowanych w tej części pracy cząsteczek miRNA jabłoni wraz z ich adnotacjami i poziomami ekspresji w 12 bibliotekach małych RNA. W zakładce *miRNA deep seq* znajdują się wyniki głębokiego sekwencjonowania w postaci przyrównania krótkich odczytów do fragmentu genomu odpowiadającemu sekwencji prekursora miRNA. Zakładki *In silico targets* i *Degradome targets* zawierają tabele z transkryptami docelowymi zidentyfikowanymi dla miRNA jabłoni wraz ze szczegółowymi informacjami, dotyczącymi





## 4.2 Identyfikacja i analiza ekspresji cząsteczek mikroRNA w odpowiedzi na inokulację liści jabłoni „Gala”

W pierwszej części projektu doktorskiego zidentyfikowane zostały miRNA, które mogą przyczyniać się do obserwowanego zróżnicowania odporności na zarazę ogniową jabłoni odmiany „Gala” szczepionych na różnych podkładkach. Celem kolejnego etapu badań było poznanie bezpośredniego wpływu infekcji bakteriami *E. amylovora* na profil ekspresji miRNA. Z tego powodu tej części projektu wykorzystano inokulowany bakteriami materiał roślinny.

### 4.2.1 Materiał roślinny

Materiał badawczy pobrany w maju 2012 roku pochodził z jabłoni odmiany „Gala” szczepionych na podkładki podatne (M.27) i odporne (G.30) na zarazę ogniową. W tej części pracy ograniczono się do tych dwóch podkładek, aby zawęzić liczbę badanych prób, przy czym wybrano te, ponieważ wykazują najbardziej skrajne cechy podatności (M.27) i odporności (G.30) na zarazę ogniową (Jensen i in., 2012). Pędy zostały odcięte, włożone do naczynia z wodą i przetransportowane do laboratorium w celu przeprowadzenia inokulacji liści (opisanej w rozdziale 3.2). Całkowity RNA wyizolowany został z liści inokulowanych i kontrolnych w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdej podkładki, czyli z sześciu drzew. Należy zwrócić uwagę na fakt, że procedura inokulacji wymagała jednoczesnego nacięcia liści, dlatego próby liści roślin kontrolnych były również nacinane, aby dalsze porównania dotyczyły wpływu tylko jednego czynnika stresowego. RNA do utworzenia bibliotek został wyizolowany w trzech powtórzeniach biologicznych 72 godziny po inokulacji – zarówno z drzew szczepionych na podkładkach G.30, jak i M.27. Dodatkowo materiał RNA został wyizolowany 2 godziny po inokulacji z drzew rosnących na podkładkach G.30 oraz z roślin kontrolnych w celu prześledzenia odpowiedzi cząsteczek miRNA na stres bakteryjny w czasie. W sumie przygotowanych i zsekwencjonowanych zostało zatem 18 bibliotek małych RNA (Tabela 13).

Tabela 13. Zestawienie prób użytych do przygotowania bibliotek małych RNA. hpi – liczba godzin po inokulacji (ang. *hours post inoculation*)

		Powt. 1	Powt. 2	Powt. 3	Powt. 1	Powt. 2	Powt. 3
<b>G.30</b>	<b>Inokulowane</b>	72 hpi	72 hpi	72 hpi	2 hpi	2 hpi	2 hpi
	<b>Kontrole</b>	72 hpi	72 hpi	72 hpi	2 hpi	2 hpi	2 hpi
<b>M.27</b>	<b>Inokulowane</b>	72 hpi	72 hpi	72 hpi			
	<b>Kontrole</b>	72 hpi	72 hpi	72 hpi			

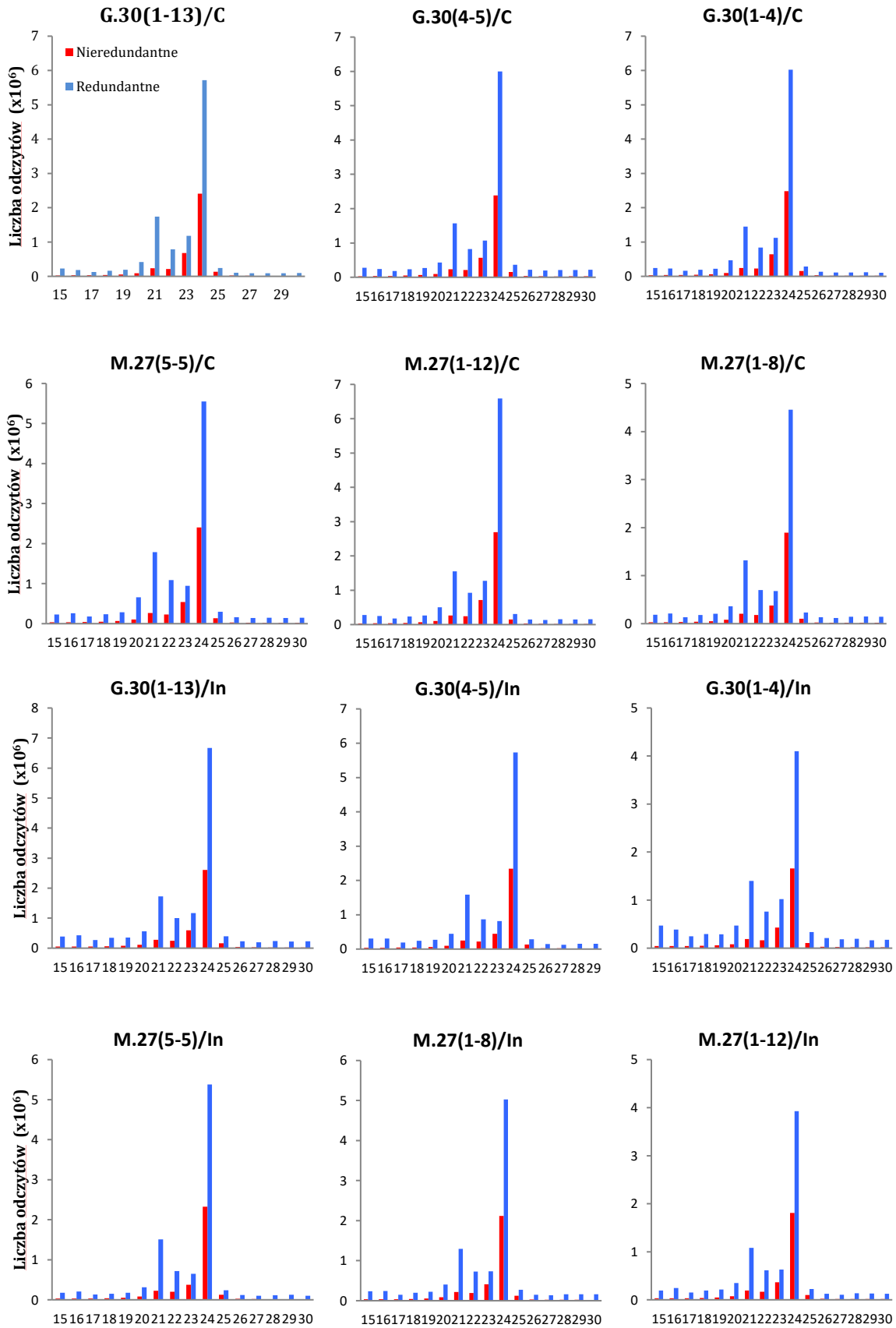
#### 4.2.2 Charakterystyka bibliotek małych RNA

Wstępna obróbka bioinformatyczna otrzymanych poprzez głębokie sekwencjonowanie odczytów wykonana została przy użyciu programu ShortStack w wersji 1.2.4, służącego do identyfikacji *loci* genomowych małych niekodujących RNA (sRNA) u roślin i zwierząt (Axtell, 2013b). Dane wejściowe stanowiły surowe odczyty pochodzące ze wszystkich osiemnastu bibliotek w formacie FASTQ. Po odcięciu od nich adaptorów uzyskano w sumie we wszystkich bibliotekach 233 511 50 odczyty. Odczytów nieredundantnych otrzymano 65 957 123, z czego 20 534 292 unikalnie zmapowało się do genomu jabłoni. Wykorzystana została ta sama wersja genomu jabłoni co w analizach wcześniejszych. Szczegółowe dane dotyczące liczby odczytów w poszczególnych bibliotekach podane zostały w tabeli 14.

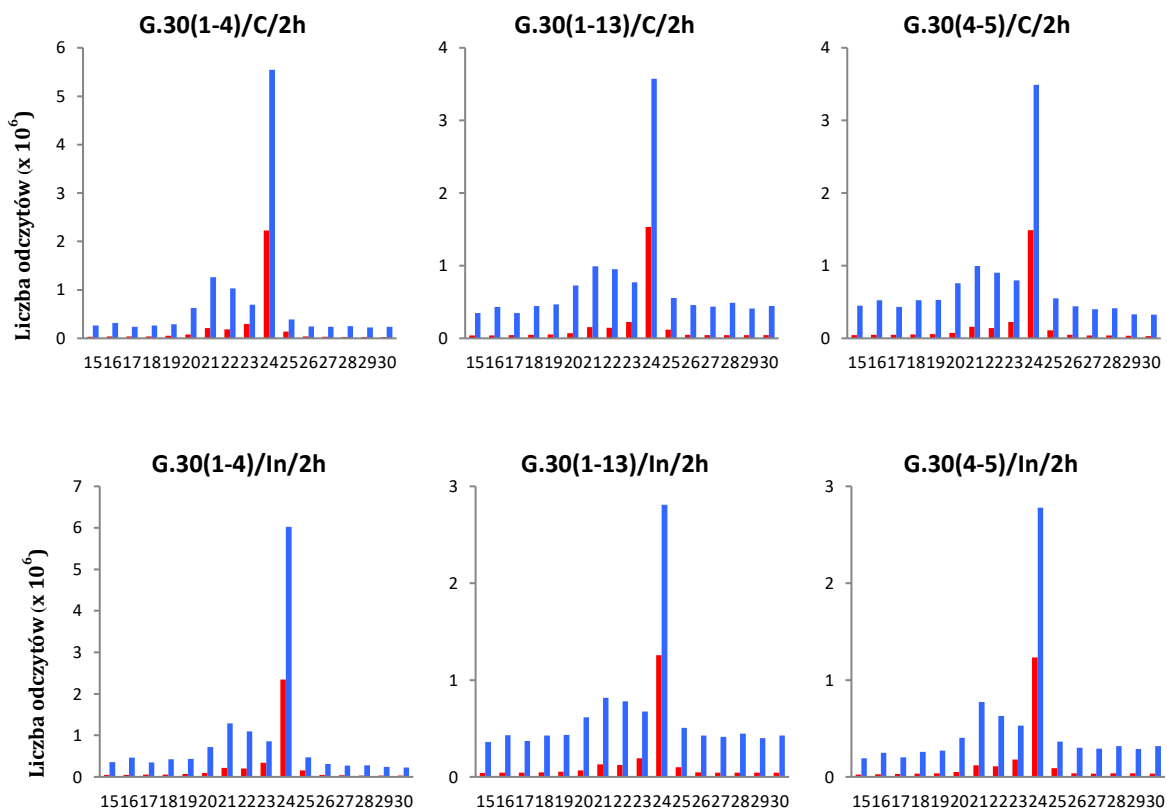
**Tabela 14. Statystyki dla wyników sekwencjonowania osiemnastu bibliotek cząsteczek mikroRNA jabłoni**

	Podkładka	Odczyty redundantne	Odczyty nieredundantne	Odczyty zmapowane	Nr GEO
<b>72 HPI</b>	G.30/kontrola	12 331 693	4 153 251	1 358 216	GSM1860681
		14 421 810	4 286 109	1 385 001	GSM1860682
		12 563 981	4 301 724	1 407 992	GSM1860683
	M.27/kontrola	13 406 105	4 182 359	1 354 307	GSM1860684
		14 486 030	4 678 683	1 519 037	GSM1860685
		10 833 843	3 339 569	1 069 796	GSM1860686
	G.30/inokulowane	16 188 324	4 679 690	1 508 316	GSM1860687
		12 760 732	3 949 842	1 287 901	GSM1860688
		11 854 281	3 126 121	984 392	GSM1860689
	M.27/inokulowane	10 840 483	3 699 825	1 223 233	GSM1860690
		11 582 762	3 640 166	1 173 818	GSM1860691
		9 133 191	3 081 890	991 954	GSM1860692
<b>2 HPI</b>	G.30/kontrola	14 129 684	3 742 972	1 217 144	GSM1860693
		15 525 943	3 103 966	992 986	GSM1860694
		13 407 504	2 848 323	910 947	GSM1860695
	G.30/inokulowane	14 972 069	3 962 513	1 302 980	GSM1860696
		13 737 949	2 696 150	846 272	GSM1860697
		11 335 120	2 483 970	770 894	GSM1860698

Podobnie jak w pierwszej części niniejszej pracy oraz zgodnie z danymi literaturowymi (Xia i in., 2012; Visser i in., 2014), odczyty o długości 21–24 nt. stanowiły większość w każdej z bibliotek. 24-nukleotydomowe sekwencje dominowały, stanowiąc ok. 40% odczytów w każdej bibliotece, następne w kolejności były 21- nukleotydomowe sekwencje z udziałem ok. 10% i 23- nukleotydomowe cząsteczki stanowiące ok. 8% (Rysunek 13). Mimo że taka dystrybucja długości odczytów jest typowa dla jabłoni (Xia i in., 2012; Visser i in., 2014), w porównaniu z danymi uzyskanymi z końcówek pędów udział cząsteczek 24-nukleotydomowych w liściach jest mniejszy o ok. 20%.



