

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 2017 badania prowadzono w ramach 3 tematów.

Temat badawczy 1. Przygotowanie materiału roślinnego i ocena fenotypowa wybranych podkładek jabłoni.

Celem tematu było przygotowanie materiału roślinnego (17 genotypów podkładek jabłoni) do analiz fenotypowych i badań molekularnych oraz ocena nasilenia reakcji obronnej roślin po 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), 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 6-8.02.2017, czas mrożenia 3 h, tempo obniżania się temp. 2°C/ h; 10 podkładek w każdej temp.). Kontrolę stanowiły podkładki nie poddawane działaniu niskich temperatur. Dla każdego układu genotyp/podkładka/roślina wykonano w warunkach polowych pomiary średnicy pędu przewodnikowego podkładki 5 cm od ziemi (kwiecień i październik)); stopnia regeneracji podkładek (maj, czerwiec, lipiec, sierpień, wrzesień); wysokości pędu przewodnikowego podkładki (październik); długości przyrostów jednorocznych (październik); świeżej masy korzeni podkładek (październik). Żadna z ujemnych temperatur, zastosowanych w badaniach, nie spowodowała śmierci całej puli roślin badanych genotypów podkładek, niemniej ich kondycja pod koniec okresu wegetacji była znacznie słabsza niż roślin kontrolnych. Rośliny poddane działaniu temperatury -10°C charakteryzowały się największym wigorem. Natomiast słabą siłą wzrostu i stopień regeneracji badanych podkładek zaobserwowano po zastosowaniu temperatury -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. Weryfikacja genów wytypowanych dla podkładek wzorcowych w genomach 17 nowych podkładek.

Celem tematu badawczego była przeprowadzona metodą qPCR ocena zmian w funkcjonowaniu genów kandydujących, wytypowanych na podstawie wyników sekwencjonowania transkryptomu podkładek wzorcowych, zachodzących w podkładkach wzorcowych i innych podkładkach jabłoni z kolekcji Instytutu.

Przeprowadzono trzy etapy analiz:

a). Analiza różnicowania poziomu ekspresji 15 genów, wyłonionych na podstawie odczytu sekwencji RNA-seq (sezon I, 2015), przeprowadzona dla puli 17 skolekcjonowanych podkładek jabłoni.

Materiał roślinny do badań stanowiły matryce RNA wyizolowane z puli 17 podkładek 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) o różnicowanej reakcji na stres przemrażania. Próbkę (ksylem) izolowano z roślin traktowanych niskimi temperaturami (-10°C, -12°C i -14°C) oraz z roślin kontrolnych. Całkowite RNA, wyizolowane metodą opisaną przez Zeng i Yang, przepisano na stabilne cDNA (odwrotna transkrypcja) przy użyciu zestawu AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). Do amplifikacji fragmentów dscDNA użyto 15 par oligonukleotydów zaprojektowanych w badaniach własnych dla 15 genów (EST), wytypowanych w roku 2015 na podstawie odczytów sekwencji o różnicowanej ekspresji w genomach podkładek uznanych za wzorcowe. Ocenę zmian poziomu transkryptu w genomach 17 podkładek

jabłoni przeprowadzono dla następujących fragmentów EST: sześciu genów kodujących białka czynników transkrypcyjnych (MD0883315, MD0948602, MD254705, MD208730, MD310262, MD127750), siedmiu genów kodujących białka strukturalne błon komórkowych (MD165364, MD920400, MD7527209, MD392485, MD195260, MD575908, MD228546) oraz dwóch genów kodujących białka integralne błon komórkowych (MD301184, MD695032).

W przypadku genów Md310262, Md301184, Md254705, Md208730, Md127750, Md165364, Md7527209, Md948602, Md392485, Md575908, Md195260 zaobserwowano wzrost poziomu transkryptu w genomach podkładek odpornych na niskie temperatury (Antonówka, P 60, P 59, P 22, P 2, P 14, P 16). Po potraktowaniu roślin temperaturą -10°C , -12°C i -14°C nadekspresję odnotowano dla genów Md392485, Md948602 i Md165364. W temperaturze -14°C zaobserwowano spadek poziomu transkryptu Md7527209 w podkładkach odpornych na stres niskich temperatur oraz znaczący spadek aktywności (1000x) genu Md165364 w podkładkach P 68 i P 2. Dla genów Md575908, Md254705, Md208730, Md195260 i Md127750 obserwowano wysoki poziom ekspresji po traktowaniu podkładek temperaturą -12°C , a geny Md883315 i Md228546 podlegały silnej inhibicji we wszystkich analizowanych podkładkach.

b). Analiza zmian w poziomie ekspresji 15 genów (RNA-seq sezon II, 2016) przeprowadzona dla dwóch podkładek wzorcowych.

