

### **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 2015 badania prowadzono w ramach 3 tematów badawczych

#### **Temat badawczy 1.**

##### Przygotowanie materiału roślinnego i ocena fenotypowa wybranych podkładek jabłoni.

Celem tematu badawczego było zgromadzenie kolekcji podkładek jabłoni ekstremalnie reagujących na stres niskich temperatur oraz ocena stopnia tolerancji wybranych roślin z kolekcji na niskie, ujemne temperatury.

Badania prowadzono na podkładkach jabłoni: P 66 i M.9 (seria P – hodowla polska, M – Wielka Brytania, po 40 podkładek na genotyp), pochodzące z matecznika Ośrodka Elitarnego Materiału Szkółkarskiego IO w Prusach. Mrożenie odbywało się w komorze do sztucznego przemrażania materiałów roślinnych (BINDER GmbH). Zastosowano 3 temperatury: -10°C, -12°C i -14°C (terminy 2-4.02.2015, czas mrożenia 3 h, tempo obniżania się temp. 2°C/ h; 10 podkładek w każdej temp.). Kontrolę stanowiły podkładki nie poddawane działaniu niskich temperatur. Po zabiegu podkładki przeniesiono do chłodni szkółkarskiej, a po posadzeniu w polu przycięto 5 cm nad powierzchnią gleby. W trakcie uprawy roślin stosowano nawozy mineralne (Hydrocomplex, Azofoska) oraz środki chwastobójcze (Basta 150 SL, Azotop New 80 WP). Nawadnianie podkładek prowadzono systemem kropłowym, sterowanym automatycznie. Ochronę siewek przed chorobami i szkodnikami prowadzono według zaleceń dla sadów produkcyjnych.

Ocenę fenotypową przeprowadzono dla podkładek P 66 i M.9, poddanych stresowi niskich ujemnych temperatur. Dla każdego układu genotyp/podkładka/roślina wykonano pomiary: średnicy pędu przewodnikowego podkładki (w mm, 5 cm od ziemi, po posadzeniu roślin (kwiecień) i zakończeniu wegetacji roślin (październik)); stopnia regeneracji podkładek (maj, czerwiec, lipiec, sierpień, wrzesień; skala bonitacyjna 1-5); wysokości pędu przewodnikowego podkładki (w cm, październik); długości przyrostów jednorocznych (w cm, październik); świeżej masy korzeni podkładek (w g, październik). Żadna z zastosowanych w badaniach ujemnych temperatur nie spowodowała śmierci całej puli podkładek reprezentujących obydwa genotypy, niemniej kondycja roślin traktowanych stresem niskich temperatur pod koniec okresu wegetacji była znacznie słabsza niż roślin kontrolnych. Największy wigor spośród roślin poddanych stresowi posiadały podkładki przemrażane w temperaturze -10°C, najslabszy - przemrażane w temperaturze -14°C. Podkładka P 66 wykazywała słabszą reakcję na przemrażanie niż M.9. Dla podkładki tej 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.**

##### Ocena poziomu ekspresji 20 wytypowanych genów kandydujących.

Celem tematu była ocena zmian w poziomie ekspresji 20 genów kandydujących, sprzężonych z cechą mrozoodporności u dwóch podkładek jabłoni ekstremalnie reagujących na stres przemrażania.

Materiał roślinny do badań stanowiły podkładki jabłoni o odmiennej reakcji na stres przemrażania; P 66 (tolerancyjna) i M.9 (wrażliwa). Próbkę (ksylem) izolowano z roślin traktowanych trzema temperaturami mrożenia (temat badawczy 1) oraz z roślin kontrolnych, niepoddawanych w/w stresowi. Całkowite RNA wyizolowano zgodnie z metodą opisaną przez Zeng i Yang. Następnie RNA (1µg) poddano transkrypcji do stabilnego cDNA przy użyciu zestawu AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). Do amplifikacji fragmentów dscDNA użyto oligonukleotydów zaprojektowanych w badaniach własnych do sekwencji genów (EST) opublikowanych w literaturze oraz bazach danych – NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) i ApplebreedDB ([www.hidras.unimi.it](http://www.hidras.unimi.it)) i wytypowanych w roku 2014. Ocenę poziomu ekspresji w każdej z badanych prób przeprowadzono poprzez analizę krzywych amplifikacji (metoda porównania krzywych standartowych, program komputerowy Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7.), wyznaczonych w oparciu o pomiar fluorescencji barwnika SybrGreen w każdym cyklu reakcji.