Rysunek 13. Rozkład długości odczytów małych RNA dla osiemnastu bibliotek sRNA jabłoni

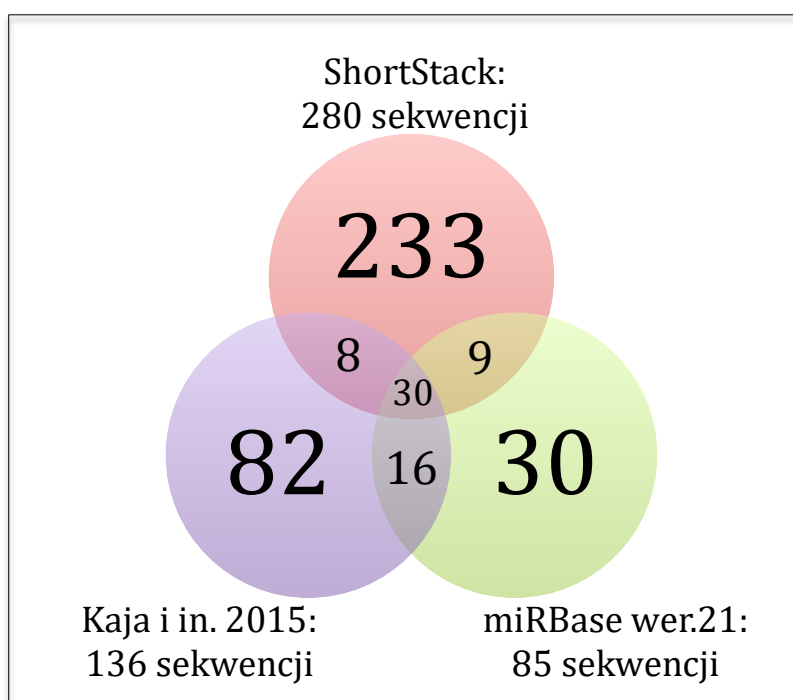


Rysunek 13 cd. Rozkład długości odczytów małych RNA dla osiemnastu bibliotek sRNA jabłoni; 2h – próby 2 godziny po inokulacji

#### 4.2.3 Identyfikacja cząsteczek mikroRNA na podstawie danych z osiemnastu bibliotek jabłoni „Gala”

Z uwagi na inny niż uprzednio materiał badawczy ponownie przeprowadzono identyfikację miRNA. Tym razem wykorzystano program ShortStack w wersji 1.2.4. Program został użyty w trybie dla roślin (ang. *plant mode*) z ustawieniami domyślnymi, za wyjątkiem parametru *mindepth*, który zwiększono z 20 do 40 odczytów. Zabieg przysłużył się do zwiększenia liczby zmapowanych do danego locus odczytów wymaganych do uznania go za źródło prekursora sRNA. Zaostrzył więc nieco kryteria identyfikacji miRNA w celu ograniczenia liczby wyników fałszywie dodatnich. W wyniku analizy danych pochodzących z 18 bibliotek sRNA zidentyfikowanych zostało w genomie jabłoni (wersja 1.0 dostępna pod adresem: <https://www.rosaceae.org/>) 330 *loci* miRNA (Suplement do niniejszej pracy). Odpowiadają one sekwencjom prekursorów i prawdopodobnie dają początek 280 unikalnym potencjalnym dojrzałym cząsteczkom miRNA. Aż 233 z nich nie zostały wcześniej zidentyfikowane. Ich nazwy zawierają numery nadane przez autorkę niniejszej pracy oraz

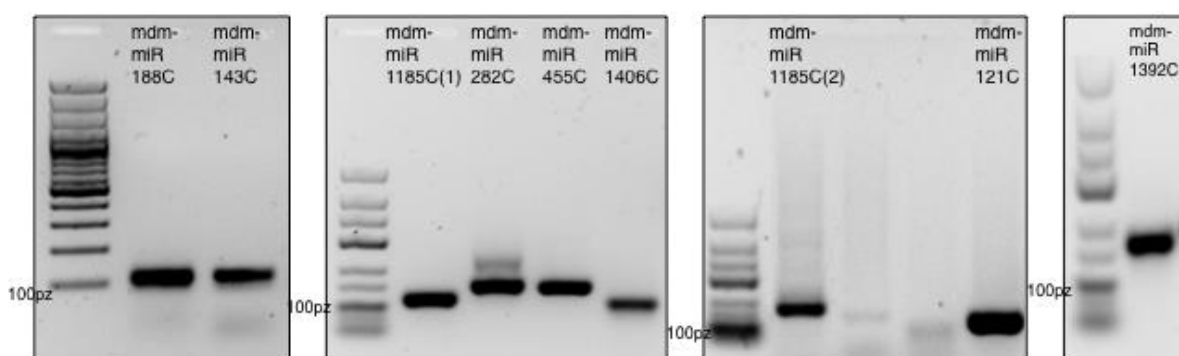
literę „C” na końcu, dla rozróżnienia ich od nowych cząsteczek zidentyfikowanych w pierwszej części pracy. Rysunek 14 przedstawia diagram Venna dla dojrzałych unikalnych miRNA pochodzących z trzech źródeł: baza danych miRBase (wersja 21), miRNA jabłoni przewidziane na podstawie analizy małych RNA z pędów (Kaja i in., 2015) oraz na podstawie analizy małych RNA z inokulowanych i nieinokulowanych liści. Tylko 30 dojrzałych miRNA znajduje się we wszystkich trzech zbiorach, ale – co istotne – analiza pozwoliła na potwierdzenie wyników uzyskanych w pierwszym etapie badań: 47 ze 116 nowych prekursorów oraz 38 ze 136 wszystkich dojrzałych cząsteczek miRNA.



**Rysunek 14. Porównanie trzech zestawów dojrzałych cząsteczek mikroRNA jabłoni: z bazy miRBase (wersja 21), z pierwszej (Kaja i in. 2015) i drugiej (ShortStack) części niniejszej pracy**

Jak wynika z powyższego rysunku, aż 233 sekwencje dojrzałych miRNA zidentyfikowane przez program ShortStack nie były wcześniej znane dla jabłoni. Z tego względu nazwane zostały nowymi. Zdecydowana większość z nich (189) stanowi sekwencje 24-nukleotydowe. Sekwencje o długości 21 nt. występują w liczbie 23, następnie 22-nukleotydowe w liczbie 5, 20-nukleotydowe w liczbie 4 oraz jedno miRNA długości 23 nt. Oznacza to, że większość nowo zidentyfikowanych sekwencji to tzw. długie miRNA, które są zaangażowane w proces metylacji DNA (Wu i in., 2010), w odróżnieniu od „kanonicznych” miRNA, których funkcja polega na cięciu transkryptów docelowych lub hamowaniu ich translacji (Bartel, 2004; Wahid i in., 2010).

Zidentyfikowane 233 nowe dojrzałe cząsteczki miRNA są kodowane przez 246 *loci* na genomie jabłoni, z których może powstać 245 różnych prekursorów miRNA (Suplement). Podobnie jak w pierwszej części pracy, podjęto próbę potwierdzenia obecności prekursorów miRNA o najwyższej ekspresji wyrażonej w RPM, z wykorzystaniem techniki RT-PCR z użyciem starterów okalających sekwencję prekursora. Tym razem spośród 17 wybranych prekursorów udało się potwierdzić ekspresję i sekwencję dziewięciu z nich: mdm-miR188C, mdm-miR143C, mdm-miR1185C (1 i 2), mdm-miR282C, mdm-miR455C, mdm-miR1406C, mdm-miR121C i mdm-miR1392C (Rysunek 15). W pozostałych przypadkach oczekiwany produkt nie był widoczny na żelu, co może świadczyć o niskiej ekspresji prekursora lub fałszywie dodatnim wyniku wygenerowanym przez program ShortStack. W przypadku czterech z potwierdzonych prekursorów (mdm-miR188C, mdm-miR455C, mdm-miR1406C i mdm-miR1392C) zgodnie z wynikami analiz *sRNA-seq* dojrzała cząsteczka miRNA z nich powstająca powinna mieć długość 24 nt.



**Rysunek 15.** Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiającego rozdział elektroforetyczny cDNA prekursorów dziewięciu potwierdzonych nowych cząsteczek mikroRNA jabłoni: mdm-miR188C, mdm-miR143C, mdm-miR1185C(1 i 2), mdm-miR282C, mdm-miR455C, mdm-miR1406C, mdm-miR121C i mdm-miR1392C

#### 4.2.4 Analiza ekspresji zidentyfikowanych cząsteczek mikroRNA

Podobnie jak w pierwszej części niniejszej pracy, poziomy ekspresji dojrzałych miRNA zostały wyrażone w odczytach na milion (z ang. RPM). Cząsteczki o najwyższej średniej ekspresji we wszystkich 18 analizowanych bibliotekach to: mdm-miR166a-l, mdm-miR159a,b, mdm-miR482a-5p, mdm-miR1511, mdm-miR396b,c,d,e, mdm-miR225C, mdm-miR482c, mdm-miR403a,b i mdm-miR396f,g. W porównaniu do wyników otrzymanych w pierwszej części pracy, miRNA należące do rodzin miR159, miR482 i miR1511 powtórzyły się z pierwszej dziesiątki miRNA o najwyższej ekspresji. Większość



z nich, za wyjątkiem mdm-miR225C to miRNA zakonserwowane ewolucyjnie i znane u jabłoni. Warto zwrócić uwagę na fakt, że mdm-miR166a-l dominuje pod względem liczebności we wszystkich bibliotekach ze średnim poziomem ekspresji 25 000 RMP. miR166 prezentował także najwyższy poziom ekspresji w liściach jabłoni w porównaniu z tkankami korzenia, kwiatu czy owocu w badaniach opublikowanych przez Xia i in. (Xia i in., 2012). Kolejny pod względem liczby miRNA w tej części pracy, mdm-miR159a,b ma już jednak w analizowanych bibliotekach prawie siedmiokrotnie niższy średni poziom ekspresji (Tabela 15). Warto zaznaczyć, że choć wymienione miRNA należą do tych o największej ekspresji we wszystkich bibliotekach, to jednak w przypadku aż sześciu z nich (mdm-miR166a-i, mdm-miR282C, mdm-miR1511, mdm-miR396b,c,d,e, mdm-miR403a,b oraz mdm-miR396f,g), średni poziom ekspresji w materiale zebrany po 2 godzinach od inokulacji – zarówno w liściach inokulowanych, jak i w kontroli – jest znacznie niższy. Analizę istotności tych różnic przedstawiono jest w podrozdziale 4.2.4.1C.

**Tabela 15. Średnie poziomy ekspresji (dla osiemnastu bibliotek małych RNA) dziesięciu cząsteczek mikroRNA o najwyższej ekspresji w liściach jabłoni z rozróżnieniem na podkładki; ko – kontrola; in – inokulowane; 2 HPI – próby 2 godziny po inokulacji**

miRNA	Ekspresja (RPM)	G30/ko	M27/ko	G30/in	M27/in	G30/ko/2 HPI	G30/in/2 HPI
mdm-miR166a-i	<b>25578,4</b>	41059,3	32576,8	30973,9	34068,7	7093,9	7697,5
mdm-miR159a,b,	<b>3670,4</b>	3632,1	3047,2	3242,7	3685,7	3693,4	4721,2
mdm-miR159b,	<b>1604,6</b>	1237,6	1671	1665,6	2107	1640,1	1306,4
mdm-miR282C	<b>838,1</b>	844,1	955,6	1555,4	1249,5	230,1	194,1
mdm-miR1511	<b>765</b>	930,4	924,6	731,6	919,6	535,6	548
mdm-miR396b–e	<b>550,2</b>	500,6	671,7	604	1020,7	299,1	205,1
mdm-miR225C	<b>272,2</b>	330,1	265	331,3	271,7	204,3	231
mdm-miR482c	<b>221,9</b>	194,7	251,4	196,5	247,9	200,3	240,6
mdm-miR403a,b	<b>196,8</b>	187,5	244,9	204,9	289	145,5	109,2
mdm-miR396f,g	<b>164,2</b>	156,5	266,8	222,2	297,7	22,5	19,2

Jeśli chodzi o nowe 233 miRNA, to – zgodnie z wcześniejszymi przewidywaniami – prezentują zdecydowanie niższy poziom ekspresji od znanych ewolucyjnie zakonserwowanych cząsteczek. Zaledwie 17 z nich ulega ekspresji na poziomie co najmniej 20 RPM, w tym tylko mdm-miR282C, o wysokim podobieństwie sekwencji do mdm-miR482a, ma stosunkowo wysoki poziom ekspresji (838 RMP).

#### **4.2.4.1 Ekspresja różnicowa cząsteczek miRNA**

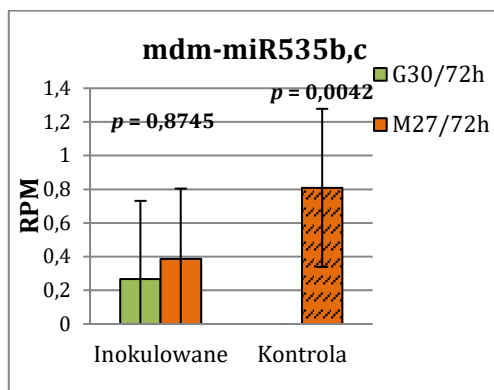
Wybrany do tej części projektu materiał badawczy umożliwił przeanalizowanie zmian profilu ekspresji miRNA u jabłoni pod wpływem infekcji bakteryjnej. W celu zidentyfikowania miRNA, które mogłyby być odpowiedzialne za odporność na zarazę ogniową, jak również zaangażowane w odpowiedź rośliny na stres bakteryjny, przeprowadzono analizę ekspresji różnicowej na trzech poziomach. W pierwszym (A) porównano poziomy ekspresji miRNA pomiędzy drzewami rosnącymi na podkładce podatnej i odpornej (M.27 i G.30), co podobnie jak w pierwszej części projektu pozwoliło na wytypowanie cząsteczek specyficznych dla rodzaju zastosowanej podkładki. W drugim porównaniu (B) zestawiono próby inokulowane z kontrolnymi, aby znaleźć miRNA istotnie zmieniające ekspresję pod wpływem zakażenia. W trzecim porównaniu (C) natomiast wzięto pod uwagę zmiany ekspresji miRNA w czasie od 2 do 72 godzin po inokulacji.

##### *A. Ekspresja cząsteczek mikroRNA zależna od podkładki*

W celu zidentyfikowania miRNA specyficznych dla rodzaju zastosowanej podkładki przeprowadzone zostały porównania ekspresji miRNA pomiędzy drzewami rosnącymi na podkładkach odpornych (G.30) oraz podatnych (M.27) na zarazę ogniową. Niezależnie od siebie przeprowadzone zostały dwa porównania: drzew kontrolnych oraz inokulowanych. Do analizy ekspresji różnicowej wykorzystano program DESeq2, przy czym za statystycznie istotne wyniki uznano te z wyliczonym skorygowanym prawdopodobieństwem  $p < 0,05$ .

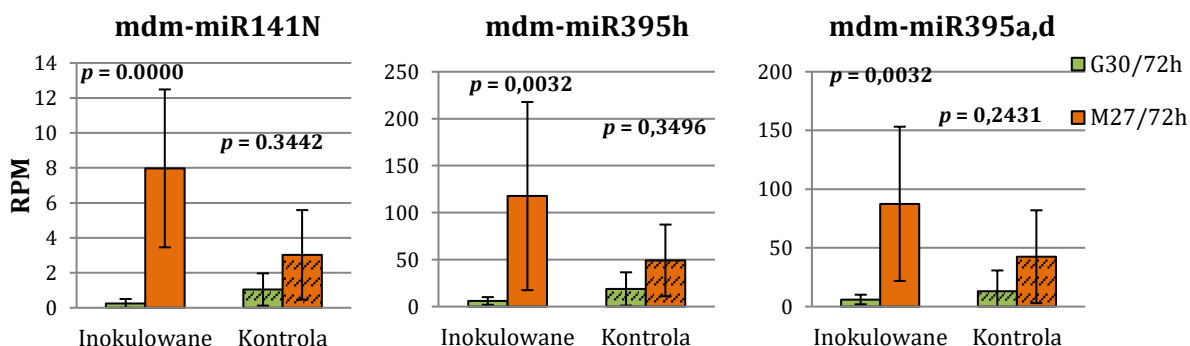
W przypadku nieinokulowanych prób kontrolnych jedyną znaczącą różnicę zaobserwowano dla mdm-miR535b,c, którego ekspresja była równa zero w próbach pochodzących z podkładki G.30, warunkującej odporność (Rysunek 16). Brak ekspresji mdm-miR535b,c w pędach jabłoni rosnących na podkładkach warunkujących odporność na zarazę ogniową zaobserwowano również w wynikach z pierwszej części niniejszej pracy, co potwierdza jego specyficzną dla podkładki ekspresję. Niemniej jednak, mdm-miR535b,c został wykryty we wszystkich inokulowanych próbach – zarówno rosnących na wrażliwej podkładce M.27, jak i odpornej G.30, co może wskazywać na jego udział w odpowiedzi jabłoni na zakażenie bakteriami. Na podstawie przewidzianych w niniejszej pracy transkryptów docelowych oraz danych pochodzących z degradomu można przypuszczać, że

mdm-miR535b,c reguluje ekspresję czynników transkrypcyjnych SBP (z ang. *squamosa promoter-binding protein*), które biorą udział w metabolizmie miedzi oraz w szlakach odpowiedzi na stres oksydacyjny (Yamasaki i in., 2009; Chen i in., 2010; Zhu i in., 2011). Drugim transkryptem docelowym dla tego miRNA są noduliny, których znaczenie i potencjalny związek z odpornością na zarazę ogniową zostało szczegółowiej opisane w dyskusji.