Materiał roślinny do badań stanowiły matryce RNA wyizolowane z dwóch wzorcowych podkładek jabłoni o zróżnicowanym stopniu tolerancji na stres przemrażania – wrażliwej M.9 i odpornej P66. Próbkę (ksylem) izolowano z roślin traktowanych temperaturami -10°C , -12°C i -14°C oraz z roślin kontrolnych. Izolację materiału do badań przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną w punkcie 2a. Do amplifikacji fragmentów dsDNA użyto 15 par oligonukleotydów zaprojektowanych w badaniach własnych do sekwencji 15 genów (EST) wytypowanych w roku 2016 na podstawie odczytów sekwencji o zróżnicowanej ekspresji w genomach podkładek wzorcowych. Do badań wytypowano geny kodujące białka z grupy hydrolaz (Md664464, Md475472, Md288837, Md217803, Md303946), białka sekrecyjne i składniki błon komórkowych oraz wakuoli (Md321783, Md881546, Md203983, Md145463, Md580263), białko transkrypcyjne (Md546831) oraz białka wiążące jony Zn^{2+} , białko receptorowe, białko będące składnikiem chloroplastów i białko o aktywności kinazy (odpowiednio Md196401, Md161758, Md253080, Md707995). Analiza w/w genów, przeprowadzona dla podkładek wzorcowych M.9 oraz P 66 pozwoliła na wyodrębnienie grupy genów, dla których odnotowano wzrost poziomu ekspresji w obu badanych podkładkach, tj. Md475472 i Md161587 (250x dla podkładki M.9/ -10°C i 100x dla podkładki P66/ -14°C), Md253080 (40x dla podkładki M.9/ -10°C i 100x dla podkładki P 66/ -14°C), Md664464 (100x dla obu podkładek/ -10°C) i Md196401(9x dla obu podkładek/ -12°C), a także grupy genów wykazujących wysoki poziom transkryptu w podkładce M.9 (Md288837, Md217803, Md303946). Spadek ekspresji genów Md321783 i Md203983 odnotowano w genomach obu badanych podkładek, a genów Md881546, Md145463 i Md217803 wyłącznie w podkładce P 66. W genomie podkładki P 66 wzrost ekspresji (400x/ -10°C) zaobserwowano jedynie dla genu Md707995. W przypadku genów Md580263 i Md546831 nie zaobserwowano różnic w poziomie transkryptu dla roślin traktowanych i nietraktowanych niską temperaturą.

c). Walidacja poziomu transkryptów 30 genów wytypowanych na podstawie eksperymentu RNA-seq, metodą qPCR (sezon I i II NGS).

W wyniku analizy porównawczej danych uzyskanych w eksperymentach RNA-seq i qPCR, przeprowadzonych dla przemrażanych podkładek M.9 i P66, ten sam typ regulacji zidentyfikowano dla ośmiu analizowanych sekwencji (Md321783 – M.9, -10°C / up, Md707995 P66 -10°C / up, Md161587 – M.9, -12°C / up, Md145463 – M.9, -10°C / down, Md303946 – M.9, -10°C / down, Md7527209 – P66 -10°C / down, Md575908 – P 66, -12°C / down, Md254705 – M.9, -10°C / down). Dla genów MD881541, MD288837, MD253080, MD664464 nie wykazano zgodnych tendencji pomiędzy wynikami eksperymentu RNA-seq i qPCR. Natomiast zmiany w poziomie ekspresji genów Md948602, Md752709 i Md254705 (typ regulacji) różnicowały w obu w eksperymentach podkładkę tolerancyjną na mróz (P66) i

podkładkę wrażliwą (M.9), kandydując na tym etapie badań do grupy markerów tolerancji na stres przemrażania.