Badania przeprowadzono łącznie dla 20 genów kandydujących: czterech genów CBF (*C-repeat binding factor*; MdCBF1 – MdCBF4), genu COR47 (*coldregulatedgene*), ERF (*ethylene response factor*), dziewięciu genów z grupy WXL (*Winter-induced genes in xylem*), kodujących białka dehydryn (Deh-1-9), trzech genów z grupy DREB – *dehydration responsive elements binding protein* (Md0000165880, Md0000198054; LH1) oraz dwóch genów z grupy MADS box (MADS13 i MADS14). W przypadku 16 z 20 badanych genów, zaobserwowano zróżnicowane profile ekspresji/ zróżnicowaną liczbę kopi transkryptów EST. Dziewięć z wytypowanych genów ulegało indukcji w genomie tolerancyjnej podkładki P 66, a siedem w genomie podkładki M.9.

### **Temat badawczy 3.**

#### Badania transkryptomu podkładek jabłoni poprzez sekwencjonowanie w systemie NGS.

Celem tematu badawczego była analiza transkryptomu jabłoni poprzez sekwencjonowanie biblioteki znaczników ekspresyjnych oraz weryfikacja i wytypowanie specyficznych fragmentów EST (sprzężonych z cechą mrozoodporności), pozyskanych w wyniku sekwencjonowania RNA dwóch podkładek jabłoni o odmiennej reakcji na stres niskich temperatur.

Badania prowadzono na roślinach dwóch podkładek: P 66 (tolerancyjna) i M.9 (wrażliwa). Rośliny (po 10 z każdej kombinacji: temperatura przemrażania / genotyp, łącznie 100 roślin) traktowano trzema temperaturami: -10°C, -12°C i -14°C. Rośliny aklimatyzowane (0°C / 30 dni) nieprzemrażane oraz rośliny nieaklimatyzowane i nieprzemrażane stanowiły kontrolę. Całkowite RNA izolowano z tkanki ksylemu, zgodnie z metodą Zeng i Yang. Pojedyncze próby RNA o zmierzonej koncentracji łączono, a do dalszych etapów badań (firma komercyjna: Genomed S.A.) wprowadzono 10 próbek, z których każda stanowiła RNA z puli 10 roślin. Sekwencjonowanie i analizę transkryptów przygotowanych próbek RNA przeprowadzono w systemie Genome Analyzer, Illumina Life Technologies SOLiD System (RNA-seq). Analiza bioinformatyczna pozwoliła na porównanie profili ekspresji genów pomiędzy parami próbek (układ genotyp podkładki/ kontrola vs temperatura mrożenia) i wytypowanie genów o statystycznie istotnej różnicy w poziomie ekspresji. Łącznie odczytano 104 448 635 sekwencji (tj. 500 tyś. zróżnicowanych transkryptów).

Dla każdej pary próbek obliczono współczynnik korelacji Pearsona i stwierdzono, że wszystkie z badanych układów próbek reprezentowały stosunkowo wysoki stopień korelacji (> 0.9). Próbki M.9 wykazywały większy stopień zróżnicowania między sobą niż próbki P 66, dla których ekspresja uzyskanych transkryptów była stabilniejsza. Z pośród adnotowanych sekwencji (~500 tys.) wybrano 15, które stanowiąc będą bazę dla dalszych analiz. Wytypowane sekwencje kodują białka funkcjonalne, czynniki transkrypcyjne oraz białka strukturalne i integralne błony komórkowej.