**Rysunek 16.** Różnica ekspresji mdm-miR535b,c pomiędzy podkładkami G.30 i M.27;  $p$  – skorygowana wartość prawdopodobieństwa

Jeśli chodzi o próby inokulowane, porównanie profili ekspresji miRNA pomiędzy drzewami M.27 i G.30 umożliwiło zidentyfikowanie trzech miRNA o istotnie zwiększonej ekspresji w liściach rosnących na podkładkach M.27: mdm-miR395h, mdm-miR395a,d oraz mdm-miR141N (Rysunek 17). Co więcej, te cząsteczki miRNA wykazywały podobny poziom ekspresji w próbach kontrolnych dla obu podkładek, zatem ich zróżnicowana odpowiedź po infekcji bakteryjnej może oznaczać reakcję specyficzną dla podkładki.

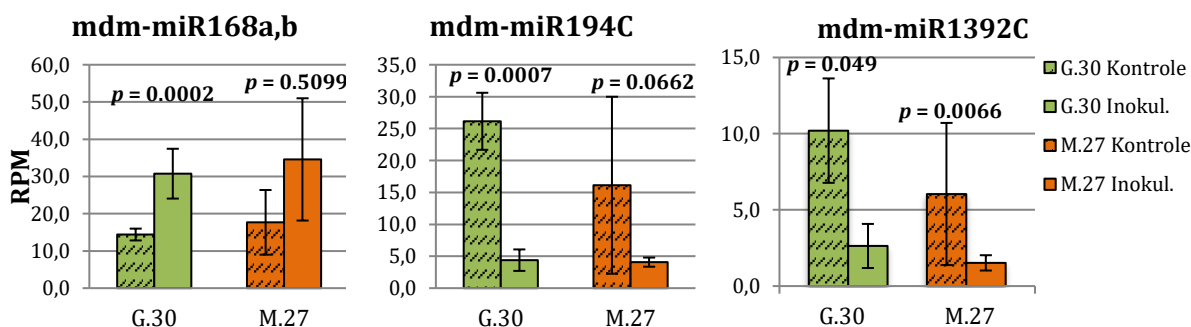


**Rysunek 17.** Różnica ekspresji mdm-miR395h, mdm-miR395a,d i mdm-miR141N pomiędzy podkładkami G.30 i M.27

Analiza transkryptów docelowych tych miRNA pokazuje, że mdm-miR395h prawdopodobnie reguluje ekspresję białka transportującego jony potasowe i utrzymującego ich równowagę w komórce. mdm-miR395a,d może regulować ekspresję innego białka transportującego kationy (ang. *cation transport regulator-like protein 2*). Natomiast transkryptem docelowym dla mdm-miR141N są białko *luminal-binding protein 5* oraz kinaza kazeinowa.

### B. Ekspresja cząsteczek mikroRNA zależna od inokulacji bakterią *E. amylovora*

Porównanie profili ekspresji miRNA w próbach inokulowanych względem nieinokulowanych kontroli, wykonane niezależnie dla prób z drzew rosnących na podkładkach M.27 i G.30, pozwoliło na zidentyfikowanie trzech miRNA o zróżnicowanej ekspresji: mdm-miR168a,b (będący właściwie izomirem ath-miR168a,b pochodzącego z bazy miRBase) oraz dwie nowo przewidziane miRNA: mdm-miR194C i mdm-miR1392C. Zmiany w ekspresji każdej z tych cząsteczek, obserwowane pomiędzy kontrolą a próbą inokulowaną, nie wykazywały istotnych różnic pomiędzy podkładkami. mdm-miR168a,b wykazywał zwiększoną ekspresję w liściach zakażonych, natomiast oba nowe miRNA miały w nich obniżoną ekspresję (Rysunek 18). Niemniej jednak, dla mdm-miR168a,b i mdm-miR194C różnice istotne statystycznie zaobserwowano tylko dla podkładki G30. Dla mdm-miR168a,b wykonano dodatkowo analizę qPCR, która co prawda potwierdziła jego podwyższoną ekspresję w zakażonych próbach, jednakże różnica ta jest nieistotna statystycznie. mdm-miR194C i mdm-miR1392C reprezentują grupę nowo zidentyfikowanych w niniejszej pracy cząsteczek miRNA jabłoni o długości 24 nt. Warto zauważyć, że ekspresja i sekwencja prekursora mdm-miR1392C zostały potwierdzone eksperymentalnie techniką RT-PCR (Rysunek 15).



Rysunek 18. Uśrednione poziomy ekspresji dla mdm-miR168a,b, mdm-miR194C i mdm-miR1392C próbach inokulowanych bakterią i w próbach kontrolnych

Aby określić funkcje mdm-miR168a,b, mdm-miR194C i mdm-miR1392C zidentyfikowano ich transkrypty docelowe. Przeprowadzona w pierwszej części niniejszej pracy analiza transkryptów docelowych wykazała, że mdm-miR168a,b może regulować funkcje miRNA poprzez wpływ na białko AGO1. Natomiast mdm-miR194C i mdm-miR1392C, które różnią się tylko jednym nukleotydem w sekwencji, mają te same transkrypty docelowe i są to: transferaza GUX4 oraz beta-mannozydaza (MAN7). Ich znaczenie w odpowiedzi na stres biotyczny opisano w „Dyskusji”.

### *C. Porównanie ekspresji cząsteczek mikroRNA po 2 i 72 godzinach od inokulacji*

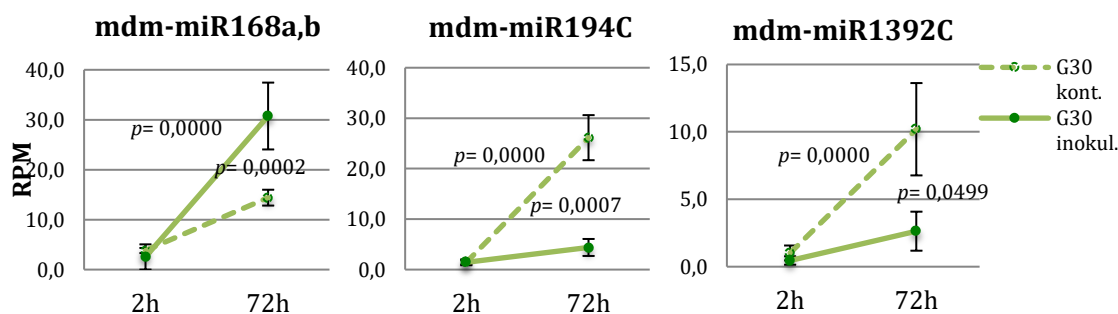
W celu lepszego poznania przebiegu reakcji na stres inokulacji liści jabłoni bakteriami *E. amylovora* porównano profile ekspresji miRNA po 2 i 72 godzinach od inokulacji (w przypadku prób kontrolnych materiał roślinny był nacinany, ale nie inokulowany). Z uwagi na ograniczone możliwości finansowe tę część badań wykonano tylko dla drzew odpornych, rosnących na podkładkach G.30. Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą programu DESeq2 umożliwiła zidentyfikowanie 73 miRNA o zróżnicowanej w czasie ekspresji: 32 z nich prezentowały istotną statystycznie zmianę ekspresji w czasie wyłącznie w próbach kontrolnych, 20 – wyłącznie w próbach zakażonych bakteriami, a 21 zmieniało ekspresję w czasie w obu grupach (Tabela 16).

Tabela 16. Siedemdziesiąt trzy cząsteczki mikroRNA jabłoni wykazujące zróżnicowaną w czasie ekspresję. Strzałkami oznaczono wzrost i spadek poziomu ekspresji, a kolorem czerwonym zmiany istotne statystycznie

miRNA	Kontrola	Inokul.	miRNA	Kontrola	Inokul.
mdm-miR260N	↘	↘	mdm-miR160d	↘	Const
mdm-miR2246C	↘	↘	mdm-miR1185C	↘	↗
mdm-miR167i, j	↘	↘	mdm-miR399a, b, c	↘	Const.
mdm-miR282C	↗	↗	mdm-miR163N	↘	↘
mdm-miR168a, b	↗	↗	mdm-miR172e, h	↘	↗
mdm-miR258C	↗	↗	mdm-miR210N	↘	↘
mdm-miR349C2	↗	↗	mdm-miR7121a, b, c	↘	↗
mdm-miR1526C	↗	↗	mdm-miR150C	↘	↘
mdm-miR121C	↗	↗	mdm-miR34, 35, 36N	↘	↗
mdm-miR396f, g	↗	↗	mdm-miR2118a, b, c	↘	↗
mdm-miR1406C	↗	↗	mdm-miR349C1	↗	↗
mdm-miR143C	↗	↗	mdm-miR949C	↗	↗
mdm-miR188C	↗	↗	mdm-miR7121g, h	↗	↗
mdm-miR257C	↗	↗	mdm-miR308C	↗	↗
mdm-miR156ab	↗	↗	mdm-miR637C	↗	↗
mdm-miR155N	↗	↗	mdm-miR86N	↗	↗
mdm-miR393d-f	↗	↗	mdm-miR128C	↗	↗
mdm-miR319a, b	↗	↗	mdm-miR1351C	↗	↗
mdm-miR182C	↗	↗	mdm-miR390c, d, f	↗	↗
mdm-miR944C	↗	↗	mdm-miR166a-i	↗	↗
mdm-miR120C	↗	↗	mdm-miR504C	↗	↗
mdm-miR390a, b	↗	↘	mdm-miR23N	↗	↗
mdm-miR471C	Const.	↘	mdm-miR455C	↗	↗
mdm-miR734C	↗	↘	mdm-miR172k, l	↗	↗
mdm-miR662C	↗	↘	mdm-miR425C	↗	↗
mdm-miR5225a, c	Const.	↘	mdm-miR194C	↗	↗
mdm-miR156C	↗	↘	mdm-miR7126	↘	↘
mdm-miR207N	↘	↘	mdm-miR156p-s	↗	↗
mdm-miR159a, b	↘	↘	mdm-miR319c	↗	↗
mdm-miR159c	↗	↘	mdm-miR572C	↗	↗
mdm-miR482d	↗	↘	mdm-miR638C	↗	↗
mdm-miR482c	↘	↘	mdm-miR1392C	↗	↗
mdm-miR164b-f	↗	↗			
mdm-miR396b	↗	↗			
mdm-miR220N	↗	↗			
mdm-miR7125	↗	↗			
mdm-miR179C	↗	↗			
mdm-miR103C	↗	↗			
mdm-miR161N	↗	↗			
mdm-miR2452C	↗	↗			
mdm-miR86C2	↗	↗			

Powyższe wyniki sugerują, że zmiany w ekspresji miRNA dużo częściej występują w próbach kontrolnych niż inokulowanych. Z tego względu za obserwowaną ekspresją różnicową w obu rodzajach prób stoi najprawdopodobniej głównie stres mechaniczny nacięcia liści podczas inokulacji, a nie obecność bakterii. Spośród 73 miRNA tylko 20 wykazuje statystycznie istotną zróżnicowaną ekspresję wyłącznie w próbach inokulowanych. Być może to one reprezentują miRNA zaangażowane w odpowiedź na zarazę ogniową.

Warto zaznaczyć, że choć istotne zmiany w ekspresji w czasie obserwowane są dla 32 miRNA wyłącznie w próbach kontrolnych i 20 miRNA wyłącznie w próbach inokulowanych, to jedynie w przypadku trzech z nich różnice między kontrolą a próbami inokulowanymi są po upływie 72 godzin statystycznie istotne (jak pokazano w rozdziale 4.2.4.1B). Do tych miRNA należą: mdm-miR168a,b, mdm-miR194C i mdm-miR1392C (Rysunek 18 i Rysunek 19).

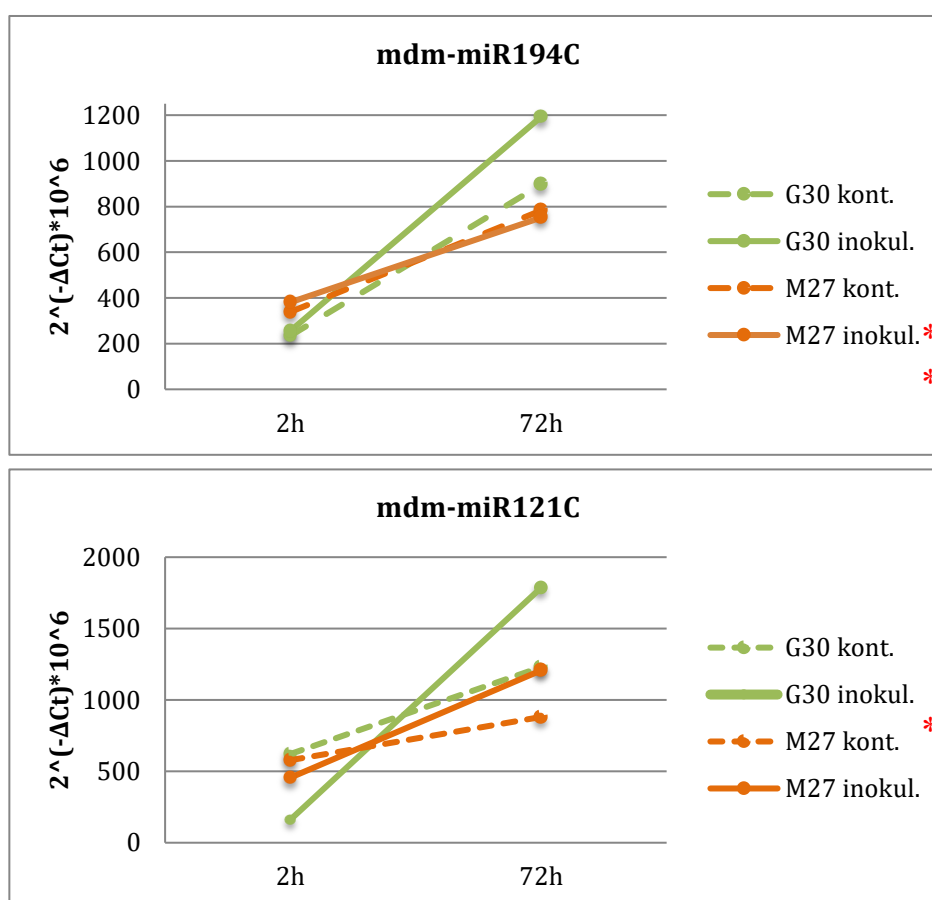


**Rysunek 19.** Cząsteczki mikroRNA ulegające zróżnicowanej ekspresji w czasie i jednocześnie zależnej od inokulacji; wartości prawdopodobieństwa  $p$  usytuowane wyżej odnoszą się do porównania ekspresji w czasie, natomiast te położone niżej do porównania próby kontrolne vs. inokulowane

Zaobserwowano, że poziom ekspresji mdm-miR168a,b rośnie w czasie zarówno w próbach zakażanych, jak i niezakażanych bakteriami, ale w pierwszej grupie wzrost jest znacznie większy. Może to oznaczać, że obecność bakterii dodatkowo zwiększa odpowiedź jabłoni na stres nacięcia. W przypadku mdm-miR194C i mdm-miR1392C ich ekspresja również rośnie w czasie, jednakże wzrost jest większy w próbach kontrolnych. Taki wynik sugeruje, że obecność bakterii oraz stres mechaniczny, jakim jest nacięcie tkanki, mogą mieć działania przeciwstawne na ekspresję cząsteczek mdm-miR194C i mdm-miR1392C.

