

Zadanie 73 Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z tolerancją wegetatywnych podkładek jabłoni na niskie temperatury poprzez analizę transkryptomu i ocenę stopnia polimorfizmu genów kandydujących.

W roku 2014 badania prowadzono w ramach 2 tematów badawczych:

Temat badawczy 1

Przygotowanie materiału roślinnego i ocena fenotypowa wybranych podkładek jabłoni

Celem badań było wytypowanie podkładek jabłoni o zróżnicowanej reakcji na stres temperaturowy i ocena stopnia ich tolerancji na niskie ujemne temperatury. Zgromadzono i namnożono 17 genotypów podkładek. Działaniu niskich temperatur poddano rośliny dwóch genotypów P66 i M.9. Rośliny mrożono w komorze do sztucznego przemrażania (BINDER GmbH). Zastosowano 3 temperatury mrożenia (-10°C, -12°C i -14°C; termin mrożenia: 3-5.02.2014; czas mrożenia 3 h, tempo obniżania się temp. 2°C/ h; 10 podkładek w każdej temperaturze). Kontrolę stanowiły podkładki nie poddawane działaniu niskich temperatur. Po zabiegu wszystkie podkładki przeniesiono do chłodni szkółkarskiej, w marcu wysadzono w pole i przycięto 5 cm nad powierzchnią gleby. Uprawę siewek oraz ochronę siewek przed chorobami i szkodnikami prowadzono według zaleceń dla sadów produkcyjnych. Dla każdej z roślin wykonano następujące pomiary: średnica pędu przewodnikowego podkładki (w mm, 30 cm od ziemi, dwukrotnie); stopień regeneracji podkładek (pięciokrotnie; skala bonitacyjna 1-5); wysokość pędu przewodnikowego podkładki (w cm, jednorazowo w okresie jesiennym); długość przyrostów jednorocznych (w cm, jednorazowo); świeża masa korzeni podkładek (w g, jednorazowo). Żadna z zastosowanych w badaniach ujemnych temperatur nie spowodowała śmierci całej puli podkładek, niemniej kondycja roślin przemrażanych była słabsza niż roślin kontrolnych. Największy wigor posiadały te podkładki, które poddano przemrażaniu w najwyższej z temperatur mrożenia, najniższy w najniższej temperaturze. Dla podkładki P66 odnotowano większy przyrost i średnicę pędu przewodnikowego, większą długość pędów bocznych, a także większą świeżą masę korzeni niż dla podkładki M.9.

Temat badawczy 2

Poszukiwanie genów kandydujących

Celem tematu była ocena polimorfizmu genów kandydujących, potencjalnie sprzężonych z cechą mrozoodporności oraz dobór genu referencyjnego do dalszych badań transkryptomu. Ocenę polimorfizmu przeprowadzono dla 20 genów kandydujących, wytypowanych na podstawie danych literaturowych z bazy NCBI (geny kodujące białka z grupy dehydrin, gen *COR47*, geny z grupy C-repeat, z grupy *DREB* oraz z grupy *MADSbox*). Na matrycach DNA, wydzielonego z 17 podkładek jabłoni pochodzących z kolekcji, zamplifikowano monomorficzne produkty o długości od 250 do 1100 pz (zależnie od użytych starterów). Do analizy polimorfizmu uzyskanych amplikonów użyto techniki CAPS z czterema enzymami restrykcyjnymi *HaeIII*, *SmaI*, *HindIII*, *EcoRV*. Uzyskane dane posłużyły do sporządzenia matrycy binarnej dla potrzeb wieloczynnikowej analizy statystycznej MCA (Multiple Correspondence Analysis). Na podstawie powyższej analizy badane podkładki zostały pogrupowane w dwa klastery, reprezentowane odrębnie przez podkładki P 66 i M.9. Na podstawie danych literaturowych, danych z bazy NCBI, AppleDatabase oraz w oparciu o sekwencje z dostępnej mapy fizycznej genomu jabłoni wytypowano również pięć sekwencji kandydujących do funkcji genu referencyjnego w planowanych układach doświadczalnych, mających na celu ocenę zmian ekspresji wybranych genów pod wpływem zadziałania stresu niskich, ujemnych temperatur. Były to: sekwencje kodujące beta-aktynę, sekwencja 18sRNA kodująca podjednostkę rybosomalną, gen *PAL* kodujący liazę L-fenylalaniny, gen dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*) oraz gen *ELalfa1* czynnika elongacyjnego alfa1. Po wyizolowaniu całkowitego RNA z ksylemu roślin P 66 i M.9 poddanych przemrożeniu w temperaturach -10°C, -12°C, -14°C oraz z ksylemu roślin kontrolnych i ocenie stopnia integracji uzyskanego materiału genetycznego, wydzielone matryce przepisano do stabilnych nici cDNA (starter oligo-dT, AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit, Agilent). Relatywny poziom ekspresji genów kandydujących określano w

oparciu o wyniki testów q RT-PCR w czasie rzeczywistym (Corbett, Rotor-Gen 6000, Software 1.7 i GenEX v.5.4), ich przydatność do pełnienia funkcji genu referencyjnego na podstawie wartości odchylenia standardowego dla ekspresji w trzech układach czynnikowych, obejmujących temperaturę mrożenia, genotyp podkładki oraz temperaturę mrożenia i genotyp podkładki łącznie. Na podstawie przeprowadzonych analiz do dalszych badań transkryptomu podkładek jabłoni traktowanych niskimi, ujemnymi temperaturami wytypowano gen referencyjny PAL, charakteryzujący się największą stabilnością poziomu transkryptu w badanych układach eksperymentalnych. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych prac badawczych nad mechanizmem tolerancji podkładek na stres niskich temperatur, przewidzianych w harmonogramie projektu na lata 2015-2020.