Wyniki zostały zaprezentowane podczas IV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Wrocław, 14 – 16 Września 2015 (2 postery wraz ze streszczeniem prezentowanych osiągnięć przedstawiono w załącznikach 1 i 2)

1. **Mariusz Lewandowski, Edward Żurawicz.** Polowa ocena wytrzymałości na niskie temperatury wegetatywnych podkładek dla jabłoni przemrażanych w warunkach kontrolowanych. (Opis na stronach 7 i 8 szczegółowego opisu tematu badawczego nr 1b. za rok 2014). Wyniki przedstawione w Materiałach Konferencyjnych, Streszczenia prac str. 32
2. **Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Mariusz Lewandowski, Małgorzata Korbin.** Zmiany w transkryptomie wybranych podkładek jabłoni po zadziałaniu stresu niskiej temperatury. (Opis na stronie 20, szczegółowego opisu tematu badawczego nr 2b za rok 2014 oraz na stronach 11-13 szczegółowego opisu tematu badawczego nr 2 za rok 2015). Wyniki przedstawione w Materiałach Konferencyjnych, Streszczenia prac: str. 204



## POŁOWA OCENA WYTRZYMAŁOŚCI NA NISKIE TEMPERATURY WEGETATYWNYCH PODKŁADEK DLA JABŁONI PRZEMRAŻANYCH W WARUNKACH KONTROLOWANYCH



Mariusz Lewandowski, Edward Żurawicz

Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,  
Instytut Ogrodnictwa, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,  
e-mail: [Mariusz.Lewandowski@inhort.pl](mailto:Mariusz.Lewandowski@inhort.pl)

### WSTĘP

W krajach położonych w strefie klimatycznej, w której występują ostre zimy w sadach jabłoniowych, w tym także w Polsce, często dochodzi do uszkodzenia przez mroz systemy korzeniowego drzew. Lekkie uszkodzenie mrozowe systemu korzeniowego powoduje słabszy wzrost i owocowanie, ale silne przemarznięcie korzeni powoduje zamieranie drzew (Moran i in. 2011). Dlatego w krajach, w których występuje problem uszkodzeń mrozowych systemu korzeniowego drzew jabłoni prowadzi się zarówno prace nad wyhodowaniem nowych podkładek, wytrzymałych na niskie ujemne temperatury (Khanizadeh i in. 2000, Khanizadeh i in. 2011, Zhang i in. 2011, Żurawicz i in. 2011), jak i ocenia poziom wytrzymałości na mroz już istniejących podkładek (Aaltonen, 1995, Czynczyk, 1979, Embree, 1988, Czynczyk i Piskor, 1999, Czynczyk i Jakubowski, 2007, Mirabdolbaghi i in. 2010, Moran i in. 2011, Żurawicz i Lewandowski, 2014).

### MATERIAŁ I METODY

W 2014 roku działania niskich temperatur poddano rośliny dwóch podkładek P 66 (seria P – hodowla polska) i M.9 (Wielka Brytania), po 40 roślin każdego genotypu. Podkłady uzyskano z matecznika Ośrodka Elitarnego Materiału Szkółkarskiego IO w Prusach (późna jesień 2013 roku), posortowano (średnica pędu 8-10 mm, wolne od wirusów), zabezpieczono przed wysuszeniem w szczelnie zamykanych torebkach foliowych, umieszczono w chłodni szkółkarskiej w temperaturze 0°C. Mrożenie przeprowadzono na początku lutego 2014 roku w komorze do sztucznego przemarzania materiałów roślinnych niemieckiej firmy BINDER GmbH. Zastosowano 3 temperatury mrożenia: -10°C (03.02.2014), -12°C (04.02.2014) i -14°C (05.02.2014) (czas mrożenia 3 h, tempo obniżania się temp. 2°C/h; 10 szt. podkładek w każdej temperaturze). Kontrolę stanowiły podkłady nie poddawane działaniu niskich temperatur. Po zabiegu podkłady przeniesiono do chłodni szkółkarskiej. Po posadzeniu w polu (31.03.2014 r.) wszystkie podkłady przycięto 5 cm nad powierzchnią gleby. Dla każdej podkłady wykonano następujące pomiary i obserwacje: 1. średnica pędu przewodnikowego podkłady (w mm) na wysokości 30 cm od ziemi – po posadzeniu roślin (kwiecień) i zakończeniu wegetacji roślin (październik); 2. stopień regeneracji podkładek (maj, czerwiec, lipiec, sierpień, wrzesień) – skala bonitacyjna 1-5; 3. wysokość pędu przewodnikowego podkłady (w cm) (październik); 4. długość przyrostów jednorocznych (w cm) (październik); 5. świeża masa korzeni podkładek (w g) (październik).