Należy zauważyć, że spośród 73 miRNA, których ekspresja w czasie od 2 do 72 godzin od inokulacji istotnie się zmienia, aż 36 stanowi nowe, nieznanne wcześniej u jabłoni

cząsteczki. Z tego powodu wybrano dwie z nich (mdm-miR194C i mdm-miR121C) do eksperymentalnego potwierdzenia wzrostu ich ekspresji w czasie 72 godzin od zadziałania czynnika stresowego. Wykorzystano technikę *stem-loop* RT-PCR, która pozwoliła wykazać wzrost ich ekspresji zarówno w próbach kontrolnych, jak i inokulowanych. Eksperymentalne potwierdzenie ekspresji przeprowadzone zostało zarówno dla prób pochodzących z drzew rosnących na podkładkach odpornych (G.30), jak i podatnych (M.27). Statystyczna istotność zmian ekspresji w czasie została obliczona programem DataAssist (Thermo Fisher Scientific). Wyniki potwierdziły istotność zmian w ekspresji tylko w niektórych próbach (Rysunek 20).



Rysunek 20. Poziomy ekspresji dla mdm-miR194C i mdm-miR121C określone techniką *stem-loop* RT-PCR; Symbol \* przy legendzie wykresu – występowanie istotnych statystycznie różnicekspresji w czasie; test istotności wykonano programem DataAssist (Thermo Fisher Scientific)



## 5 Dyskusja

Celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie miRNA jabłoni warunkujących różne fenotypy jabłoni w zależności od zastosowanej podkładki. Szczególną uwagę zwrócono na miRNA warunkujące odporność na zarazę ogniową oraz biorących udział w odpowiedzi na zainfekowanie bakteriami *E. amylovora*. Cel ten realizowano w oparciu o wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomu małych RNA oraz szereg eksperymentów i analiz bioinformatycznych.

### 5.1 Identyfikacja cząsteczek mikroRNA

W ramach pracy wykorzystano dwie metody identyfikacji miRNA jabłoni oraz ich prekursorów. W pierwszej części badań wykorzystano własny schemat analityczny. Pojawienie się natomiast nowej, dużo lepszej od wcześniejszych, wersji programu ShortStack umożliwiło przeprowadzenie w drugiej części badań identyfikacji miRNA w bardziej zautomatyzowany sposób (Axtell, 2013b). Pozwoliło to także na identyfikację długich miRNA (ang. *long miRNAs* – lmiRNA), których wyszukiwania nie przewidywał opracowany wcześniej schemat analityczny. W wyniku analiz przeprowadzonych w pierwszym etapie badań zidentyfikowano 252 cząsteczki prekursorów miRNA u jabłoni odmiany „Gala” dających początek 136 różnym dojrzałym miRNA. W drugim etapie pracy zidentyfikowano 330 prekursorów miRNA dających początek 280 różnym dojrzałym miRNA. Analiza porównawcza obu zestawów prekursorów wykazała, że 155 prekursorów zidentyfikowanych zostało zarówno w pierwszym, jak i drugim etapie badań. W całym projekcie przewidzianych zostało zatem 427 prekursorów miRNA. W przypadku dojrzałych cząsteczek, jedynie 38 powtarzało się w obu zestawach. Ogółem znaleziono 378 unikatowych dojrzałych miRNA, z czego aż 323 (Rysunek 14) to cząsteczki wcześniej nieznanne. Spośród ponad 300 odpowiadających im prekursorów 14 potwierdzono za pomocą techniki RT-PCR (Rysunek 9 i Rysunek 15). Zidentyfikowane w ramach niniejszej pracy cząsteczki miRNA zostały wysłane do kuratorów bazy miRBase, jednak nie zostały jeszcze upublicznione, gdyż baza od dłuższego już czasu (od czerwca 2014 r.) czeka na aktualizację. Odkryte cząsteczki poszerzą pulę znanych dla jabłoni miRNA, których obecnie w bazie jest 206.

## 5.2 Długie cząsteczki mikroRNA (lmiRNA)

Przeprowadzona programem ShortStack analiza pozwoliła na zidentyfikowanie aż 233 nieznanych wcześniej u jabłoni dojrzałych miRNA. Tak dużą liczbę tych cząsteczek można wytłumaczyć faktem, iż zdecydowana większość z nich (189) to cząsteczki długości 24 nt., czyli reprezentujące tzw. długie miRNA (lmiRNA), które są często wykluczane z analiz miRNA. Cztery spośród czternastu potwierdzonych w badaniu prekursorów nowych miRNA, są źródłem właśnie 24-nukleotydowych miRNA. Długie miRNA u roślin mają długość 23–25 nt. i są wycinane z pre-miRNA przez enzym DCL3, w przeciwieństwie do kanonicznych (21-nukleotydowych) miRNA, które powstają przy udziale DCL1. Dlatego biogeneza lmiRNA jest prawdopodobnie regulowana tkankowo-specyficzną ekspresją enzymu DCL3. Natomiast ta sama spinka prekursora miRNA może być źródłem zarówno kanonicznych, jak i długich miRNA – w zależności od ilości i dostępności enzymów DCL1 i DCL3 (Vazquez i in., 2008). Ponadto pojawia się coraz więcej dowodów na funkcjonalność tych cząsteczek w komórce. Wiadomo, że wiążą się z białkiem AGO4, oddziałują z metylotransferazą cytozynową (DRM2) i kierują metylacją sąsiadujących rejonów DNA. Cząsteczki te odgrywają zatem istotną rolę w regulacji ekspresji genów (Vazquez i in., 2008; Chellappan i in., 2010; Wu i in., 2010). Wiele z analizowanych w niniejszej pracy lmiRNA wykazuje zróżnicowaną ekspresję między zrazami szczepionymi na odpornych i nieodpornych podkładkach, jak i między inokulowanymi i zdrowymi liśćmi, co może wskazywać na ich rolę w odpowiedzi na stres uszkodzenia tkanki i/lub inokulacji bakteriami *E. amylovora*.

## 5.3 Eksperymentalne potwierdzanie wyników NGS

W wielu pracach bazujących na głębokim sekwencjonowaniu, pomimo znanego problemu dużej zmienności osobniczej w obrębie grupy oraz pomiędzy grupami, rezygnuje się z powtórzeń biologicznych. Głównym powodem są stosunkowo wysokie koszty sekwencjonowania. Niestety, pomijanie problemu zmienności może prowadzić do błędnych wniosków (McCormick i in., 2011). Powtórzenia biologiczne powinny być stosowane również z uwagi na fakt, że ekspresja genów jest procesem stochastycznym, więc wnioski wyciągane z wyników dla jednego osobnika, bez względu na zastosowaną metodę, mogą być dalece nieprawdziwe. Z uwagi na powyższe argumenty, w niniejszej pracy zastosowano po trzy powtórzenia biologiczne dla każdego typu drzewa.

Innym istotnym problemem jest to, że technika głębokiego sekwencjonowania, mimo swoich licznych zalet, nie jest wolna od błędów. Najczęściej pojawiają się w wyniku nieprawidłowego przebiegu takich etapów, jak: ligacja adaptorów, odwrotna transkrypcja czy amplifikacja PCR preferująca sekwencje o dużej zawartości par GC, czyli będąca przyczyną tzw. *GC bias* (Kanagawa, 2003; Dohm i in., 2008; Aird i in., 2011; Benjamini i Speed, 2012). Błędy mogą pojawić się także na etapie samego sekwencjonowania w sekwenatorze, np. w wyniku występowania charakterystycznych sekwencji, zwłaszcza odwróconych powtórzeń i powtórzeń GGC (Nakamura i in., 2011). W literaturze można znaleźć wiele sposobów udoskonalania standardowych protokołów sekwencjonowania nowej generacji na niemal wszystkich etapach procedury, nawet z pominięciem etapu amplifikacji techniką PCR (Quail i in., 2008; Kozarewa i in., 2009; Schmitt i in., 2012). Niemniej jednak, wyniki sekwencjonowania nowej generacji nadal wymagają potwierdzenia eksperymentalnego. Z drugiej jednak strony, należy pamiętać, że technika *real-time* PCR również nie jest wolna od błędów, które mogą wynikać m. in. z degradacji RNA w trakcie przygotowywania reakcji, niespecyficznego wiązania starterów, różnej efektywności starterów, zanieczyszczeń składników reakcji, złego doboru genu referencyjnego, czy błędu operatora (Bustin, 2002; Deepak i in., 2007).

W niniejszej pracy poziomy ekspresji wybranych dojrzałych miRNA wyznaczone w oparciu o dane z głębokiego sekwencjonowania potwierdzano przy użyciu techniki *stem-loop* RT-PCR (Chen i in., 2005; Raymond i in., 2005; Shi i Chiang, 2005; Duncan i in., 2006; Benes i Castoldi, 2010). Pozwala ona określić poziom ekspresji wybranej dojrzałej miRNA. W sumie udało się otrzymać produkty tej reakcji dla siedmiu miRNA: mdm-miR167b-g, mdm-miR399a-c, mdm-miR169a, mdm-miR227N, mdm-miR168a,b, mdm-miR194C i mdm-miR121C. Jak można było się spodziewać, w przypadku niektórych miRNA pojawiły się rozbieżności, co może wynikać zarówno z błędów metody *sRNA-seq*, jak również *stem-loop* RT-PCR (patrz „Wstęp”). Fakt ten potwierdza konieczność dalszego weryfikowania poziomu ekspresji oszacowanego na podstawie danych z głębokiego sekwencjonowania.

## 5.4 Analiza transkryptów docelowych oraz potencjalna rola cząsteczek mikroRNA w kształtowaniu odporności jabłoni na zarazę ogniową

Przeprowadzone analizy nadreprezentowanych terminów GO dla transkryptów docelowych miRNA jabłoni wykazały, że w kategorii ontologicznej procesu biologicznego dominują transkrypty kodujące białka z rodzaju NBS-LRR, które są kodowane przez geny odporności u roślin (ang. *resistance genes*). Wspólną cechą tej grupy białek jest obecność domeny wiążącej nukleotydy (NB) oraz domeny bogatej w powtórzenia leucyny (LRR). Białka te specyficznie rozpoznają cząsteczki efektorowe patogenu i aktywują odpowiedź obronną komórki (ang. *effector-triggered immunity*; (Jones i Dangl, 2006). Ich obecność wśród transkryptów docelowych potwierdza szeroki udział miRNA jabłoni w regulowaniu reakcji obronnych.

Terminy GO nadreprezentowane w kolejnych kategoriach, takich jak funkcja molekularna oraz element komórkowy, dodatkowo potwierdzają powyższą obserwację. Znalazły się tam bowiem białka transporterowe typu ABC zaangażowane w odpowiedź roślin na stres (Kang i in., 2011) oraz proteasom, dominujący element komórkowy, w którym dochodzi do degradacji białek. Podsumowując wyniki analizy nadreprezentacji przyporządkowanych terminów GO, można stwierdzić, że zgodnie z wynikami innych grup badawczych (Jones i Dangl, 2006; Kang i in., 2011) miRNA jabłoni uczestniczą w odpowiedzi na stres abiotyczny i biotyczny, w tym inwazję patogenów.

Ze względu na cele niniejszej pracy doktorskiej podczas analizy funkcji sekwencji docelowych zidentyfikowanych miRNA jabłoni skoncentrowano się głównie na ich potencjalnym związku z kształtowaniem odporności jabłoni na zarazę ogniową. Analiza funkcji transkryptów docelowych miRNA wykazujących zróżnicowanie ekspresji pomiędzy zrazami rosnącymi na warunkujących odporność podkładkach pozwoliła wyłonić te, które mogą odgrywać rolę w kształtowaniu odporności na zakażenie bakteryjne. W analizach miRNA pochodzących z wolnych od zarazy ogniowej drzew, spośród zidentyfikowanych 252 prekursorów miRNA wytypowano trzy cząsteczki, które potencjalnie mogą być zaangażowane w kształtowanie odporności na tę chorobę: mdm-miR169a, mdm-miR167b-g i mdm-miR168a,b. Wszystkie wykazały znaczne różnice w ekspresji w zależności od podkładki, a ich transkrypty docelowe wykazały związek z regulacją odporności roślin na stres. Bardziej szczegółowy opis ich potencjalnej roli przedstawiono w dalszej części dyskusji.

Stosunkowo niewielka liczba znalezionych wśród 252 miRNA jabłoni cząsteczek zaangażowanych w kształtowanie odporności może być spowodowana dużą zmiennością pomiędzy powtórzeniami biologicznymi, co z kolei wpłynęło na istotność statystyczną wyników. Ponadto wynikać to może z faktu, iż miRNA odpowiadające na stres w warunkach bezstresowych najczęściej nie ulegają ekspresji lub też ekspresja ich jest na bardzo niewielkim poziomie (Kawashima i in., 2009; Zhao i in., 2009).

Dalsze analizy miRNA uzupełniono danymi transkryptomicznymi przeprowadzonymi przez współpracujący z naszym laboratorium zespół doktora McNellis z Stanowego Uniwersytetu w Pensylwanii (Jensen i in., 2012). W badaniach tych za pomocą mikromacierzy zidentyfikowano 690 transkryptów wykazujących ekspresję różnicową między podkładkami charakteryzującymi się różnym poziomem podatności na zarazę ogniową; 665 z nich miało wyższą ekspresję w drzewach o większej, natomiast tylko 25 w drzewach o mniejszej odporności. Warto podkreślić, że badania były prowadzone na tej samej odmianie jabłoni, szczepionej na takich samych podkładkach i pochodzących z tego samego sadu badawczego. Wśród sekwencji docelowych dla zidentyfikowanych miRNA trzy znajdowały się w zestawie opublikowanym przez Jensena i in. (2012): *NHX1* (białko transportowe jonów  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ), hydrolaza dienelaktonowa (ang. *dienelactone hydrolyase*) oraz roślinna nodulina (białko brodawek korzeniowych roślin motylkowych). Wszystkie trzy transkrypty wykazywały zwiększoną ekspresję u drzew bardziej odpornych na zarazę ogniową.

Transkrypt genu *NHX1* jest najprawdopodobniej regulowany przez cztery zidentyfikowane w badaniu jako nowe prekursorsy miRNA: mdm-miR142N, mdm-miR143N, mdm-miR144N i mdm-miR145N posiadające identyczną sekwencję dojrzałej cząsteczki. Różnice w ekspresji miRNA pomiędzy drzewami rosnącymi na różnych podkładkach nie były istotne statystycznie, choć ich ekspresja była niemal dwukrotnie wyższa w drzewach podatnych na zarazę ogniową (M.27 i B.9). Niemniej jednak poziomy ekspresji tych miRNA były we wszystkich przypadkach bardzo niskie. Białko *NHX1* zapobiega wypływowi elektrolitów i substancji odżywczych przez błonę komórkową podczas infekcji u roślin. Zjawisko to zostało zaobserwowane u gruszy po inokulacji bakteriami *E. amylovora* (Brisset i in., 1990). Łącząc powyższe wyniki, można przypuszczać, że u drzew rosnących na odpornych podkładkach, niższa ekspresja mdm-miR142N-145N pozwala na utrzymanie wyższego poziomu transkryptów genu *NHX1*, który odgrywa rolę w procesach pomagających roślinie w ochronie błony komórkowej przed ewentualną infekcją.

