

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 2018 badania prowadzono w ramach 3 tematów:

Temat badawczy 1

Przygotowanie materiału roślinnego i ocena fenotypowa 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 5-7.02.2018, czas mrożenia 3 h, tempo obniżania się temp. 2°C/ h; 10 roślin każdej podkładki 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 kroplowym, sterowanym automatycznie. Ochronę siewek przed chorobami i szkodnikami prowadzono według zaleceń dla sadów produkcyjnych.

Ocenę fenotypową przeprowadzono dla wszystkich ww. podkładek, 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 wszystkie badane genotypy, niemniej kondycja roślin traktowanych stresem niskich temperatur pod koniec okresu wegetacji była znacznie słabsza niż roślin kontrolnych. Największy wigor posiadały podkładki przemrażane w temperaturze -10°C. Najślabszym wigorem charakteryzowały się podkładki przemrażane w temperaturze -14°C. Dla podkładek P 66, P 67 i P 68 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. Bazując na wartościach średnich ocenianych parametrów dla trzech temperatur, w obrębie skolekcjonowanych podkładek można wyróżnić dwie grupy – mniej i bardziej wrażliwe na przemarzanie. Do pierwszej grupy można zakwalifikować podkładki P 59, P 60, P 66, P 67, P 68, M.7, MM.106, PB-4 i siewkę Antonówki, a do grupy drugiej podkładki pozostałe, czyli P 2, P 14, P 16, P 22, CG 11, CG 16, 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 II, 2016), 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 zróżnicowanej reakcji na stres przemrażania. Próbkę (ksylem) izolowano z roślin traktowanych trzema temperaturami: -10°C , -12°C i -14°C oraz z roślin kontrolnych, niepoddawanych w/w stresowi. Całkowite RNA wyizolowano zgodnie z metodą opisaną przez Zeng i Yang. Następnie RNA ($1\mu\text{g}$) poddano transkrypcji do stabilnego cDNA przy użyciu zestawu AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). Do amplifikacji fragmentów dsDNA użyto łącznie 15 par oligonukleotydów zaprojektowanych w badaniach własnych do sekwencji genów (EST) wytypowanych w roku 2016 na podstawie odczytów sekwencji fragmentów transkryptomów, reprezentujących zróżnicowany poziom ekspresji w genomach wzorcowych podkładek jabłoni.

Ocenę zmian ekspresji poziomu transkryptu w genomach 17 podkładek jabłoni przeprowadzono dla fragmentów EST genów kodujących: białka z grupy hydrolaz (Md664464, Md475472, Md288837, Md321783, 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).

W przeprowadzonych testach zaobserwowano: wzrost ilości transkryptu genów o adnotacjach Md161758, Md203983, Md196401 oraz spadek ekspresji genów: Md664464, Md321783, Md217803, Md28837 we wszystkich badanych podkładkach jabłoni traktowanych temperaturą -10°C . Osiem wytypowanych genów (Md161758, Md203983, Md707995, Md664464, Md145463, Md253080, Md303946, Md546231) podlegało inhibicji w podkładkach wrażliwych (P22, P26, P67, P68, M7, M.9, M.26, MM106, GC11, GC16, PB4, Antonówka) (-12°C , -14°C), natomiast gen Md475472 - aktywacji (wzrost 100x) (-12°C , -14°C).

b). Analiza zmian w poziomie ekspresji 15 genów (RNA-seq sezon III - 2017) 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 tolerancyjnej P 60. Próbkę (ksylem i korzeń) izolowano z roślin traktowanych trzema temperaturami: -10°C , -12°C i -14°C oraz z roślin kontrolnych, niepoddawanych w/w stresowi. Izolację materiału do badań przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną w punkcie 2a. Do amplifikacji fragmentów dsDNA użyto łącznie 15 par oligonukleotydów zaprojektowanych w badaniach własnych do sekwencji 15 genów wytypowanych w roku 2017 na podstawie odczytów sekwencji fragmentów transkryptów, reprezentujących zróżnicowany poziom ekspresji w genomach wzorcowych podkładek jabłoni.