Zdjęcia 1-4. Wzrost podkłady P 66 po przemrozeniu w różnych temperaturach

### LITERATURA

- Aaltonen, M. 1995. The effect of the apple rootstocks YP and A2 on yield and winter hardiness of apple in Finland. *Acta Agriculturae Scandinavica - Section B Soil and Plant Science*, 45 (3): 202-205.
- Czynczyk, A. 1979. Effect of M.9, B.9 and M.26 rootstocks on growth, fruiting and frost resistance of apple trees. *Fruit Sci. Rep.* 6: 143-152.
- Czynczyk, A. and Piskor, E. 1999. Performance of two apple cultivars grafted on 10 new Polish-bred rootstocks during 6-year-experiment. *Fruit Varieties J.*, 53 (4): 231-235.
- Czynczyk, A. and Jakubowski, T. 2007. Value of standard and new selected rootstocks for apples in Poland. *Acta Horticulturae*, 732: 51-57.
- Embree, C. 1988. Apple rootstock cold hardiness evaluation. *Co. Fruit Tree*, 21: 99-105.
- Khanizadeh, S., Groleau, Y., Granger, R., Cousineau, J. and Rousselle, G.L. 2000. New hardy rootstocks from the Quebec apple breeding program. *Acta Hort.* 538: 719-721.
- Khanizadeh, S., Groleau, Y., Granger, R., Dubé, C., Rousselle, G., Prive, J.P. and Embree, C. G. 2011. St. Jean 84 (SJB4) dwarf winter hardy apple rootstock series. *Acta Hort.* 903: 187-188.
- Mirabdolbaghi, M., Zarghami, R. and Azghandi, A.V. 2010. Cold hardiness of different apple rootstock clones. *Intern. Journal of Agriculture and Biology*, 12 (1): 153-156.
- Moran, R.E., Sun, Y., Geng, F., Zhang, D. and Fazio, G. 2011. Cold temperature tolerance of trunk and root tissues in one- or two-year-old apple rootstocks. *HortScience*, 46 (11): 1460-1464.
- Zhang, M.J., Ding, L. H., Wang, Q., Li, Y. B., Yan, X. K. and Xing, G. J. 2011. Development of cold resistant apple rootstocks in China. *Acta hort.* 903: 183-188.
- Żurawicz, E., Bielicki, P., Czynczyk, A., Bartosiewicz, B., Buczek, M. and Lewandowski, M. 2011. Breeding of apple rootstocks in Poland - The latest results *Acta Hort.* 903: 143-150.
- Żurawicz E., Lewandowski M. 2014. Controlled Freezing as a Low-Temperature Tolerance Test for Apple Rootstocks. *Acta Horticulture* 1058: 451-456.

### WYNIKI

Wszystkie zastosowane w badaniach ujemne temperatury nie spowodowały śmierci całej puli podkładek reprezentujących obydwie genotypy, niemniej kondycja roślin traktowanych stresem niskich temperatur pod koniec okresu wegetacji była znacznie słabsza niż roślin kontrolnych. Największy wigor spośród roślin poddanych stresowi niskich temperatur posiadały te podkłady, które poddano przemrozeniu w temperaturze -10°C. Rosły one tylko nieznacznie słabiej niż rośliny kontrolne. Najslabszym wigorem charakteryzowały się podkłady poddane przemrozeniu w temperaturze -14°C. Podkładka P 66 wykazywała większą tolerancję na przemrozenie niż M.9. Dla podkłady tej odnotowano większy przyrost i średnicę pędu przewodnikowego, większą długość pędów bocznych, a także większą świeżą masę korzeni niż dla podkłady M.9.