Produkt drugiego genu, który może mieć wpływ na odporność jabłoni na zarazę ogniową, wykazuje duże podobieństwo do białek z rodziny hydrolaz dienelektonowych. Zaobserwowano jego podwyższony poziom w drzewach odpornych na zarazę ogniową (Jensen i in., 2012). Zgodnie z analizami autorki, jego transkrypt stanowi sekwencję docelową dla mdm-miR159a,b, który nie wykazuje jednak zróżnicowanej ekspresji między podkładkami; być może wynik testu statystycznego jest rezultatem bardzo wysokiego poziomu zmienności ekspresji tej cząsteczki miRNA pomiędzy powtórzeniami biologicznymi. Co interesujące, analizy przebiegu ekspresji w czasie w drzewach odpornych wykazały, że mdm-miR159a,b oraz mdm-miR159c w istotny sposób obniżają swoją ekspresję w czasie od 2 do 72 HPI w próbach inokulowanych, ale nie w próbach kontrolnych (Tabela 16). Oznacza to, że obecność bakterii wywołuje spadek ekspresji mdm-miR159, a co za tym idzie – najprawdopodobniej zwiększenie poziomu transkryptu docelowego, którym jest hydrolaza dienelektonowa. Zwiększona ekspresja hydrolazy dienelektonowej została zaobserwowana u soi (*Glycine max*) po inokulacji grzybiczej (Tremblay i in., 2010), jak również u sosny *Pinus thunbergii* po infekcji nicieniem *Bursaphelenchus xylophilus* (Nose i Shiraishi, 2011). W ramach pracy doktorskiej nie mierzono ekspresji samego białka, ale spadek poziomu ekspresji przypuszczalnie regulującej go cząsteczki miRNA pośrednio potwierdza te wyniki.

Rola w kształtowaniu odporności białka kodowanego przez trzeci z genów wyselekcjonowanych na podstawie analizy zmienności ekspresji transkryptów i regulujących ich ekspresję miRNA, noduliny, przedstawiona została w podrozdziale 5.6.1.

## **5.5 Odpowiedź cząsteczek mikroRNA na inokulację bakteriami *Erwinia amylovora***

W drugiej części pracy zidentyfikowano cztery miRNA wykazujące różnice w ekspresji w zależności od zastosowanej podkładki. Ekspresja mdm-miR535b,c w liściach zaszczeplonych na odpornej podkładce G.30 była na poziomie zerowym. Ekspresja tej cząsteczki była zauważalna, choć na niskim poziomie, w próbach pochodzących z drzew rosnących na podkładce podatnej. Niemniej po inokulacji cząsteczka została wykryta zarówno w odpornych, jak i nieodpornych drzewach. Z uwagi na interesujące dane z tych oraz innych badań, szczegółowy opis potencjalnej roli mdm-miR535b,c w kształtowaniu odporności i odpowiedzi na inokulację znajduje się w osobnym podrozdziale (5.6.1).

Trzy pozostałe miRNA wykazujące zależną od podkładki zmianę ekspresji w odpowiedzi na inokulację to mdm-miR395h, mdm-miR395a,d i mdm-miR141N. Wykazały zwiększony poziom ekspresji w inokulowanych drzewach rosnących na podatnych na zarazę ogniową podkładkach (M.27), w porównaniu do drzew rosnących na podkładkach odpornych (G.30), w których to zauważalny jest spadek ich ekspresji. W nieinokulowanych kontrolach ich ekspresja nie różniła się istotnie pomiędzy podkładkami (Rysunek 17). Wymienione cząsteczki należą do tej samej rodziny miR395, która jak do tej pory udowodniono, jest związana z odpowiedzią roślin na stres abiotyczny u roślin, taki jak niedobór siarki, zasolenie, czy promieniowanie UV (Kruszka K i in., 2012). W niniejszym opracowaniu znaleziono dodatkowe transkrypty docelowe, które mogą uczestniczyć w odpowiedzi na stres bakteryjny. mdm-miR395h prawdopodobnie reguluje ekspresję białka transportującego jony potasowe i utrzymującego ich równowagę w komórce. Doniesienia innych badaczy wskazują, że stężenie potasu w komórce ulega zaburzeniu podczas stresu biotycznego i abiotycznego u roślin (Shabala i Pottosin, 2014), co może tłumaczyć udział mdm-miR395h w odpowiedzi komórki na stres bakteryjny. W podobny sposób mdm-miR395a,d, regulując ekspresję białka transportowego kationów (z ang. *cation transport regulator-like protein 2*), może odgrywać istotną rolę regulatorową w warunkach stresu biotycznego. Natomiast transkryptem docelowym dla mdm-miR141N jest *luminal-binding protein 5* zaangażowane w odpowiedź rośliny na stres abiotyczny (Koizumi, 1996; Valente i in., 2009) oraz kinaza kazeinowa biorąca udział w szlakach odpowiedzi na stres u *A. thaliana* (Mulekar i in., 2012).

Innym aspektem drugiego etapu projektu było znalezienie różnic w profilach ekspresji miRNA przed zakażeniem bakteriami *E. amylovora* i po nim – niezależnie od podkładki. W tym celu porównano poziomy ekspresji wszystkich zidentyfikowanych miRNA w inokulowanych (poprzez nacięcie nożyczkami zanurzonymi w roztworze bakteryjnym) liściach z materiałem kontrolnym (naciętym bez bakterii). W ten sposób zidentyfikowano trzy miRNA: mdm-miR168a,b, mdm-miR194C i mdm-miR1392C. Rola mdm-miR168a,b, którego poziom ekspresji statystycznie istotnie zmienił się w przypadku podkładki odpornej, została opisana w osobnym podrozdziale (5.6.2). Cząsteczka mdm-miR194C wykazała istotne zmiany w ekspresji jedynie w próbach pochodzących z drzew rosnących na podkładce odpornej, a mdm-miR1392C – zarówno w przypadku jednej, jak i drugiej podkładki. Ze względu na bardzo podobną sekwencję obu cząsteczek przewidziane zostały dla nich te same transkrypty docelowe: beta-mannozydaza (MAN7) oraz transferaza GUX4. Pierwsza jest zaangażowana w proces kiełkowania nasion,

natomiast GUX4 uczestniczy w metabolizmie ściany komórkowej (<http://www.uniprot.org/uniprot>). U roślin mechanizmy odbudowy ściany komórkowej, takie jak odkładanie celulozy i ligniny, odgrywają istotną rolę w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny (Hamann, 2012; Zagorchev i in., 2014). Może to oznaczać związek mdm-miR194C i mdm-miR1392C z odpowiedzią jabłoni na zarazę ogniową.

Warto przypomnieć, że wszystkie trzy powyżej wymienione miRNA, wykazujące zróżnicowaną ekspresję w odpowiedzi na inokulację, wykazują także ekspresję różnicową w czasie – zarówno w zakażonych, jak i niezakażonych drzewach (Rysunek 19). Poziom mdm-miR168a,b rośnie w przypadku obu podkładek, choć jest znacznie większy w liściach inokulowanych (Rysunek 19). Może to oznaczać, że wzrost ekspresji jest odpowiedzią zarówno na obecność bakterii, jak i reakcją na stres uszkodzenia tkanki. Co ciekawe, w przypadku mdm-miR194C i mdm-miR1392C poziom ich ekspresji wzrósł znacznie bardziej w grupie kontrolnej. W tym przypadku stres uszkodzenia tkanek i infekcji bakteryjnej mogą więc wywoływać przeciwne efekty na poziom ekspresji miRNA.

Wspomniana powyżej analiza ekspresji w czasie polegała na określeniu zmiany poziomu ekspresji w czasie od 2 do 72 godzin po inokulacji lub samym nacięciu tkanek (próby kontrolne) w drzewach rosnących na odpornej podkładce G.30. Spośród 73 miRNA wykazujących zróżnicowaną ekspresję tylko 20 (Tabela 16) istotnie zwiększało lub zmniejszało swoją ekspresję w czasie wyłącznie w próbach zakażonych. Wydaje się, że te 20 cząsteczek może więc uczestniczyć w reakcjach odpowiedzi jabłoni na zarazę ogniową. Pozostałe 53 miRNA w istotny sposób zmieniają swoją ekspresję w czasie w próbach kontrolnych, co może oznaczać ich udział w odpowiedzi na stres uszkodzenia tkanki. Rodzi się zatem pytanie, czy zastosowana technika inokulacji była właściwa, skoro indukuje dwa stesy: mechanicznego uszkodzenia tkanek oraz infekcji bakteryjnej. Zastosowane w niniejszej pracy nacinanie nożyczkami zanurzonymi w roztworze bakteryjnym jest metodą najczęściej stosowaną (Martinez-Bilbao i in., 2009; Norelli i in., 2009; Sillerova i in., 2011), jednak w przyszłości należałoby rozważyć inne techniki inokulacji, takie jak nakłuwanie, moczenie, nakrapianie roztworem bakterii (Ruz i in., 2008). Z drugiej strony, w warunkach naturalnych bakterie mogą wnikać do rośliny nie tylko przez naturalne otwory (aparaty szparkowe, przetchlinki), ale także przez uszkodzone tkanki (patrz „Wstęp”). Zatem stres uszkodzenia tkanek oraz infekcji bakteryjnej często współwystępują w naturze.



## 5.6 Rola wybranych cząsteczek mikroRNA w kształtowaniu odporności na zarazę ogniową oraz w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne

### 5.6.1. Cząsteczka mdm-miR535b,c

Poszukiwania miRNA mogących brać udział w odpowiedzi na zarazę ogniową pozwoliły wytypować między innymi mdm-miR535b,c, na którego potencjalną rolę wskazują zarówno wyniki pierwszego i drugiego etapu badań, jak i badania transkryptomów przeprowadzone przez zespół P. Jensena (2012). Analiza miRNA specyficznych dla poszczególnych podkładek pozwoliła zidentyfikować mdm-miR535b,c jako jednego kandydata, którego ekspresja była specyficzna dla podkładek podatnych na zarazę ogniową, czyli B.9 i M.27, zerowa zaś dla podkładek odpornych (G.30 i M.111). Wynik został potwierdzony również w drugiej części niniejszych badań – mdm-miR535b,c wykazywał brak ekspresji w niezakażonych liściach jabłoni rosnących na podkładkach G.30. Obserwacja ta oznacza również, że samo nacięcie tkanek w próbach kontrolnych nie wpłynęło na ekspresję mdm-miR535b,c. Dodatkowo cząsteczka wykazywała ekspresję (choć na niskim poziomie) we wszystkich zakażonych próbach bez względu na rodzaj podkładki, co może oznaczać jej uniwersalną aktywację podczas infekcji bakteryjnej. Analizy sekwencji docelowych pod kątem udziału mdm-miR535b,c w kształtowaniu odporności oraz w odpowiedzi na zarazę ogniową wytypowały dwa docelowe transkrypty: czynnik transkrypcyjny SBP oraz nodulinę.

W świetle przeprowadzonych badań szczególnie interesująca jest nodulina, gdyż w badaniach P. Jensena (Jensen i in., 2012) wykazano, że transkrypty o wysokim podobieństwie do nodulin wykazują wyższą ekspresję w zdrowych zrazach rosnących na odpornych na zarazę ogniową podkładkach niż w tych rosnących na podkładkach podatnych. Białka z rodziny nodulin są wytwarzane nie tylko u roślin strączkowych, u których biorą udział w tworzeniu brodawek korzeniowych (ang. *root nodules*), ale również u innych gatunków roślin, w przypadku których ulegają ekspresji w różnych organach, jak np. u *A. thaliana* (Denance i in., 2014). Zauważono także, że jako białka transbłonowe mogą odgrywać rolę w transporcie takich substancji, jak glukoza, fruktoza, aminokwasy, węglowodany i inne (Denance i in., 2014). Co interesujące, mogą być również zaangażowane w odpowiedź rośliny na stres biotyczny, w tym atak patogenów oraz na stres ciepła u *A. thaliana* (Becker i in., 2001; Fu i in., 2010; Denance i in., 2014). Wykazano, że białka podobne do nodulin są istotne w interakcji pomiędzy rośliną i patogenicznymi

mikroorganizmami, a ich obecność ułatwia proces infekcji patogenów podczas kolonizacji (Denance i in., 2014). Udowodniono również, że noduliny mogą być markerami infekcji bakteriami z rodzaju *Rhizobium* u bobu (*Vicia faba*; (Becker i in., 2001).

Łącząc opisane wyniki z tymi z niniejszej rozprawy, można wysunąć hipotezę, że mdm-miR535b,c odgrywa rolę w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne poprzez regulowanie stężenia białek podobnych do nodulin (Tabela 17). Po infekcji bakteryjnej poziom miRNA rośnie bez względu na rodzaj zastosowanej podkładki, a co za tym idzie – spada poziom noduliny istotnej dla procesu kolonizacji przez patogeny, jak na to wskazują badania Denance’a i innych (2014). A zatem zwiększona ekspresja mdm-miR535b,c może istotnie być reakcją obronną na infekcję. Jak jednak wytłumaczyć wyższy poziom noduliny w odpornych na zarazę ogniową zdrowych drzewach zaobserwowany przez Jensena i innych (2012), zgodny zresztą z naszą obserwacją, że w drzewach tych miRNA mdm-miR535b,c (którego celem jest transkrypt noduliny), nie ulega ekspresji? Wyższy poziom noduliny powinien sprzyjać infekcji, a jednak drzewa te są bardziej odporne. Można to wytłumaczyć, nieco spekulując, tym że drzewa odporne na zarazę ogniową są skolonizowane przez korzystnie działające bakterie tworzące naturalną barierę dla patogenów. W takiej sytuacji uzasadnionym byłoby utrzymywanie wyższego poziomu noduliny sprzyjającej tym bakteriom w kolonizacji i obniżenie poziomu po zaatakowaniu przez patogeny. Powyższa hipoteza jest o tyle prawdopodobna, że przypadki takiej naturalnej bariery przeciwko patogenom są znane i występują nie tylko u zwierząt, ale także u roślin. Przykładowo infekcja rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) i ryżu (*Oryza sativa*) bakterią *Pseudomonas fluorescens* wywołuje odporność odpowiednio na infekcje *Pseudomonas syringae* (Pieterse i in., 2000) i *Magnaporthe oryzae* (De Vleeschauwer i in., 2008).

Jeśli powyższa hipoteza jest prawdziwa, niezwykle ciekawe byłoby sprawdzenie, czy istotnie mamy do czynienia z kolonizacją takimi bakteriami, a jeśli tak to, co sprzyja takiej kolonizacji w przypadku drzew szczepionych na odpornych podkładkach. W pierwszym rzędzie jednak eksperymentalnej weryfikacji wymagałoby to, czy docelowym transkryptem dla mdm-miR535b,c istotnie jest transkrypt białka podobnego do noduliny. W przedstawionych badaniach w celu takiego potwierdzenia przeszukano degradom jabłoni (dane Degradome-Seq, GEO:GSE36065). Potwierdzenia takiego nie znaleziono, co jednak nie wyklucza faktu, że poziom noduliny jest regulowany przez miR535b,c. Należy bowiem pamiętać, że produkty degradacji noduliny nie powinny, zgodnie z naszymi wynikami, znajdować się w materiale ze zdrowych, odpornych drzew, a z takich właśnie pochodził

analizowany degradom (odmiana „Golden delicious” szczepiona na odporne podkłádki M.111; (Xia i in., 2012).

