

### **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 2016 badania prowadzono w ramach 3 tematów.

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

Przygotowanie materiału roślinnego i ocena fenotypowa wybranych podkładek jabłoni.

Celem tematu było przygotowanie 17 genotypów podkładek jabłoni do analiz fenotypowych i badań molekularnych oraz ocena stopnia reakcji tych roślin po ich przemrożeniu.

Badania prowadzono na podkładkach jabłoni: P 2, P 14, P 16, P 22, P 59, P 60, P 66, P 67, P 68, M.7, M.9, M.26, MM.106, CG 11, CG 16, PB-4 i Antonówka (seria P – hodowla polska, M/ MM –Wielka Brytania, CG – USA, PB-4 – Białoruś, Antonówka – Rosja), pochodzących 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 1-3.02.2016, 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 kropowym, sterowanym automatycznie. Ochronę siewek przed chorobami i szkodnikami prowadzono według zaleceń dla sadów produkcyjnych.

Ocenę fenotypową przeprowadzono dla wszystkich w/w podkładek. 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 wszystkie badane 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 podkładki, które poddano przemrażaniu w temperaturze -10°C. Rosty one tylko nieznacznie słabiej niż rośliny kontrolne. Najślabszym wigorem charakteryzowały się podkładki poddane przemrażaniu w temperaturze -14°C. Podkładki P 66, P 67 i P 68 wykazywały słabszą reakcję na przemrażanie niż standardowe podkładki M.9 i M.26. Dla tych podkładek odnotowano większy przyrost i średnicę pędu przewodnikowego, większą długość pędów bocznych, a także większą świeżą masę korzeni niż dla podkładek M.9 i M.26.

#### **Temat badawczy 2.**

Ocena poziomu ekspresji wytypowanych genów kandydujących dla podkładek wzorcowych (Sezon II).

Celem tematu była ocena zmian w poziomie ekspresji 35 genów kandydujących, sprzężonych z cechą mrozoodporności 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 poddanych stresowi niskich temperatur (temat badawczy 1) oraz z roślin kontrolnych. Całkowite RNA wyizolowano zgodnie z metodą opisaną przez Zeng i Yang i poddano transkrypcji do stabilnego cDNA przy użyciu zestawu AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). Do amplifikacji fragmentów dsDNA 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)) - wytypowanych w roku 2014, a także do sekwencji transkryptów genów o zróżnicowanej ekspresji, wyłonionych poprzez sekwencjonowanie *de novo* (NGS) transkryptomu dwóch podkładek wzorcowych. 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 35 genów kandydujących: czterech genów CBF (*C-repeat binding factor*; MdCBF1 – MdCBF4), genu COR47 (*cold regulated gene*), 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), dwóch genów z grupy MADS box (MADS13 i MADS14), sześciu genów kodujących białka czynników transkrypcji (MD0883315, MD0948602, MD254705, MD208730, MD310262, MD127750), siedmiu genów kodujących białka strukturalne błon

komórkowych (MD165364, MD920400, MD7527209, MDP0000392485, MD195260, MD575908, MD228546) oraz dwóch genów kodujących białka integralne błon komórkowych (MD301184, MD695032). Analizy obejmowały:

a. Ocenę ekspresji EST 20 genów wytypowanych w roku 2014.

W przypadku 16 z 20 genów zaobserwowano zróżnicowane profile ekspresyjne. W przeprowadzonym sezonie badawczym (II), w genomie podkładki P 66 (tolerancyjna) siedem genów wykazało inhibicję w temperaturze  $-10^{\circ}\text{C}$ , a indukję w temperaturze  $-12^{\circ}\text{C}$ . Dla podkładki M.9 - 13 badanych genów kandydujących ulegało inhibicji. Natomiast geny CBF2 i CBF4 ulegały indukcji (odpowiednio  $>500\text{x}$  i  $10\text{x}$ ) w obu przemrażanych ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) podkładkach jabłoni. Na tym etapie badań nie obserwowano różnic w poziomie ekspresji genów z grupy MADS (13 i 14) oraz dwóch genów z grupy dehydrin (Deh1 i Deh2)

b. Ocenę ekspresji 15 genów, wytypowanych (sezon I) na podstawie sekwencjonowania transkryptomu (NGS) wzorcowych podkładek jabłoni.