Tabela 1. Średnica pędu przewodnikowego podkłady (mm) na wysokości 30 cm od ziemi po przemrozeniu w różnych temperaturach

Podkładka	Kontrola		Temperatury przemrozenia					
			- 10°C		- 12°C		- 14°C	
	IV	X	IV	X	IV	X	IV	X
P 66	9,2	13,3	9,4	12,4	9,2	10,9	9,2	10,4
M.9	9,2	12,4	9,1	11,1	9,3	10,3	8,9	9,9

Tabela 2. Stopień regeneracji podkładek po przemrozeniu w różnych temperaturach

Podkładka	Kontrola		Temperatury przemrozenia		
			- 10°C	- 12°C	- 14°C
	1	2	3	4	5
P 66	4,6 *	(100%)	4,0 (87%)	3,5 (76%)	3,0 (65%)
M.9	4,3 (100%)		3,6 (84%)	2,9 (67%)	2,2 (51%)

Objaśnienie: \* – skala bonitacyjna 1-5, gdzie

- 1 – brak regeneracji, roślina zamarta,
- 2 – wysokość pędu przewodnikowego do 10 cm,
- 3 – wysokość pędu przewodnikowego od 10 cm do 25 cm,
- 4 – wysokość pędu przewodnikowego od 25 cm do 40 cm,
- 5 – wysokość pędu przewodnikowego powyżej 40 cm.

Tabela 3. Wysokość pędu przewodnikowego podkłady (cm)

Podkładka	Kontrola		Temperatury przemrozenia		
			- 10°C	- 12°C	- 14°C
	1	2	3	4	5
P 66	45,2 (100%)		38,3 (85%)	33,1 (73%)	28,2 (62%)
M.9	43,3 (100%)		33,7 (77%)	27,5 (64%)	20,3 (47%)

Tabela 4. Długość przyrostów jednorocznych (cm)

Podkładka	Kontrola		Temperatury przemrozenia		
			- 10°C	- 12°C	- 14°C
	1	2	3	4	5
P 66	28,6 (100%)		24,4 (85%)	19,7 (69%)	15,5 (54%)
M.9	24,7 (100%)		19,6 (79%)	14,2 (57%)	9,4 (38%)

Tabela 5. Świeża masa korzeni podkładek (g)

Podkładka	Kontrola		Temperatury przemrozenia		
			- 10°C	- 12°C	- 14°C
	1	2	3	4	5
P 66	1036 (100%)		928 (90%)	726 (70%)	512 (49%)
M.9	906 (100%)		711 (78%)	465 (51%)	231 (25%)

Badania finansowane przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach postępu biologicznego w produkcji roślinnej - Zadanie 73 „Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z tolerancją wegetatywnych podkładek jabłoni na niskie temperatury poprzez analizę transkryptomu i ocenę stopnia polimorfizmu genów kandydujących”.

## **POLOWA OCENA WYTRZYMAŁOŚCI NA NISKIE TEMPERATURY WEGETATYWNYCH PODKŁADEK DLA JABŁONI PRZEMRAŻANYCH W WARUNKACH KONTROLOWANYCH**

**Mariusz Lewandowski, Edward Żurawicz**

**Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice**

**Adres do korespondencji: [Mariusz.Lewandowski@inhort.pl](mailto:Mariusz.Lewandowski@inhort.pl)**

W roku 2014 działaniu niskich temperatur poddano rośliny dwóch podkładek P66 (seria P – hodowla polska) i M.9 (Wielka Brytania), po 40 roślin każdego genotypu. Podkładowki wykopano z matecznika Ośrodka Elitarnego Materiału Szkółkarskiego IO w Prusach (późna jesień 2013 roku), posortowano (średnica pędu 8-10 mm, wolne od wirusów), zabezpieczono przed wysuszeniem w szczelnie zamykanych torebkach foliowych, a następnie umieszczono w chłodni szkółkarskiej w temperaturze 0°C. Mrożenie przeprowadzono na początku lutego 2014 roku w komorze do sztucznego przemrażania materiałów roślinnych niemieckiej firmy BINDER GmbH. Zastosowano 3 temperatury mrożenia: -10°C (03.02.2014), -12°C (04.02.2014) i -14°C (05.02.2014) (czas mrożenia 3 h, tempo obniżania się temp. 2°C/ h; 10 szt. podkładowek w każdej temperaturze). Kontrolę stanowiły podkładowki nie poddawane działaniu niskich temperatur. Po zabiegu podkładowki przeniesiono do chłodni szkółkarskiej. Po posadzeniu w polu (31.03.2014 r.) wszystkie podkładowki przycięto 5 cm nad powierzchnią gleby. Dla każdej podkładowki wykonano następujące pomiary i obserwacje: 1. średnica pędu przewodnikowego podkładowki (w mm) na wysokości 30 cm od ziemi – po posadzeniu roślin (kwiecień) i zakończeniu wegetacji roślin (październik); 2. stopień regeneracji podkładowek (maj, czerwiec, lipiec, sierpień, wrzesień) – skala bonitacyjna 1-5; 3. wysokość pędu przewodnikowego podkładowki (w cm) (październik); 4. długość przyrostów jednorocznych (w cm) (październik); 5. świeża masa korzeni podkładowek (w g) (październik).