Ocenę zmian poziomu ekspresji przeprowadzono dla fragmentów EST: czterech genów biorących udział w wiązaniu kationów regulujących reakcje chemiczne - Md32326, Md22724, Md425030, Md843015; pięciu genów kodujących białka transportowe błon komórkowych – Md318613, Md139165, Md165140, Md163192, Md312901; czterech genów kodujących komponenty komórkowej błony fosolipidowej – Md432351, Md240736, Md247173, Md843015; dwóch genów aktywowanych pod wpływem czynników stresu – Md834597, Md668869 oraz genu kodującego białka z rodziny auksyn regulujących rozpoczęcie fazy spoczynku roślin.

W przypadku podkładki wrażliwej M.9 wytypowano grupę pięciu genów, które ulegały aktywacji zarówno w korzeniu jak i w tkankach przewodzących (Md318613, Md425030, Md432351, Md39165, Md163192). Druga grupa genów (Md222724, Md240736, Md165140) podlegała aktywacji w tkankach ksylemu i inhibicji w tkankach korzenia, natomiast dla dwóch genów (Md385497 i Md285927) odnotowano indukcję w korzeniu a inhibicję w tkankach przewodzących badanej podkładki,

W przypadku tolerancyjnej podkładki P 60 zidentyfikowano pięć genów (Md32326, Md 240736, Md318613, Md455030, Md163192), dla których zaobserwowano aktywację ekspresji zarówno w korzeniu jak i w tkankach przewodzących. Cztery z wytypowanych genów (Md222724, Md385497, Md165140, Md285927) ulegały inhibicji w ksylemie, ale indukcji w tkankach korzenia, natomiast dwa (Md139165 i Md432251) wykazały odwrotną aktywność w testowanych tkankach podkładki P 60, traktowanej niskimi temperaturami.

c. Walidacja poziomu transkryptów 30 genów wytypowanych na podstawie eksperymentu RNA-seq, metodą qPCR.

Po przeprowadzeniu analizy porównawczej wyników uzyskanych zarówno w eksperymencie RNA-seq jak i w teście qPCR, dla dwóch sekwencji deEST (Md32326 i Md25927) obserwowano spadek ekspresji w próbach uzyskanych z podkładki M.9 traktowanych temperaturą -14°C (M.9, -14°C /down). Gen Md222724 podlegał nadekspresji (up regulacji) w podkładce M.9 traktowanej temperaturą -12°C (M.9, -12°C /up), natomiast dla genów Md425030 oraz Md139165 zaobserwowano nadekspresję poziomu transkryptu w podkładce M.9 traktowanej temperaturą -14°C (M.9, -14°C /up). W przypadku podkładki P 60 badane geny wykazały profil ekspresji odmienny niż uzyskany w eksperymencie RNAseq. Na podstawie przeprowadzonych testów walidacyjnych (RNAseq vs qPCR) wytypowano łącznie 13 fragmentów EST, dla których odnotowano zróżnicowaną regulację w układzie genotyp/ gen/ temperatura przemrażania.

Temat badawczy 3

Badania transkryptomu podkładek jabłoni poprzez sekwencjonowanie w systemie NGS (sezon IV)

Celem tematu badawczego była analiza transkryptomu (sezon IV, 2018r) 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 (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 kontrole. Całkowite RNA izolowano z tkanki ksylemu oraz korzenia wg. metody Zeng i Yang. Pojedyncze próby RNA o zmierzonej koncentracji łączono, a do dalszych etapów badań (firma komercyjna) 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 (genotyp podkładki/ kontrola vs. genotyp podkładki/ temperatura mrożenia) i wytypowanie genów o statystycznie istotnej różnicy w poziomie ekspresji. Łącznie odczytano 233 606 825 sekwencji (tj. 500 tyś. zróżnicowanych transkryptów). Odczyty sekwencji RNA wyizolowanego z korzenia podkładek M.9 (wrażliwa) oraz P 60 (tolerancyjna) w stosunku do prób kontrolnych i doświadczalnych (traktowanych niską temperaturą) wykazały większe zróżnicowanie. Ponad to w przypadku podkładki P 60 (tolerancyjna) ekspresja uzyskanych transkryptów między poszczególnymi próbami była mniej zróżnicowana.

Spośród adnotowanych sekwencji wybrano 15 EST kodujących: komponenty błon komórkowych oraz białka uczestniczące w transporcie między- i wewnątrzkomórkowym makrocząsteczek i jonów, białka przekaźnikowe inicjujące zmiany aktywności komórkowej, białka transportowe i receptorowe błon organelli komórkowych oraz białka aktywowane podczas czynników abiotycznych i uczestniczące w regulacji komórkowych systemów naprawczych.