W przypadku 9 z wytypowanych genów zaobserwowano zróżnicowane profile ekspresji w badanych materiale roślinnym. W genomie podkładki M.9 cztery EST: MD883315, MD7527209, MD228546 ( $-12^{\circ}\text{C}$ ) i MD392485 ( $-14^{\circ}\text{C}$ ) wykazały wzrost, a dwa: MD127750 i MD301184 ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) spadek poziomu transkryptu. W genomie podkładki P 66 obserwowano indukję genów: MD254705, MD883315, MD392485, MD165364 ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) i MD920400 ( $-12^{\circ}\text{C}$ ), oraz inhibicję: MD127750, MD7527209, MD301184 ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) i MD165364 ( $-12^{\circ}\text{C}$ ). Trzy EST (MD920400, MD163564 i MD7527209) ulegały nadekspresji, a jeden inhibicji (MD575908) w genomach obu analizowanych podkładek

c. Walidację (poprzez analizę porównawczą) poziomu transkryptów 15 genów wytypowanych na podstawie eksperymentu RNA-seq (sezon I).

Spośród 15 wytypowanych sekwencji transkryptomu podkładek wzorcowych (2015 r.) trzy reprezentowały identyczny typ regulacji jak w badanych układach eksperymentalnych testu RNA-seq. Inhibicję (RNA-seq) genów MD7527209, MD575908 (podkładka P 66) oraz MD254705 (podkładka M.9), odnotowano również po przeprowadzeniu analizy ich ekspresji metodą qPCR.

Po walidacji geny te mogą znaleźć zastosowanie jako markery mrozoodporności.

### **Temat badawczy 3.**

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

Celem tematu badawczego była analiza transkryptomu jabłoni poprzez sekwencjonowanie biblioteki znaczników ekspresyjnych (sezon II) oraz weryfikacja i wytypowanie specyficznych fragmentów EST (sprzężonych z cechą mrozoodporności), pozyskanych w wyniku sekwencjonowania *de novo* 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:  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-12^{\circ}\text{C}$  i  $-14^{\circ}\text{C}$ . Rośliny aklimatyzowane ( $0^{\circ}\text{C}$  / 30 dni) nieprzemrażane oraz rośliny nieaklimatyzowane i nieprzemrażane stanowiły kontrolę. Całkowite RNA izolowano z tkanki ksylemu wg. metody Zeng i Yang. Do dalszych etapów badań wprowadzono 10 próbek, z których każda zawierała RNA z puli 10 jednakowo traktowanych roślin. Sekwencjonowanie i analizę transkryptów przygotowanych próbek RNA przeprowadzono w systemie Genome Analyzer, Illumina Life Technologies SOLiD System (RNA-seq, Genomed S.A.). Analiza bioinformatyczna pozwoliła na porównanie profili ekspresji genów pomiędzy parami próbek (genotyp podkładki/ kontrola vs genotyp podkładki/ temperatura mrożenia) i wytypowanie genów o statystycznie istotnej różnicy w poziomie ekspresji. Łącznie odczytano 166 987 057 sekwencji (tj. 500 tys. zróżnicowanych transkryptów).

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 stanowią będą bazę dla dalszych analiz. Wytypowane sekwencje kodują białka błon komórkowych i wakuoli komórkowych, białka regulujące transport międzykomórkowy i wewnątrzkomórkowy, białka hydrolizujące wiązania chemiczne C-O i C-N oraz białka wiążące makro i mikroelementy (m in. cynk).

Wyniki zostały zaprezentowane podczas XI International Symposium on Integrating Canopy, Rootstock and Environmental Physiology in Orchard Systems, Bolonia, Włochy 28 sierpnia – 2 września 2016.

Poster wraz ze streszczeniem prezentowanych osiągnięć przedstawiono w załącznikach 1 i 2.

**Małgorzata Korbin, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Tomasz Jęcz.** „Putative functional markers related to cold-hardiness of apple rootstocks, revealed by new generation sequencing”.

Prezentacja wyników analiz transkryptomu podkładek jabłoni (uzyskanych z sekwencjonowania *de novo*) - strony 15-24 sprawozdania merytorycznego z realizacji zadania w roku 2015 oraz wyników oceny poziomu ekspresji 15 wytypowanych sekwencji, uzyskanych roku 2016). Mat. konf. str. 105



## PUTATIVE FUNCTIONAL MARKERS RELATED TO COLD-HARDINESS OF APPLE ROOTSTOCKS, REVEALED BY NEW GENERATION SEQUENCING

Malgorzata Korbin, Sylwia Keller-Przybylkowicz, Tomasz Jecz  
 Research Institute of Horticulture, Department of Horticultural Crop Breeding, Skierniewice, Poland

Damages of plants caused by low temperatures during the winters without snow cover and ground frost during the spring are significant problem in cultivation of fruit trees growth in many countries of Northern hemisphere. The consequence of frost injuries is decreasing the yield from 30 to 70 %, dependent on climatic conditions in evaluated season. The morphological and anatomical changes induced by frost as well as physiological mechanism of plant tolerance to stress of low temperatures were widely described. However, genetic fundamentals of this phenomenon in woody plant species are still not fully recognized.