Żadna z zastosowanych w badaniach ujemnych temperatur nie spowodowała śmierci całej puli podkładowek reprezentujących obydwa genotypy, niemniej kondycja roślin traktowanych stresem niskich temperatur pod koniec okresu wegetacji była znacznie słabsza niż roślin kontrolnych. Największy wigor spośród roślin poddanych stresowi niskich temperatur posiadały te podkładowki, które poddano przemrażaniu w temperaturze -10°C. Rosły one tylko nieznacznie słabiej niż rośliny kontrolne. Najsłabszym wigorem charakteryzowały się podkładowki poddane przemrażaniu w temperaturze -14°C. Podkładowka P 66 wykazywała większą tolerancję na przemrażanie niż M.9. Dla podkładowki tej odnotowano większy przyrost i średnicę pędu przewodnikowego, większą długość pędów bocznych, a także większą świeżą masę korzeni niż dla podkładowki M.9.

## ZMIANY W TRANSKRYPTOMIE WYBRANYCH PODKLĄDEK JABŁONI PO ZADZIAŁANIU STRESU NISKIEJ TEMPERATURY

Sylvia Keller-Przybyłkiewicz, Mariusz Lewandowski, Małgorzata Korbin

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice, ul Konstytucji 3-Maja 1/3

e-mail: sylvia.keller@inhort.pl



Występujące w Polsce mroźne zimy oraz wiosenne przymrozki są przyczyną ciężkich uszkodzeń zarówno organów nadziemnych, jak i systemu korzeniowego roślin sadowniczych. Spektakularny przykład stanowią uszkodzenia zawiązków kwiatowych w sadach jabłoniowych, które sięgnęły 75% po zimie 2011/2012. Liczne prace dotyczą reakcji fizjologicznych roślin na stres niskich temperatur, natomiast nie jest do końca rozpoznany mechanizm zjawiska tolerancji roślin drzewiastych na ten stres na poziomie molekularnym.

W Instytucie Ogrodnictwa podjęto badania nad zmianami w poziomie transkryptu genów kandydujących (CG), w podkładkach jabłoni różniących się wrażliwością na mroz.

### PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADAŃ

Materiał badawczy: dwie podkładki jabłoni:

M.9 (wrażliwa), P66 (tolerancyjna).

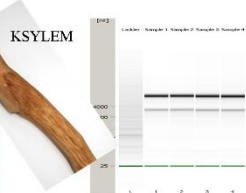


Kolekcja jesień 2015  
(OEMS – Prusy)



Aklimatyzacja  
(zima 2014 / 2015)

traktowanie



- przemrażanie w komorze BINDER GmbH,
- temperatury: -10°C, -12°C, -14°C,
- czas mrożenia 3 h, tempo obniżania się temperatury 2°C/h

- Izolacja RNA (Zeng&Yang 2002)
- odwrotna transkrypcja do cDNA (AffinityScript QPCR cDNASynthesis Kit)

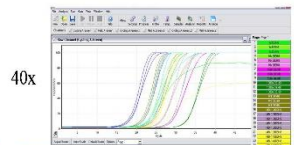
### ANALIZA POZIOMU EKSPRESJI GENÓW KANDYDUJĄCYCH (CG)