**Tabela 17. Wyniki ekspresji miRNA w kontekście mdm-miR535b,c i noduliny. Podkreślono uzyskane w niniejszej pracy wyniki**

	<b>ODPORNE (G.30, M.111)</b>	<b>PODATNE (B.9, M.27)</b>
<b>ZDROWE LIŚCIE</b>	<u>brak cząsteczki mdm-miR535b,c</u> „dużo” noduliny	<u>obecna cząsteczka mdm-miR535b,c</u> „mało” noduliny
<b>INOKULOWANE LIŚCIE</b>	<u>obecna cząsteczka mdm-miR535b,c</u> poziom <b>noduliny</b> się obniża	<u>obecna cząsteczka mdm-miR535b,c</u> poziom <b>noduliny</b> się obniża

### 5.6.2. Cząsteczka mdm-miR168a,b

Cząsteczka mdm-miR168a,b wykazała w pierwszej części badań większą ekspresję w drzewach podatnych na zarazę ogniową (M.27 i B.9) w porównaniu z drzewami odpornymi. Co prawda, różnica nie była istotna statystycznie, jednakże analizy przeprowadzone w drugim etapie badań wykazały, że poziom ekspresji mdm-miR168a,b jest większy w liściach inokulowanych w porównaniu z kontrolą. W tym przypadku istotny statystycznie był jedynie wzrost poziomu ekspresji w liściach pochodzących z drzew rosnących na podkładce odpornej (G.30; Rysunek 18). Konsekwentnie, porównanie poziomu tej cząsteczki miRNA w czasie 2 i 72 godzin od inokulacji wskazało na istotny wzrost ekspresji (Rysunek 19). Niemniej jednak, zmiana ekspresji w czasie nastąpiła również w próbach kontrolnych (Rysunek 19; Tabela 16), co sugeruje szybką reakcję tej cząsteczki miRNA zarówno na stres nacięcia, jak i stres infekcji bakteryjnej.

Zebrane wyniki nie są jednoznaczne i na tym etapie trudne do pełnego zinterpretowania. Jednakże istotnie wyższy poziom cząsteczki w próbach pochodzących z drzew nieodpornych oraz znacznie większy wzrost poziomu ekspresji po inokulacji liści z drzew odpornych w porównaniu z jedynie naciętymi liśćmi (kontrola) sugerują, że cząsteczka ta może mieć udział w kształtowaniu odporności na zarazę ogniową oraz w odpowiedzi na zakażenie bakteryjne. Być może nie jest to działanie specyficzne, gdyż dane literaturowe wskazują na udział mdm-miR168a,b w odpowiedzi na wiele czynników stresowych, jak np. susza, zasolenie, ciepło, zimno, promieniowanie UV czy mechaniczne uszkodzenie tkanek (Khraiwesh i in., 2012). Potwierdziło się to także w niniejszej pracy, gdzie zwiększony poziom ekspresji został zaobserwowany również w wyniku reakcji na

nacięcie liścia. Na szerokie działanie tej miRNA wskazuje także to, że jego transkryptem docelowym, jak pokazują przeprowadzone analizy, jest białko AGO1. Wynik potwierdza doniesienia innych grup badawczych, które znalazły ten sam transkrypt docelowy (AGO1) dla miR168 u innych roślin (Rhoades i in., 2002; Jones-Rhoades i Bartel, 2004). Funkcja tego białka jest ściśle związana z biogenezą i funkcjami miRNA ponieważ jest ono głównym elementem kompleksu RISC. AGO1 bierze więc zasadniczy udział w mechanizmie wyciszania genów z udziałem cząsteczek miRNA.

### 5.6.3. Cząsteczka mdm-miR169a

Kolejną cząsteczką miRNA potencjalnie zaangażowaną w odporność jabłoni na zarazę ogniową jest mdm-miR169a. Jej zwiększona ekspresja w pędach rosnących na podkładkach odpornych na zarazę ogniową została wykazana zarówno w liczbie odczytów wyrażonych w RPM, jak i potwierdzona techniką *stem-loop* qPCR (Rysunek 11). Z danych literaturowych wynika, że u innych roślin, w tym u rzodkiewnika i kukurydzy, miR169 działa na transkrypt czynnika jądrowego Y (ang. *nuclear factor Y* – NF-Y). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają, że transkryptem docelowym dla mdm-miR169a jest najprawdopodobniej transkrypt o wysokim podobieństwie do podjednostki A czynnika NF-Y poziomki pospolitej (*Fragaria vesca*). Jak wskazuje wiele prac, regulacja tego czynnika przez miR169 może być związana z odpowiedzią rośliny na stres (Nelson i in., 2007; Li i in., 2008; Pant i in., 2009; Leyva-Gonzalez i in., 2012). Ponadto znane są doniesienia, że miR169 uczestniczy w odpowiedzi na infekcję grzybami u pszenicy (Inal i in., 2014), jak również w kształtowaniu tolerancji na suszę i poziom cukru (Calvino i Messing, 2013). Cząsteczka miR169 jest także zaangażowana w rozwój brodawek na korzeniach roślin motylkowych oraz utrzymanie ich równowagi odżywczej (Simon i in., 2009).

### 5.6.4. Cząsteczka mdm-miR167b–g

Różnica w ekspresji mdm-miR167b–g pomiędzy zdrowymi drzewami odpornymi i podatnymi nie była istotna statystycznie. Cząsteczka ta została jednak poddana dalszej analizie ze względu na to, że wiele badań wskazuje na jej rolę w odpowiedzi na różne czynniki stresowe u roślin (Navarro i in., 2006; Liu i in., 2008; Sunkar, 2010). Zwiększona ekspresja mdm-miR167b–g w pędach jabłoni rosnących na podkładkach podatnych na

zarazę ogniową (M.27 i B.9) została wykazana w eksperymencie *stem-loop* PCR, w którym różnice w poziomie ekspresji były istotne statystycznie (Rysunek 11).

Kolejnym potwierdzeniem potencjalnej roli tej cząsteczki w kształtowaniu odporności na zakażenie bakteryjne są wyniki badań inokulowanych jabłoni, w przypadku których mdm-miR167b-g również wykazywał wyższą ekspresję w podatnych drzewach (M.27; średnio ok. 60 RPM) niż w drzewach odpornych (G.30; średnio ok. 40 RPM) zarówno w inokulowanych, jak i zdrowych drzewach. Różnica nie była jednak istotna statystycznie. Jeśli chodzi o transkrypty docelowe dla miR167, w literaturze można znaleźć doniesienia, iż reguluje on ekspresję czynników odpowiadających na auksyny i uczestniczy w odpowiedzi roślin na stres bakteryjny (Navarro i in., 2006; Sunkar, 2010; Varkonyi-Gasic i in., 2010; Zhang i in., 2011). Analiza danych pochodzących z degradomu jabłoni wykonana w ramach niniejszej pracy również potwierdza, że czynnik odpowiadający na auksyny (ang. *auxin response factor*) jest sekwencją docelową dla mdm-miR167b-g.

## 6 Wnioski końcowe

Przeprowadzona w ramach pracy doktorskiej identyfikacja i analiza ekspresji cząsteczek mikroRNA jabłoni pozwoliła w znaczący sposób zwiększyć spektrum znanych dla tego gatunku miRNA. Ponadto wykazano, że rodzaj zastosowanej podkładki wpływa na profil ekspresji miRNA w szczepionych pędach jabłoni. Obserwacja jest zgodna z wcześniej udowodnionym u jabłoni wpływem podkładki na fenotyp, jak również na transkryptom zrazu. Zaobserwowany zatem zróżnicowany profil ekspresji miRNA może stanowić potwierdzenie regulacji ekspresji genów jabłoni przez podkładkę za pośrednictwem właśnie miRNA. Przeprowadzone badania pozwoliły na wytypowanie miRNA, które mogą uczestniczyć w kształtowaniu odporności jabłoni na tę chorobę. W przyszłości cząsteczki te mogą być wykorzystane jako markery odporności jabłoni na zarazę ogniową na wczesnym etapie rozwoju rośliny. Byłoby to niezwykle istotnym zastosowaniem, gdyż rozwój młodych drzew jabłoni jest długi (pierwsze owoce pojawiają się dopiero po kilku latach.) Udało się także zidentyfikować miRNA potencjalnie zaangażowane w odpowiedź jabłoni na stres bakteryjny. Wiedza ta może przydać się w przyszłości do zwiększenia odporności jabłoni na zarazę ogniową dzięki wykorzystaniu metod biotechnologicznych. Niemniej jednak, najpierw należałoby przeprowadzić dalsze analizy funkcjonalne, na przykład z zastosowaniem technik interferencji RNA, w celu uzyskania dodatkowego potwierdzenia funkcji wytypowanych miRNA. W przypadku jabłoni tego typu badania są niestety trudne z uwagi na długi okres wzrostu rośliny oraz wysoki poziom heterozygotyczności.

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki, jedną z najbardziej interesujących cząsteczek wydaje się mdm-miR535b,c, gdyż w jej przypadku udało się zbudować spójną, choć nie potwierdzoną eksperymentalnie, hipotezę. Jeśli jest ona słuszna, to cząsteczka ta mogłaby być wykorzystana zarówno jako marker odporności, jak i do opracowania biotechnologicznych metod zwalczania zarazy ogniowej, a być może także innych chorób pochodzenia bakteryjnego.

## **7 Supplement**

## 8 Spis rysunków

Rysunek 1. Biogeneza cząsteczek mikroRNA u roślin (A) i u zwierząt (B). Zmodyfikowano za (Du i Zamore, 2005) .....	11
Rysunek 2. Schemat reakcji <i>stem-loop</i> RT-PCR. F – znacznik fluorescencyjny; Q – cząsteczka wygaszająca fluorescencję; zielone trójkąty – sygnał emitowany przez SYBR Green; zmodyfikowano za (Eldem i in., 2013) .....	17
Rysunek 3. Skrypt napisany w celu obliczenia rozkładu długości odczytów dla każdej z bibliotek sRNA .....	29
Rysunek 4. Produkty PCR dla mdm-miR227N (A) i genu referencyjnego U6 (B) na 3-procentowym żelu agarozowym. Reakcję przeprowadzono na cDNA uzyskanym z udziałem odwrotnej transkryptazy (RT+) oraz kontrolnie bez jej udziału (RT-); kontrola wodna (KW).....	35
Rysunek 5. Liczba odczytów redundantnych i nieredundantnych w dwunastu bibliotekach małych RNA jabłoni .....	41
Rysunek 6. Rozkład długości i pierwszego nukleotydu w odczytach małych RNA w dwunastu bibliotekach jabłoni.....	42
Rysunek 7. Schemat analityczny zastosowany w celu identyfikacji prekursorów cząsteczek mikroRNA u jabłoni.....	44
Rysunek 8. Struktury przewidziane dla prekursorów wybranych cząsteczek mikroRNA. Kolorem czerwonym zaznaczono sekwencję dojrzałej cząsteczki miRNA .....	45
Rysunek 9. Żel agarozowy przedstawiający rozdział elektroforetyczny cDNA prekursorów pięciu nowych cząsteczek mikroRNA: mdm-miR227N, mdm-miR260N, mdm-miR285N, mdm-miR200N i mdm-miR132N. Produkty otrzymano techniką RT-PCR.....	46
Rysunek 10. Średnie poziomy ekspresji w zależności od podkładki dla czternastu cząsteczek mikroRNA wykazujących zróżnicowaną ekspresję według testu ANOVA .....	50
Rysunek 11. Średnie poziomy ekspresji dla mdm-miR167b–g, mdm-miR399a–c, mdm-miR169a oraz mdm-miR227N określone za pomocą liczby odczytów głębokiego sekwencjonowania (Deep seq.) oraz <i>stem-loop</i> RT-PCR (qPCR). Symbol * przy legendzie wykresu – występowanie różnic istotnych statystycznie dla danej metody według testu ANOVA.....	54
Rysunek 12. Strona główna bazy danych cząsteczek mikroRNA jabłoni ( <a href="http://lemur.amu.edu.pl/share/apple_miRNAs">http://lemur.amu.edu.pl/share/apple_miRNAs</a> ) .....	57
Rysunek 13. Rozkład długości odczytów małych RNA dla osiemnastu bibliotek sRNA jabłoni .....	61



<b>Rysunek 14. Porównanie trzech zestawów dojrzałych cząsteczek mikroRNA jabłoni: z bazy miRBase (wersja 21), z pierwszej (Kaja i in. 2015) i drugiej (ShortStack) części niniejszej pracy .....</b>	<b>63</b>
<b>Rysunek 15. Zdjęcie żelu agarozowego przedstawiającego rozdział elektroforetyczny cDNA prekursorów dziewięciu potwierdzonych nowych cząsteczek mikroRNA jabłoni: mdm-miR188C, mdm-miR143C, mdm-miR1185C(1 i 2), mdm-miR282C, mdm-miR455C, mdm-miR1406C, mdm-miR121C i mdm-miR1392C .....</b>	<b>64</b>
<b>Rysunek 16. Różnica ekspresji mdm-miR535b,c pomiędzy podkładkami G.30 i M.27; <i>p</i> – skorygowana wartość prawdopodobieństwa .....</b>	<b>67</b>
<b>Rysunek 17. Różnica ekspresji mdm-miR395h, mdm-miR395a,d i mdm-miR141N pomiędzy podkładkami G.30 i M.27 .....</b>	<b>67</b>
<b>Rysunek 18. Uśrednione poziomy ekspresji dla mdm-miR168a,b, mdm-miR194C i mdm-miR1392C próbach inokulowanych bakterią i w próbach kontrolnych .....</b>	<b>68</b>
<b>Rysunek 19. Cząsteczki mikroRNA ulegające zróżnicowanej ekspresji w czasie i jednocześnie zależnej od inokulacji; wartości prawdopodobieństwa <i>p</i> usytuowane wyżej odnoszą się do porównania ekspresji w czasie, natomiast te położone niżej do porównania próby kontrolne vs. inokulowane .....</b>	<b>71</b>
<b>Rysunek 20. Poziomy ekspresji dla mdm-miR194C i mdm-miR121C określone techniką <i>stem-loop</i> RT-PCR; Symbol * przy legendzie wykresu – występowanie istotnych statystycznie różnic ekspresji w czasie; test istotności wykonano programem DataAssist (Thermo Fisher Scientific) .....</b>	<b>72</b>

## 9 Spis tabel

Tabela 1. Startery zaprojektowane dla siedmiu dojrzałych cząsteczek mikroRNA do reakcji <i>stem-loop</i> RT-PCR.....	32
Tabela 2. Składniki mieszaniny reakcyjnej do reakcji denaturacji poprzedzającej odwrotną transkrypcję.....	33
Tabela 3. Profil reakcji odwrotnej transkrypcji.....	33
Tabela 4. Profil kontrolnej PCR przeprowadzanej przed PCR w czasie rzeczywistym dla tych samych starterów.....	34
Tabela 5. Profil reakcji <i>stem-loop</i> RT PCR.....	36
Tabela 6. Sekwencje starterów wykorzystanych do reakcji RT-PCR na prekursorzy wybranych cząsteczek mikroRNA.....	37
Tabela 7. Profil reakcji łańcuchowej polimerazy dla nowych prekursorów cząsteczek miRNA.....	37
Tabela 8. Liczby odczytów dla dwunastu bibliotek małych RNA.....	40
Tabela 9. Liczba zidentyfikowanych cząsteczek mikroRNA dla jabłoni.....	45
Tabela 10. Prekursorzy cząsteczek mikroRNA jabłoni, które potwierdzono techniką RT-PCR i/lub obecnością EST w bazie NCBI.....	47
Tabela 11. Cząsteczki mikroRNA jabłoni charakteryzujące się najwyższym poziomem ekspresji wyrażonym w RPM w pędach rosnących na poszczególnych podkładkach.....	49
Tabela 12. Wyniki testu Tukeya dla czternastu cząsteczek miRNA wykazujących statystycznie istotną różnicę ekspresji między parami podkładek; wyłuszczone pary podkładek różniące się istotnie.....	51
Tabela 13. Zestawienie prób użytych do przygotowania bibliotek małych RNA. hpi – liczba godzin po inokulacji (ang. <i>hours post inoculation</i> ).....	59
Tabela 14. Statystyki dla wyników sekwencjonowania osiemnastu bibliotek cząsteczek mikroRNA jabłoni.....	60
Tabela 15. Średnie poziomy ekspresji (dla osiemnastu bibliotek małych RNA) dziesięciu cząsteczek mikroRNA o najwyższej ekspresji w liściach jabłoni z rozróżnieniem na podkładki; ko – kontrola; in – inokulowane; 2 HPI – próby 2 godziny po inokulacji.....	65
Tabela 16. Siedemdziesiąt trzy cząsteczki mikroRNA jabłoni wykazujące zróżnicowaną w czasie ekspresję. Strzałkami oznaczono wzrost i spadek poziomu ekspresji, a kolorem czerwonym zmiany istotne statystycznie.....	70
Tabela 17. Wyniki ekspresji miRNA w kontekście mdm-miR535b,c i noduliny. Podkreślono uzyskane w niniejszej pracy wyniki.....	83