The goal of conducted study was identification and validation of the putative genes activated in apple rootstocks under low temperature stress using techniques based on the New Generation Sequencing (NGS) of the gene transcripts and quantitative evaluation of their expression level by qPCR tests.

### MATERIAL AND METHODS

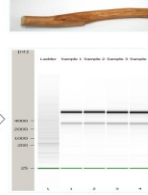
**Apple rootstocks**  
 P 66 - sensitive and M.9 - tolerant to low temperatures



**Temperature treatment:**  
 -10°C, -12°C, -14°C  
 "K" - non-frozen rootstocks (BINDER GmbH - time treatment 3h, temp. decreasing 2°C / h).



**Total RNA isolation**  
 XYLEM,  
 (Yang & Zheng 2000)



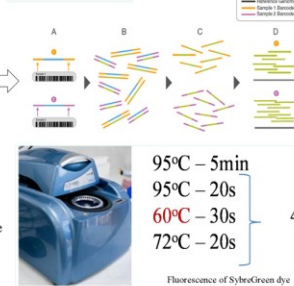
#### Validation of differentially expressed sequence tags (EST up / down regulated)

- Oligonucleotides design for quantitative PCR (Primer3 software).
- Optimization of qPCR and data normalization of the experiment: rootstock / temperature treatment / gene of interest (ref. gene: *PAL* - phenylalanine ammonia-lyase) (RotorGen 6000 software 1.7)
- Standard curve comparison analysis (*PAL* vs. Gene of interest) (RotorGen 6000 soft. 1.7)

### RNA-Seq experiment and software analysis



Genome Analyzer  
 Illumina SOLID System,  
 Reading cDNA libraries



- Sequence readings were mapped using BBmap software.
- The amount of readings for each gene were calculated using the program HTseq.
- Final results have been standardized using DE seq2.
- Degree of variation of each of the pair of tested samples were evaluated by Pearson correlation coefficient (-1 to 1).
- Functional annotations (GO, gene ontology) were assigned to the *Malus domestica* genome.

Table.1.

No.	Comparison of RNA samples (combinations)
1	M9-K vs. M9-10°C
2	M9-K vs. M9-12°C
3	M9-K vs. M9-14°C
4	P66-K vs. P66-10°C
5	P66-K vs. P66-12°C
6	P66-K vs. P66-14°C

### RESULTS OF RNA-seq EXPERIMENT

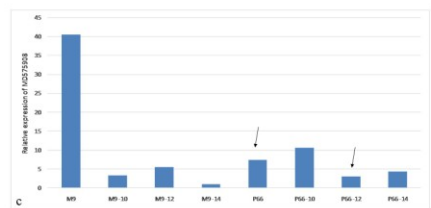
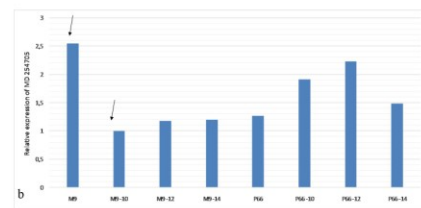
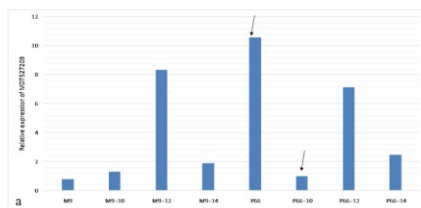
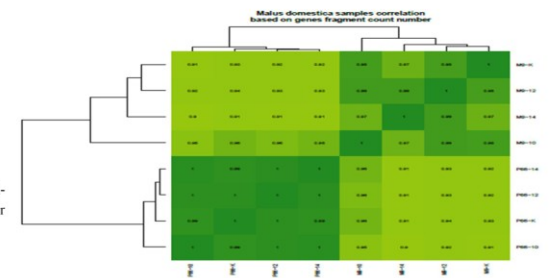
- Totally 104 448 635 sequence reads were obtained in RNA-seq experiment.
- The highest level of variance was observed between samples representing M.9 rootstock (tolerant to low temp.) Fig. 1.
- Fifteen annotated sequences (ESTs up or down regulated in analyzed plants) encoding:
  - transcription factor proteins (MD0883315, MD0948602, MD254705, MD208730, MD310262, MD127750),
  - cell structural proteins (MD165364, MD920400, MD7527209, MDP0000392485, MD195260, MD575908, MD228546)
  - integral membrane cell proteins (MD301184, MD695032)