Temat badawczy 3. Badania transkryptomu podkładek jabłoni poprzez sekwencjonowanie w systemie NGS (sezon III)

Celem tematu badawczego była analiza transkryptomu (sezon III) jabłoni poprzez sekwencjonowanie biblioteki znaczników ekspresyjnych oraz weryfikacja i wytypowanie specyficznych fragmentów EST (sprzężonych z cechą mrozoodporności), pozyskanych w wyniku sekwencjonowania *de novo* RNA dwóch podkładek jabłoni (M.9 i P 60) o odmiennej reakcji na stres niskich temperatur.

Badania prowadzono na roślinach podkładek P 60 i M.9 (10 roślin/ genotyp/ 3 temp. przemrażania: -10, -12 i -14°C). Rośliny aklimatyzowane (0°C/ 30 dni), nieprzemrażane oraz rośliny nieaklimatyzowane i nieprzemrażane stanowiły dwie kontrole. RNA izolowane z ksylemu pojedynczych prób metodą wg. Zeng i Yang łączono (pula 10 roślin). Sekwencjonowanie i analizę transkryptów przygotowanych próbek RNA przeprowadzono w systemie Genome Analyzer, Illumina Life Technologies SOLiD System (RNA-seq). Profile ekspresji genów porównywano pomiędzy parami próbek (genotyp podkładki/ kontrola vs. genotyp podkładki/ temperatura mrożenia). Łącznie odczytano 190 796 054 sekwencji. Analiza bioinformatyczna zgromadzonej bazy danych umożliwiła wytypowanie genów o istotnej różnicy w poziomie transkryptu, wynikającej z procesu przemrażania.

Na podstawie analizy mapy korelacji stwierdzono, że próbki kontrolna i doświadczalna (traktowana niską temperaturą) podkładki M.9 wykazują większe zróżnicowanie niż to, które zostało odczytane dla analogicznych próbek podkładki P 60. Na podstawie uzyskanych danych do dalszych badań wytypowano 15 EST(sezon III) kodujących następujące białka: białko z rodziny auksyn odpowiedzialnych za regulację procesów roślinnych w okresie spoczynku (*dormancy*), białko wiążące jony żelaza, komponenty błon komórkowych oraz białka uczestniczące w transporcie między- i wewnątrzkomórkowym makrocząsteczek i jonów, białka z grupy hydrolaz o funkcji wiązania kationów, uczestniczące w metabolizmie wody, białko odpowiedzi komórek na stres, białko uczestniczące w produkcji i przemianie farnesanu (osmoza komórkowa).

Wyniki zostały zaprezentowane podczas konferencji: Fourth International Horticulture Research Conference. 16-20 lipiec 2017, East Malling, Wielka Brytania (zał. 1 i 2).

- Keller-Przybyłkiewicz S., Lewandowski M., Korbin M. 2017. "RNA-SEQ markers for selection of apple rootstocks tolerant to low temperatures".


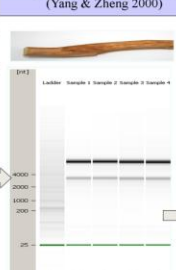
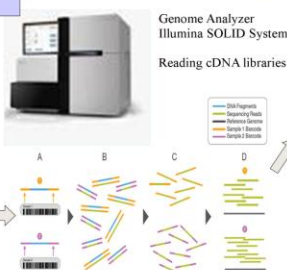
RNA-SEQ MARKERS FOR SELECTION OF APPLE ROOTSTOCKS TOLERANT TO LOW TEMPERATURES



Sylvia Keller-Przybylkowicz, Mariusz Lewandowski, Małgorzata Korbin
Research Institute of Horticulture, Department of Horticultural Crop Breeding, Skierniewice, Poland

Low temperatures during the winters without snow cover and spring ground frost are significant problem in cultivation of fruit trees in many countries of Northern hemisphere. The consequence of plant frost damages is decreasing the yield, even up to 70 %, dependent on climatic conditions in evaluated season. The physiological mechanism of plant tolerance to low temperatures stress was widely described. However, genetic fundamentals of this phenomenon in woody plant species are still not fully recognized.