- Wybór 18 genów do analizy ekspresji : 4 geny CBF (*C-repeat binding factor*; MdCBF1 – MdCBF4), gen COR47 (*cold regulated gene*), ERF (*ethylene response factor*), 9 genów należących do grupy *WXL* (*Winter-induced genes in xylem*), 3 geny z grupy *DREB* (*dehydration responsive elements binding protein*) - (Md0000165880, Md0000198054, LH1).
- Amplifikacja fragmentów EST (Expressed Sequence Tags) (RotorGen 6000, Life Science).
- Relatywny poziom ekspresji ww. genów— oznaczenie przy użyciu programu RotorGene 6000 Series Software 1.7, (metoda porównania krzywych standartowych).
- Normalizacja wyników względem genu referencyjnego PAL, kodującego amoniako-łącz L-fenyloalaniny (najniższy stopień zmienności w układzie eksperymentalnym (podkładka / temperatura / gen) w porównaniu z genami beta-aktyny, *18sRNA*, *GAPDH*, ELalfa1).

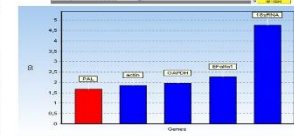
### AMPLIFIKACJA GENÓW (RealTime PCR)



- 95°C – 5min
- 95°C – 20s
- 60°C – 30s
- 72°C – 20s

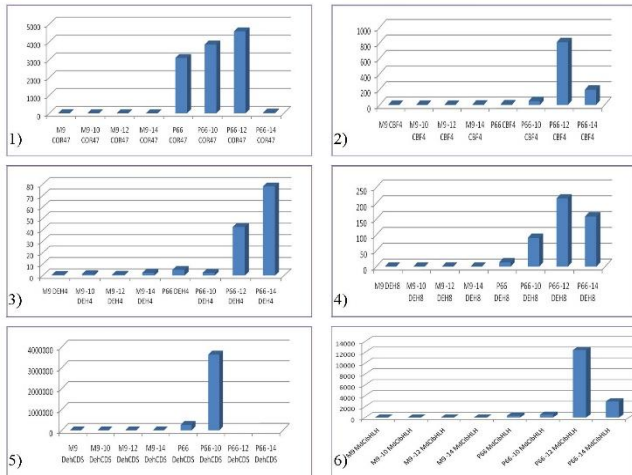


Gene	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct	Delta Ct
MD0000165880	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.3	3.6	3.9	4.2	4.5	4.8	5.1	5.4	5.7	6.0	6.3	6.6
Md0000198054	1.1	1.4	1.7	2.0	2.3	2.6	2.9	3.2	3.5	3.8	4.1	4.4	4.7	5.0	5.3	5.6	5.9	6.2	6.5
LH1	1.3	1.6	1.9	2.2	2.5	2.8	3.1	3.4	3.7	4.0	4.3	4.6	4.9	5.2	5.5	5.8	6.1	6.4	6.7

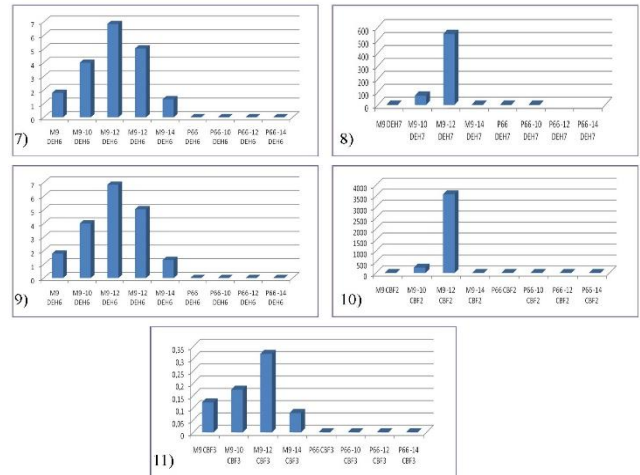


### WYNIKI

#### A. Indukcja ekspresji genów po przemrożeniu podkładki P66 (wykresy 1-6)



#### B. Indukcja ekspresji genów po przemrożeniu podkładki M.9 (wykresy 7-11)



### PODSUMOWANIE

1. Obserwowano różnice w ekspresji analizowanych genów wynikające z przemrożenia tolerancyjnej podkładki P66 a wrażliwej podkładki M.9.