- were selected for their verification as functional markers

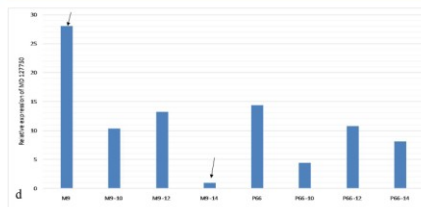
### RESULTS OF ESTs VALIDATION

Totally five of fifteen selected ESTs showed similar type of gene regulation in tested rootstocks, in comparison to RNA-seq experiment combination (examples, a-c, arrows indicates, up or down regulation trends between compared samples (tab.1)), however negligible changes in gene expression profile was observed in case of MD95260 and MD208730 (< 1 fold). Six of chosen ESTs represented different type of regulation, comparing to the RNA-seq (example, d). No significant changes between samples were noted among the remaining analyzed expressed sequence tags.

Fig.1 Correlation map between compared samples (Pearson correlation coefficient)



#### RNA - seq: MD7527209 Down regulation - P 66K vs P 66 -10



#### RNA - seq: MD127750 Up regulation - M.9 K vs M.9 -14

#### RNA - seq: MD254705 Down regulation - M.9K vs. M.9 -10

#### RNA - seq: MD575908 Down regulation - P 66K vs P 66 -12

### qPCR RESULTS, AND SUMMARY

- In case of M.9 rootstock, four ESTs (MD883315, MD392485, MD7527209, MD316202) showed overexpression and three (MD127750, MD254705, MD301184) down-regulation after low temperature treatment. The highest gene expression level was observed for MD127750 and MD254705.
- In case of P 66 rootstock, two ESTs (MD254705 and MD301184) showed over- and four (MD127750, MD883315, MD392485, MD7527209) down-regulation under low temperature stress.
- Four ESTs (MD920400, MD163564, MD195260, MD208730) were up- and one (MD575908) down-regulated in both analyzed rootstocks.
- After validation of the ESTs, selected on the basis of RNA-seq experiment, it was observed that the type of gene expression regulation depends on plant genotype as well as value of low temperature treatment.

### CONCLUSIONS:

Three of ESTs (graphs a-c) selected based on the RNA-seq experiment, and verified by qPCR tests, seems to be potential functional molecular markers regulating mechanism of low temperature-tolerance in tested apple rootstocks. However, the validation of ESTs for their use as putative markers monitoring the plant cold hardiness has to be continued.

The results obtained in the framework of a project No. HOR hn - 801 - 6/15\_73 funded by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development

**PUTATIVE FUNCTIONAL MARKERS RELATED TO COLD-HARDINESS OF APPLE ROOTSTOCKS,  
REVEALED BY NEW GENERATION SEQUENCING**

**Malgorzata Korbin, Sylwia Keller-Przybylkowicz, Tomasz Jecz**

*Research Institute of Horticulture, Department of Horticultural Crop Breeding, Skierniewice,  
Poland*

Damages of plants caused by low temperatures during the winters without snow cover and ground frost during the spring are significant problem in cultivation of fruit trees growth in many countries of Northern hemisphere. The consequence of frost injures is decreasing the yield from 30 to 70 %, dependent on climatic conditions in evaluated season. The morphological and anatomical changes induced by frost as well as physiological mechanism of plant tolerance to stress of low temperatures were widely described. However, genetic fundamentals of this phenomenon in woody plant species are still not fully recognized.

The goal of presented the study was to identify the genes activated in apple rootstocks by low temperature stress. Two apple rootstocks P 66 and M.9 were treated with temperatures -10°C, -12°C and -14°C (BINDER GmbH chamber with controlled atmosphere). Phenotypic assessment of treated plants in the orchard showed that P 66 is much more tolerant to cold treatment then M.9 what was expressed with higher growth vigor, momentum diameter, length of shoots and root mass. Total RNA isolated from xylem tissue of each rootstock according to Zeng and Yang method, described as the most effective for viscous samples, were applied to transcriptomic analysis. Sequencing of RNA transcripts was carried out in the Genome Analyzer, Life Technologies Illumina SOLID System (Genomed S.A, Poland). Totally 104 448 635 sequence reads were obtained in RNA-seq experiment. Fifteen annotated sequences (up or down regulated in analyzed plants) encoding the transcription factor proteins (Ac. No. MDP0000883315, MDP0000948602, MDP0000254705, MDP0000208730, MDP0000310262, MDP0000127750), structural proteins (Ac. No. MDP0000165364, MDP0000920400, MDP00007527209, MDP0000165364, MDP0000392485, MDP0000195260, MDP0000575908, MDP0000228546) and integral membrane cell proteins (Ac. No. MDP0000301184, MDP0000695032) were selected for their verification as functional markers.