The goal of presented study was to identify the genes activated in apple rootstocks by low temperature treatment.

PLANT MATERIAL	ISOLATION OF TOTAL RNA FROM PLANT XYLEM (Yang & Zheng 2000)	RNAseq EXPERIMENT AND SOFTWARE ANALYSIS														
<p>17 genotypes of apple rootstocks: P.2, P.14, P.16, P.22, P.59, P.60, P.67, P.68, M.7, M.26, MM.106, CG.11, CG.16, PB-4, Antonówka (InHort)</p> <p>Standards: P.66 (sensitive to low temp.), M.9 (tolerant)</p> <p>Plant treatment: -10°C, -12°C, -14°C (BINDER GmbH), time treatment 3h, temp. decreasing 2°C / h. Controls (k) – non-frozen rootstocks</p> 		<p>Genome Analyzer Illumina SOLID System, Reading cDNA libraries</p>  <ol style="list-style-type: none"> Sequence mapping: BBmap. Sequence reading calculation: HTseq. Final data standardization: DEseq2. Degree of variation: Pearson correlation coefficient (-1 to 1). Functional annotation (GO, gene ontology) for the prescribed <i>Malus domestica</i> genes. <table border="1"> <thead> <tr> <th>No.</th> <th>Combinations of compared library reads</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>M9-K vs. M9-10°C</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>M9-K vs. M9-12°C</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>M9-K vs. M9-14°C</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>P66-K vs. P66-10°C</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>P66-K vs. P66-12°C</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>P66-K vs. P66-14°C</td> </tr> </tbody> </table>	No.	Combinations of compared library reads	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
No.	Combinations of compared library reads															
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															

RNAseq EXPERIMENT VALIDATION WITH QPCR

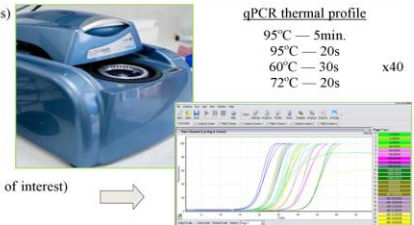
qPCR: Total RNA (1µg) → cDNA (Affinity Script qPCR cDNA synthesis Kit, Agilent) → PCR primer design (Primer 3, ITD PrimerQuest Tools)

Selection of RNAseq reads: 15 sequences encoding:

- transcription factor proteins (*Md883315*, *Md948602*, *Md254705*, *Md208730*, *Md310262*, *Md127750*)
- cell structural proteins (*Md165364*, *Md920400*, *Md7527209*, *Md392485*, *Md195260*, *Md575908*, *Md228546*)
- integral membrane cell proteins (*Md301184*, *Md695032*)

Verification of gene expression: qPCR, standard curve comparison analysis ΔΔCt (ref. *PAL* - phenylalanine ammonia-lyase vs. gene of interest) (RotorGen 6000, Corbett; RotorGen 6000 software1.7).