## 10 Literatura

Aird D, Ross MG, Chen WS, Danielsson M, Fennell T, Russ C, Jaffe DB, Nusbaum C, Gnirke A (2011) Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol* 12: R18

Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-279

An J, Lai J, Sajjanhar A, Lehman ML, Nelson CC (2014) miRPlant: an integrated tool for identification of plant miRNA from RNA sequencing data. *BMC Bioinformatics* 15: 275

Ardekani AM, Naeini MM (2010) The Role of MicroRNAs in Human Diseases. *Avicenna J Med Biotechnol* 2: 161-179

Ashelford K, Eriksson ME, Allen CM, D'Amore R, Johansson M, Gould P, Kay S, Millar AJ, Hall N, Hall A (2011) Full genome re-sequencing reveals a novel circadian clock mutation in *Arabidopsis*. *Genome Biol* 12: R28

Autio WR, Southwick FW (1986) The effects of rootstock and root-interstem combination on the growth, productivity, and anchorage of a spur and standard strain of delicious apple tree. *Fruit Varieties Journal* 40: 128–133

Axtell MJ (2013a) Classification and comparison of small RNAs from plants. *Annual review of plant biology* 64: 137-159

Axtell MJ (2013b) ShortStack: comprehensive annotation and quantification of small RNA genes. *RNA* 19: 740-751

Axtell MJ, Westholm JO, Lai EC (2011) Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol* 12: 221

Baldo A, Norelli JL, Farrell RE, Jr., Bassett CL, Aldwinckle HS, Malnoy M (2010) Identification of genes differentially expressed during interaction of resistant and susceptible apple cultivars (*Malus x domestica*) with *Erwinia amylovora*. *BMC Plant Biol* 10: 1

Bao N, Lye KW, Barton MK (2004) MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev Cell* 7: 653-662

Bartel B, Bartel DP (2003) MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol* 132: 709-717

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297

Bazzini AA, Almasia NI, Manacorda CA, Mongelli VC, Conti G, Maroniche GA, Rodriguez MC, Distefano AJ, Hopp HE, del Vas M, Asurmendi S (2009) Virus infection elevates transcriptional activity of miR164a promoter in plants. *BMC Plant Biol* 9: 152

- Becker JD, Moreira LM, Kapp D, Frosch SC, Puhler A, Perlic AM (2001) The nodulin vfENOD18 is an ATP-binding protein in infected cells of *Vicia faba* L. nodules. *Plant Mol Biol* 47: 749-759
- Benes V, Castoldi M (2010) Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50: 244-249
- Benjamini Y, Speed TP (2012) Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res* 40: e72
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35: 215-217
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10: 185-191
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13: 1097-1101
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3: e85
- Brisset MN, Ochatt SJ, Paulin JP (1990) Evidence for quantitative responses during co-culture of *Pyrus communis* protoplasts and *Erwinia amylovora*. *Plant Cell Rep* 9: 272-275
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29: 23-39
- Calvino M, Messing J (2013) Discovery of MicroRNA169 gene copies in genomes of flowering plants through positional information. *Genome Biol Evol* 5: 402-417
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10: 421
- Carra A, Mica E, Gambino G, Pindo M, Moser C, Pe ME, Schubert A (2009) Cloning and characterization of small non-coding RNAs from grape. *Plant J* 59: 750-763
- Chang S, Wen S, Chen D, Jin P (2009) Small regulatory RNAs in neurodevelopmental disorders. *Hum Mol Genet* 18: R18-26
- Chavez Montes RA, de Fatima Rosas-Cardenas F, De Paoli E, Accerbi M, Rymarquis LA, Mahalingam G, Marsch-Martinez N, Meyers BC, Green PJ, de Folter S (2014) Sample sequencing of vascular plants demonstrates widespread conservation and divergence of microRNAs. *Nat Commun* 5: 3722
- Chellappan P, Xia J, Zhou X, Gao S, Zhang X, Coutino G, Vazquez F, Zhang W, Jin H (2010) siRNAs from miRNA sites mediate DNA methylation of target genes. *Nucleic Acids Res* 38: 6883-6894

- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33: e179
- Chen X, Zhang Z, Liu D, Zhang K, Li A, Mao L (2010) SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: star players for plant growth and development. *J Integr Plant Biol* 52: 946-951
- Chen XM (2009) MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol* 15: 1665-1672
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436: 740-744
- Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H (1998) A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev* 12: 3715-3727
- Dai X, Zhao PX (2011) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res* 39: W155-159
- De Vleeschauwer D, Djavaheri M, Bakker PA, Hofte M (2008) *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response. *Plant Physiol* 148: 1996-2012
- Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, Masuo Y, Agrawal G (2007) Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics* 8: 234-251
- Degrave A, Fagard M, Perino C, Brisset MN, Gaubert S, Laroche S, Patrit O, Barny MA (2008) *Erwinia amylovora* type three-secreted proteins trigger cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1076-1086
- Denance N, Szurek B, Noel LD (2014) Emerging functions of nodulin-like proteins in non-nodulating plant species. *Plant Cell Physiol* 55: 469-474
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432: 231-235
- Ding D, Zhang L, Wang H, Liu Z, Zhang Z, Zheng Y (2009) Differential expression of miRNAs in response to salt stress in maize roots. *Ann Bot* 103: 29-38
- Ding Y, Chen Z, Zhu C (2011) Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot* 62: 3563-3573
- Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H (2008) Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* 36: e105

- Dong Z, Han MH, Fedoroff N (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9970-9975
- Du P, Wu J, Zhang J, Zhao S, Zheng H, Gao G, Wei L, Li Y (2011) Viral infection induces expression of novel phased microRNAs from conserved cellular microRNA precursors. *PLoS Pathog* 7: e1002176
- Du T, Zamore PD (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132: 4645-4652
- Duncan DD, Eshoo M, Esau C, Freier SM, Lollo BA (2006) Absolute quantitation of microRNAs with a PCR-based assay. *Anal Biochem* 359: 268-270
- Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z (2009) GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10: 48
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30: 207-210
- Eldem V, Okay S, Unver T (2013) Plant microRNAs: new players in functional genomics. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 37: 1-21
- Elzebroek ATG, Wind K (2008) Guide to cultivated plants. CABI, Wallingford, UK ; Cambridge, MA
- Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL (2003) Radial patterning of Arabidopsis shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* 13: 1768-1774
- Evers M, Huttner M, Dueck A, Meister G, Engelmann JC (2015) miRA: adaptable novel miRNA identification in plants using small RNA sequencing data. *BMC Bioinformatics* 16: 370
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, Givan SA, Law TF, Grant SR, Dangl JL, Carrington JC (2007) High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of MIRNA genes. *PLoS One* 2: e219
- Fahlgren N, Jogdeo S, Kasschau KD, Sullivan CM, Chapman EJ, Laubinger S, Smith LM, Dasenko M, Givan SA, Weigel D, Carrington JC (2010) MicroRNA gene evolution in Arabidopsis lyrata and Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 22: 1074-1089
- Fallahi E, Colt WM, Fallahi B, Chun IJ (2002) The importance of apple rootstocks on tree growth, yield, fruit quality, leaf nutrition, and photosynthesis with an emphasis on 'Fuji'. *Hort Technology* 12: 38-44
- Ferree DC, Warrington IJ, ebrary Inc. (2003) Apples botany, production, and uses. CABI Pub., New York, NY, pp xi, 660 p., 632 p. of plates

- Folkes L, Moxon S, Woolfenden HC, Stocks MB, Szittyá G, Dalmay T, Moulton V (2012) PAREsnip: a tool for rapid genome-wide discovery of small RNA/target interactions evidenced through degradome sequencing. *Nucleic Acids Res* 40: e103
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92-105
- Fu Q, Li S, Yu D (2010) Identification of an Arabidopsis Nodulin-related protein in heat stress. *Mol Cells* 29: 77-84
- Gardiner SE, Norelli JL, de Silva N, Fazio G, Peil A, Malnoy M, Horner M, Bowatte D, Carlisle C, Wiedow C, Wan Y, Bassett CL, Baldo AM, Celton JM, Richter K, Aldwinckle HS, Bus VG (2012) Putative resistance gene markers associated with quantitative trait loci for fire blight resistance in *Malus* 'Robusta 5' accessions. *BMC Genet* 13: 25
- Geider K (2000) Expolysaccharides of *Erwinia amylovora*: structure, biosynthesis, regulation, role in pathogenicity of amylovoran and levan. In: Vanneste JL (ed) Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. . CABI, New York, pp 117-140
- Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, Hammond SM, Bartel DP, Schier AF (2005) MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308: 833-838
- Gleave AP, Ampomah-Dwamena C, Berthold S, Dejnoprát S, Karunairetnam S, Nain B, Wang Y, Crowhurst RN, MacDiarmid RM (2008) Identification and characterisation of primary microRNAs from apple (*Malus domestica* cv. Royal Gala) expressed sequence tags. *Tree Genetics & Genomes* 4: 343–358
- Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432: 235-240
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106: 23-34
- Gudys A, Szczesniak MW, Sikora M, Makalowska I (2013) HuntMi: an efficient and taxon-specific approach in pre-miRNA identification. *BMC Bioinformatics* 14: 83
- Guo N, Ye WW, Wu XL, Shen DY, Wang YC, Xing H, Dou DL (2011) Microarray profiling reveals microRNAs involving soybean resistance to *Phytophthora sojae*. *Genome* 54: 954-958
- Hamann T (2012) Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms. *Front Plant Sci* 3: 77
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293: 1146-1150
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18: 3016-3027

- Hansey CN, Vaillancourt B, Sekhon RS, de Leon N, Kaeppler SM, Buell CR (2012) Maize (*Zea mays* L.) genome diversity as revealed by RNA-sequencing. *PLoS One* 7: e33071
- Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H (2005) Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 435: 974-978
- He XF, Fang YY, Feng L, Guo HS (2008) Characterization of conserved and novel microRNAs and their targets, including a TuMV-induced TIR-NBS-LRR class R gene-derived novel miRNA in *Brassica*. *FEBS Lett* 582: 2445-2452
- Hu CG, Honda C, Kita M, Zhang Z, Tsuda T, Moriguchi T (2002) A Simple Protocol for RNA Isolation from Fruit Trees Containing High Levels of Polysaccharides and Polyphenol Compounds. *Plant Molecular Biology Reporter* 20
- Hu Q, Hollunder J, Niehl A, Korner CJ, Gereige D, Windels D, Arnold A, Kuiper M, Vazquez F, Pooggin M, Heinlein M (2011) Specific impact of tobamovirus infection on the *Arabidopsis* small RNA profile. *PLoS One* 6: e19549
- Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT (2007) Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics* 31: 367-373
- Inal B, Turktas M, Eren H, Ilhan E, Okay S, Atak M, Erayman M, Unver T (2014) Genome-wide fungal stress responsive miRNA expression in wheat. *Planta* 240: 1287-1298
- Jagadeeswaran G, Saini A, Sunkar R (2009) Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. *Planta* 229: 1009-1014
- Jensen PJ, Halbrecht N, Fazio G, Makalowska I, Altman N, Praul C, Maximova SN, Ngugi HK, Crassweller RM, Travis JW, McNellis TW (2012) Rootstock-regulated gene expression patterns associated with fire blight resistance in apple. *BMC genomics* 13: 9
- Jian X, Zhang L, Li G, Zhang L, Wang X, Cao X, Fang X, Chen F (2010) Identification of novel stress-regulated microRNAs from *Oryza sativa* L. *Genomics* 95: 47-55
- Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, Li M, Wang G, Liu Y (2009) miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res* 37: D98-104
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004) Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 14: 787-799
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual review of plant biology* 57: 19-53
- Juarez MT, Kui JS, Thomas J, Heller BA, Timmermans MC (2004) microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature* 428: 84-88



- Jung S, Ficklin SP, Lee T, Cheng CH, Blenda A, Zheng P, Yu J, Bombarely A, Cho I, Ru S, Evans K, Peace C, Abbott AG, Mueller LA, Olmstead MA, Main D (2014) The Genome Database for Rosaceae (GDR): year 10 update. *Nucleic Acids Res* 42: D1237-1244
- Kaja E, Szczesniak MW, Jensen PJ, Axtell MJ, McNellis T, Makalowska I (2015) Identification of apple miRNAs and their potential role in fire blight resistance. *Tree Genetics & Genomes* 11
- Kanagawa T (2003) Bias and artifacts in multitemplate polymerase chain reactions (PCR). *J Biosci Bioeng* 96: 317-323
- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretzschmar T, Lee Y, Martinoia E (2011) Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* 9: e0153
- Kaufmann K, Muino JM, Osteras M, Farinelli L, Krajewski P, Angenent GC (2010) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of plant transcription factors followed by sequencing (ChIP-SEQ) or hybridization to whole genome arrays (ChIP-CHIP). *Nat Protoc* 5: 457-472
- Kawashima CG, Yoshimoto N, Maruyama-Nakashita A, Tsuchiya YN, Saito K, Takahashi H, Dalmay T (2009) Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *Plant J* 57: 313-321
- Kersey PJ, Lawson D, Birney E, Derwent PS, Haimel M, Herrero J, Keenan S, Kerhornou A, Koscielny G, Kahari A, Kinsella RJ, Kulesha E, Maheswari U, Megy K, Nuhn M, Proctor G, Staines D, Valentin F, Vilella AJ, Yates A (2010) Ensembl Genomes: extending Ensembl across the taxonomic space. *Nucleic Acids Res* 38: D563-569
- Khan MA, Zhao YF, Korban SS (2012) Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Resistance to the Bacterial Pathogen *Erwinia amylovora*, Causal Agent of Fire Blight Disease in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 247-260
- Khraiwesh B, Zhu JK, Zhu J (2012) Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim Biophys Acta* 1819: 137-148
- Kidner C, Timmermans M (2006) In situ hybridization as a tool to study the role of microRNAs in plant development. *Methods Mol Biol* 342: 159-179
- Kidner CA, Martienssen RA (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* 428: 81-84
- Kim M, Canio W, Kessler S, Sinha N (2001) Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* 293: 287-289
- Kim VN, Han J, Siomi MC (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 126-139
- Klein ME, Impey S, Goodman RH (2005) Role reversal: the regulation of neuronal gene expression by microRNAs. *Curr Opin Neurobiol* 15: 507-513
- Knight SW, Bass BL (2001) A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 293: 2269-2271