- dla P66: silna indukcja genu COR47/ -10°C (wzmocniona aktywność odnotowana także w roślinach kontrolnych, nieprzemrażanych) oraz indukcja genów CBF-4, Deh 4, 8 i 9, LH1/ -12°C i inhibicja genów ERF i COR47/ -14°C.

- dla M.9: indukcja genów CBF - 2 i 3, Deh 6 i 7/ -12°C oraz inhibicja genów z grupy DREB/ -10°C.

2. Na tym etapie badań obu podkładek nie stwierdzono zmian w ekspresji pozostałych analizowanych genów.

*Wyniki uzyskane w ramach projektu MRiRW - Badania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, Zadanie nr 73 „Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z tolerancją wegetatywnych podkładek jabłoni na niskie temperatury poprzez analizę transkryptomu i ocenę stopnia polimorfizmu genów kandydujących”.*

## ZMIANY W TRANSKRYPTOMIE WYBRANYCH PODKLĄDEK JABŁONI PO ZADZIAŁANIU STRESU NISKIEJ TEMPERATURY

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Mariusz Lewandowski, Małgorzata Korbin

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych

Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice, ul Konstytucji 3-Maja 1/3

e-mail: sylwia.keller@inhort.pl

Występujące w Polsce mroźne zimy oraz wiosenne przymrozki są przyczyną ciężkich uszkodzeń zarówno organów nadziemnych, jak i systemu korzeniowego roślin sadowniczych. Spektakularny przykład stanowią uszkodzenia zawiązków kwiatowych w sadach jabłoniowych, które sięgnęły 75% po zimie 2011/2012. Liczne prace dotyczą reakcji fizjologicznych roślin na stres niskich temperatur, natomiast nie jest do końca rozpoznany mechanizm zjawiska tolerancji roślin drzewiastych na ten stres na poziomie molekularnym.

W Instytucie Ogrodnictwa podjęto badania nad zmianami w poziomie transkryptu genów kandydujących, w podkładkach jabłoni różniących się wrażliwością na mróz, tj. podkładce M.9 (wrażliwa) i podkładce P66 (tolerancyjna). Rośliny przemrażano w komorze BINDER GmbH, w temperaturach -10, -12, -14°C (czas mrożenia 3 h, tempo obniżania się temperatury 2°C/h). Całkowite RNA izolowano z tkanek ksylemu (metoda Zeng i Yang). Stabilne cDNA uzyskano stosując zestaw AffinityScript QPCR cDNASynthesis Kit (Agilent). Badania przeprowadzono dla 18 genów kandydujących: czterech genów CBF (*C-repeat binding factor*, MdCBF1 – MdCBF4), genu COR47 (*cold regulated gene*), ERF (*etylen response factor*), dziewięciu genów z grupy WXL (*Winter-induced genes in xylem*), kodujących białka dehydrin oraz trzech genów z grupy DREB – *dehydration response elements binding protein* (Md0000165880, Md0000198054; LH1). Amplifikację fragmentów EST przeprowadzono metodą Real-Time PCR (RotorGen 6000, Life Science). Relatywny poziom ekspresji obliczono przy użyciu programu Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 i znormalizowano względem genu PAL (metoda porównania krzywych standardowych).

Po przemrożeniu podkładki P66 zaobserwowano silną (300x > niż M.9) indukcję genu COR47 (-10°C), którego wysoką aktywność odnotowano również w roślinach kontrolnych, nieprzemrażanych. Dla podkładki tej odnotowano też indukcję genu CBF-4, genów Deh 4, 8 i 9, genu LH1 (-12°C) oraz inhibicję genów ERF i COR47 (-14°C). Po przemrożeniu podkładki M.9 odnotowano indukcję genów CBF-2 i 3 oraz Deh 6 i 7 (-12°C), natomiast dla genów z grupy DREB obserwowano inhibicję (-10°C). Generalnie, na tym poziomie badań można stwierdzić, że stres niskich temperatur nie powoduje indukcji pozostałych analizowanych genów w roślinach obu badanych podkładek jabłoni.