qPCR thermal profile: 95°C — 5min, 95°C — 20s, 60°C — 30s, 72°C — 20s x40



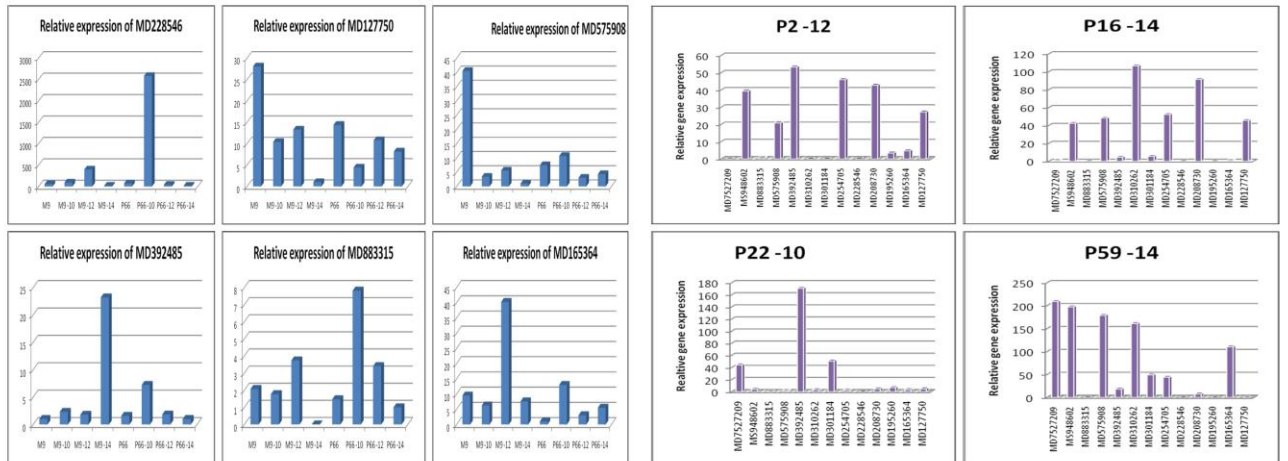
RESULTS

1. Evaluation of ESTs in apple rootstock standards

Analysis of fifteen genes (*Md0883315*, *Md0948602*, *Md254705*, *Md208730*, *Md310262*, *Md127750*, *Md165364*, *Md920400*, *Md7527209*, *Md392485*, *Md195260*, *Md575908*, *Md228546*, *Md301184*, *Md695032*) in rootstocks standards.

2. Gene expression profiling in rootstocks collection

Analysis of genes ... in of 17 genotypes apple rootstocks from collection



- Eleven genes were up regulated in the genomes of rootstocks known as tolerant to low temperatures (P2, P16, P22, P59, Antonovka, P60 and P14).
- Five genes (*Md575908*, *Md254705*, *Md208730*, *Md195260*, *Md127750*) were overexpressed in plants treated with the temp. of -12°C, while low level of transcripts was observed in controls, -10°C and -14°C.
- Two from selected genes (*Md883315*, *Md228546*) were inhibited in analyzed rootstocks.
- Stable expression of *Md948602*, *Md752709*, *Md254705* gene was observed in rootstocks tolerant to low temperature.

CONCLUSION: Three RNAseq markers, validated by qPCR and tested on the selected apple rootstocks from InHort collection could be considered as potential functional indicators of the plant response to low temperature stress.

P 4-1 RNA-Seq Markers for Selection of Apple Rootstocks Tolerant to Low TemperaturesSylwia Keller-Przybylkowicz*Research Institute of Horticulture, Poland*

Low temperatures during the winters without snow cover and spring ground frost are significant problem in cultivation of fruit trees in many countries of Northern hemisphere. The consequence of plant frost damages is decreasing the yield, even up to 70 %, dependent on climatic conditions in evaluated season. The physiological mechanism of plant tolerance to low temperatures stress was widely described. However, genetic fundamentals of this phenomenon in woody plant species are still not fully recognized. The goal of presented study was to identify the genes activated in apple rootstocks by low temperature treatment. Seventeen genotypes from the Research Institute of Horticulture were treated with temperatures -10 °C, -12 °C and -14 °C (BINDER GmbH chamber with controlled atmosphere). Total RNA, isolated from xylem tissue of each rootstock according to Zeng and Yang method, were applied for transcriptomic analysis. Sequencing of RNA transcripts was carried out in the Genome Analyzer, Life Technologies Illumina SOLID System (Genomed S.A., Poland). Totally 271,435,692 sequence reads were revealed by New Generation Sequencing technology. Totally, 30 differentially expressed genes from standard rootstocks (P 66 tolerant and M.9 susceptible to low temperatures) were selected for their function annotation in the RNA-Seq experiments (two seasons: 2015 and 2016). Selected sequences encoded: functional proteins of cell membranes and vacuoles, cellular proteins regulating intercellular and intracellular transport, macro- and micronutrients binding proteins, hydrolyzing proteins, transcription factors, structural and integral cell membrane proteins. Three differentially expressed genes from selected NGS reads, representing identical regulation type of their expression in qRT-PCR tests (RotorGene 6000, Corbett) and in the RNA-Seq experiment, were verified with use of genetic material of 17 apple rootstock derived from our field collection. The results allowed to assess the degree of diversity of plant material tested in following experimental layout: genotype/annotated gene/low temperature treatment.

The results obtained in the framework of a project No. HOR hn – 801 - 6/17_73 funded by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development.