- Koczan JM, McGrath MJ, Zhao Y, Sundin GW (2009) Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. *Phytopathology* 99: 1237-1244
- Koizumi N (1996) Isolation and responses to stress of a gene that encodes a luminal binding protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 37: 862-865
- Kozarewa I, Ning Z, Quail MA, Sanders MJ, Berriman M, Turner DJ (2009) Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of (G+C)-biased genomes. *Nat Methods* 6: 291-295
- Kruszka K, Pieczynski M, Windels D, Bielewicz D, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z, F V (2012) Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments. *J Plant Physiol* 169: 1664-1672
- Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12: 206-212
- Lang QL, Zhou XC, Zhang XL, Drabek R, Zuo ZX, Ren YL, Li TB, Chen JS, Gao XL (2011) Microarray-based identification of tomato microRNAs and time course analysis of their response to Cucumber mosaic virus infection. *J Zhejiang Univ Sci B* 12: 116-125
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10: R25
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858-862
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21: 4663-4670
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120: 15-20
- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115: 787-798
- Leyva-Gonzalez MA, Ibarra-Laclette E, Cruz-Ramirez A, Herrera-Estrella L (2012) Functional and transcriptome analysis reveals an acclimatization strategy for abiotic stress tolerance mediated by *Arabidopsis* NF-YA family members. *PLoS One* 7: e48138

- Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK (2008) The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* 20: 2238-2251
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008) Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. *RNA* 14: 836-843
- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012: 251364
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC (2002) Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297: 2053-2056
- Lopez-Gomollon S (2011) Detecting sRNAs by Northern blotting. *Methods Mol Biol* 732: 25-38
- Lv DK, Bai X, Li Y, Ding XD, Ge Y, Cai H, Ji W, Wu N, Zhu YM (2010) Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays. *Gene* 459: 39-47
- Ma C, Lu Y, Bai S, Zhang W, Duan X, Meng D, Wang Z, Wang A, Zhou Z, Li T (2013) Cloning and characterization of miRNAs and their targets, including a novel miRNA-targeted NBS-LRR protein class gene in apple (Golden Delicious). *Molecular plant* 7: 218-230
- Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV, Machado MA, Toth I, Salmond G, Foster GD (2012) Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 13: 614-629
- Mansfield JH, Harfe BD, Nissen R, Obenauer J, Srineel J, Chaudhuri A, Farzan-Kashani R, Zuker M, Pasquinelli AE, Ruvkun G, Sharp PA, Tabin CJ, McManus MT (2004) MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 36: 1079-1083
- Markham NR, Zuker M (2008) UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. *Methods Mol Biol* 453: 3-31
- Martinez-Bilbao A, Ortiz-Barredo A, Montesinos E, Murillo J (2009) Evaluation of a Cider Apple Germplasm Collection of Local Cultivars from Spain for Resistance to Fire Blight (*Erwinia amylovora*) Using a Combination of Inoculation Assays on Leaves and Shoots. *Hortscience* 44: 1223-1227
- Masser DR, Stanford DR, Freeman WM (2015) Targeted DNA methylation analysis by next-generation sequencing. *J Vis Exp*
- McCormick KP, Willmann MR, Meyers BC (2011) Experimental design, preprocessing, normalization and differential expression analysis of small RNA sequencing experiments. *Silence* 2: 2
- McGhee GC, Guasco J, Bellomo LM, Blumer-Schuetz SE, Shane WW, Irish-Brown A, Sundin GW (2011) Genetic analysis of streptomycin-resistant (Sm(R)) strains of *Erwinia amylovora* suggests that dissemination of two genotypes is responsible for the current distribution of Sm(R) *E. amylovora* in Michigan. *Phytopathology* 101: 182-191

- McManus PS, Stockwell VO, Sundin GW, Jones AL (2002) Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol* 40: 443-465
- Meister G (2013) Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet* 14: 447-459
- Meng X, Bonasera JM, Kim JF, Nissinen RM, Beer SV (2006) Apple proteins that interact with DspA/E, a pathogenicity effector of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 53-61
- Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao X, Carrington JC, Chen X, Green PJ, Griffiths-Jones S, Jacobsen SE, Mallory AC, Martienssen RA, Poethig RS, Qi Y, Vaucheret H, Voinnet O, Watanabe Y, Weigel D, Zhu JK (2008) Criteria for annotation of plant MicroRNAs. *Plant Cell* 20: 3186-3190
- Mulekar JJ, Bu Q, Chen F, Huq E (2012) Casein kinase II alpha subunits affect multiple developmental and stress-responsive pathways in *Arabidopsis*. *Plant J* 69: 343-354
- Naeini MM, Ardekani AM (2009) Noncoding RNAs and Cancer. *Avicenna J Med Biotechnol* 1: 55-70
- Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Polesskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, Cuvellier S, Harel-Bellan A (2006) The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol* 8: 278-284
- Nakamura K, Oshima T, Morimoto T, Ikeda S, Yoshikawa H, Shiwa Y, Ishikawa S, Linak MC, Hirai A, Takahashi H, Altaf-Ul-Amin M, Ogasawara N, Kanaya S (2011) Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. *Nucleic Acids Res* 39: e90
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436-439
- Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O (2008) Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 321: 964-967
- Nelson DE, Repetti PP, Adams TR, Creelman RA, Wu J, Warner DC, Anstrom DC, Bensen RJ, Castiglioni PP, Donnarummo MG, Hinchey BS, Kumimoto RW, Maszle DR, Canales RD, Krolkowski KA, Dotson SB, Gutterson N, Ratcliffe OJ, Heard JE (2007) Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16450-16455
- Norelli JL, Farrell Jr RE, Bassett CL, Baldo AM, Lalli DA, Aldwinckle HS, Wisniewski ME (2009) Rapid transcriptional response of apple to fire blight disease revealed by cDNA suppression subtractive hybridization analysis. *Tree Genetics & Genomes* 5: 27-40
- Norelli JL, Jones AL, Aldwinckle HS (2003) Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant disease* 87: 756-765

- Nose M, Shiraishi S (2011) Comparison of the gene expression profiles of resistant and non-resistant Japanese black pine inoculated with pine wood nematode using a modified LongSAGE technique. *For. Path.* 41: 143–155
- O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D (2007) MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 1604-1609
- Oh CS, Kim JF, Beer SV (2005) The Hrp pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and identification of three novel genes required for systemic infection double dagger. *Mol Plant Pathol* 6: 125-138
- Olsen PH, Ambros V (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 216: 671-680
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263
- Pall GS, Hamilton AJ (2008) Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc* 3: 1077-1084
- Pant BD, Musialak-Lange M, Nuc P, May P, Buhtz A, Kehr J, Walther D, Scheible WR (2009) Identification of nutrient-responsive Arabidopsis and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol* 150: 1541-1555
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3691-3696
- Perez-Quintero AL, Neme R, Zapata A, Lopez C (2010) Plant microRNAs and their role in defense against viruses: a bioinformatics approach. *BMC Plant Biol* 10: 138
- Pieterse CMJ, Van Pelt JA, Ton J, Parchmann S, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Van Loon LC (2000) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 123-134
- Pratt AJ, MacRae IJ (2009) The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem* 284: 17897-17901
- Quail MA, Kozarewa I, Smith F, Scally A, Stephens PJ, Durbin R, Swerdlow H, Turner DJ (2008) A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system. *Nat Methods* 5: 1005-1010
- Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engele P, Lim LP, Johnson JM (2005) Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA* 11: 1737-1744
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-906

- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16: 1616-1626
- Ren G, Xie M, Dou Y, Zhang S, Zhang C, Yu B (2012) Regulation of miRNA abundance by RNA binding protein TOUGH in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 12817-12821
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110: 513-520
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14: 1902-1910
- Ruz L, Moragrega C, Montesinos E (2008) Evaluation of four whole-plant inoculation methods to analyze the pathogenicity of *Erwinia amylovora* under quarantine conditions. *Int Microbiol* 11(2): 111-119
- Sarowar S, Zhao Y, Soria-Guerra RE, Ali S, Zheng D, Wang D, Korban SS (2011) Expression profiles of differentially regulated genes during the early stages of apple flower infection with *Erwinia amylovora*. *J Exp Bot* 62: 4851-4861
- Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ, Fox EJ, Hiatt JB, Loeb LA (2012) Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 14508-14513
- Shabala S, Pottosin I (2014) Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiol Plant* 151: 257-279
- Sharbati-Tehrani S, Kutz-Lohroff B, Bergbauer R, Scholven J, Einspanier R (2008) miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample. *BMC Mol Biol* 9: 34
- Shi R, Chiang VL (2005) Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques* 39: 519-525
- Sillerova J, Korba J, Paprstein F, Sedlak J (2011) Testing of Resistance of Pear Cultivars after Artificial Inoculation with *Erwinia amylovora* in Field Conditions. Xii International Workshop on Fire Blight 896: 353-355
- Simon SA, Meyers BC, Sherrier DJ (2009) MicroRNAs in the rhizobia legume symbiosis. *Plant Physiol* 151: 1002-1008
- Stocks MB, Moxon S, Mapleson D, Woolfenden HC, Mohorianu I, Folkes L, Schwach F, Dalmay T, Moulton V (2012) The UEA sRNA workbench: a suite of tools for analysing and visualizing next generation sequencing microRNA and small RNA datasets. *Bioinformatics* 28: 2059-2061
- Sunkar R (2010) MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. *Semin Cell Dev Biol* 21: 805-811
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006) Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18: 2051-2065

- Sunkar R, Zhu JK (2004) Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2001-2019
- Szczesniak MW, Makalowska I (2014) miRNEST 2.0: a database of plant and animal microRNAs. *Nucleic Acids Res* 42: D74-77
- Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A, Vazquez F (2013) The crosstalk between plant microRNA biogenesis factors and the spliceosome. *Plant Signal Behav* 8: e26955
- Terpiński Z (1984) *Szkółkarstwo ozdobne*. Warszawa: PWRiL
- Tili E, Michaille JJ, Calin GA (2008) Expression and function of micro-RNAs in immune cells during normal or disease state. *Int J Med Sci* 5: 73-79
- Tremblay A, Hosseinib P, Alkharouf NW, Lic S, Matthews BF (2010) Transcriptome analysis of a compatible response by *Glycine max* to *Phakopsora pachyrhizi* infection. *Plant Science* 179: 183–193
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* 35: W71-74
- Unver T, Bakar M, Shearman RC, Budak H (2010) Genome-wide profiling and analysis of *Festuca arundinacea* miRNAs and transcriptomes in response to foliar glyphosate application. *Mol Genet Genomics* 283: 397-413
- Unver T, Namuth-Covert DM, Budak H (2009) Review of current methodological approaches for characterizing microRNAs in plants. *Int J Plant Genomics* 2009: 262463
- Valente MA, Faria JA, Soares-Ramos JR, Reis PA, Pinheiro GL, Piovesan ND, Morais AT, Menezes CC, Cano MA, Fietto LG, Loureiro ME, Aragao FJ, Fontes EP (2009) The ER luminal binding protein (BiP) mediates an increase in drought tolerance in soybean and delays drought-induced leaf senescence in soybean and tobacco. *J Exp Bot* 60: 533-546
- Vanneste JL (2000) What is fire blight? What is *Erwinia amylovora*? How to control it? . In: JL V (ed) *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. . CABI, New York, pp 1-6
- Varallyay E, Burgyan J, Havelda Z (2008) MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc* 3: 190-196
- Varkonyi-Gasic E, Gould N, Sandanayaka M, Sutherland P, MacDiarmid RM (2010) Characterisation of microRNAs from apple (*Malus domestica* 'Royal Gala') vascular tissue and phloem sap. *BMC Plant Biol* 10: 159
- Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* 3: 12
- Vazquez F, Blevins T, Ailhas J, Boller T, Meins F, Jr. (2008) Evolution of Arabidopsis MIR genes generates novel microRNA classes. *Nucleic Acids Res* 36: 6429-6438

Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar SK, Troglio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald LM, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell JT, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niazi F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu VT, King ST, Vick J, Tao Q, Mraz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater MM, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan AC, Bus V, Chagne D, Crowhurst RN, Gleave AP, Lavezzo E, Fawcett JA, Proost S, Rouze P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens RP, Durel CE, Gutin A, Bumgarner RE, Gardiner SE, Skolnick M, Egholm M, Van de Peer Y, Salamini F, Viola R (2010) The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nat Genet* 42: 833-839

Visser M, van der Walt AP, Maree HJ, Rees DJ, Burger JT (2014) Extending the sRNAome of apple by next-generation sequencing. *PLoS One* 9: e95782

Vogt I, Wohner T, Richter K, Flachowsky H, Sundin GW, Wensing A, Savory EA, Geider K, Day B, Hanke MV, Peil A (2013) Gene-for-gene relationship in the host-pathogen system *Malus x robusta* 5-*Erwinia amylovora*. *New Phytol* 197: 1262-1275

Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669-687

Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY (2010) MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* 1803: 1231-1243

Wei W, Qi X, Wang L, Zhang Y, Hua W, Li D, Lv H, Zhang X (2011) Characterization of the sesame (*Sesamum indicum* L.) global transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers. *BMC Genomics* 12: 451

Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Helmsberg W, Kenton DL, Khovayko O, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Ostell J, Pontius JU, Pruitt KD, Schuler GD, Schriml LM, Sequeira E, Sherry ST, Sirotkin K, Starchenko G, Suzek TO, Tatusov R, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E (2005) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 33: D39-45

Wienholds E, Koudijs MJ, van Eeden FJ, Cuppen E, Plasterk RH (2003) The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development. *Nat Genet* 35: 217-218

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11: 228-234

Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, Qi Y (2010) DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol Cell* 38: 465-475

Xia R, Zhu H, An YQ, Beers EP, Liu Z (2012) Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks. *Genome Biol* 13: R47

Yamasaki H, Hayashi M, Fukazawa M, Kobayashi Y, Shikanai T (2009) SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like7 Is a Central Regulator for Copper Homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 347-361



- Yang L, Liu Z, Lu F, Dong A, Huang H (2006) SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *Plant J* 47: 841-850
- Yang X, Li L (2011) miRDeep-P: a computational tool for analyzing the microRNA transcriptome in plants. *Bioinformatics* 27: 2614-2615
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304: 594-596
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17: 3011-3016
- Yu H, Song C, Jia Q, Wang C, Li F, Nicholas KK, Zhang X, Fang J (2011) Computational identification of microRNAs in apple expressed sequence tags and validation of their precise sequences by miR-RACE. *Physiol Plant* 141: 56-70
- Zagorchev L, Kamenova P, Odjakova M (2014) The role of plant cell wall proteins in response to salt stress. *ScientificWorldJournal* 2014: 764089
- Zhang J, Xu Y, Huan Q, Chong K (2009) Deep sequencing of Brachypodium small RNAs at the global genome level identifies microRNAs involved in cold stress response. *BMC Genomics* 10: 449
- Zhang W, Gao S, Zhou X, Chellappan P, Chen Z, Zhou X, Zhang X, Fromuth N, Coutino G, Coffey M, Jin H (2011) Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Mol Biol* 75: 93-105
- Zhao B, Ge L, Liang R, Li W, Ruan K, Lin H, Jin Y (2009) Members of miR-169 family are induced by high salinity and transiently inhibit the NF-YA transcription factor. *BMC Mol Biol* 10: 29
- Zhao B, Liang R, Ge L, Li W, Xiao H, Lin H, Ruan K, Jin Y (2007) Identification of drought-induced microRNAs in rice. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 585-590
- Zhao Y, Blumer SE, Sundin GW (2005) Identification of *Erwinia amylovora* genes induced during infection of immature pear tissue. *J Bacteriol* 187: 8088-8103
- Zhu C, Ding Y, Liu H (2011) MiR398 and plant stress responses. *Physiol Plant* 143: 1-9