

### **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 2019 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 4-6.02.2019, 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 kropłowym, 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**

Ocena poziomu ekspresji wytypowanych genów kandydujących w genomach podkładek wzorcowych i 15 podkładek z kolekcji.

Celem tematu badawczego była ocena zmian w ekspresji fragmentów kandydujących, wytypowanych na podstawie wyników sekwencjonowania transkryptomu wzorcowych podkładek jabłoni i w pozostałych podkładkach z kolekcji IO, przeprowadzona metodą qPCR.

Przeprowadzono trzy etapy analiz:

a). Analiza zróżnicowania 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 (1µg) poddano transkrypcji do stabilnego cDNA przy użyciu zestawu AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). Do amplifikacji fragmentów ds-cDNA 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 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 badaniach zaobserwowano: wzrost ilości transkryptu genów o adnotacji Md285927 oraz Md312901 w podkładek wrażliwych (M.9, MM106, CG11, PB4; odpowiednio dla temp. -14 i -12°C). Spadek aktywności genów Md8343015, Md247173, Md385927, Md139165 oraz Md668869 (dla temp. -10 i -14°C) zaobserwowano w podkładek tolerancyjnych P 66, P 60, P 2, CG16, natomiast wzrost ekspresji badanych genów w tej samej puli przemrażanych podkładek zaobserwowano w przypadku genów Md425030, Md222724, Md32326, Md163192. Spadek ilości transkryptu genu o adnotacji Md165140 odnotowano u podkładek wrażliwych MM106, Antonówka, M.9 potraktowanych temp. -10°C. Ponad to silny wzrost ekspresji genów Md318613 oraz Md240736 oszacowano w puli wszystkich badanych podkładek traktowanych temp. -14°C.

b). Analiza zmian w poziomie ekspresji 15 genów (RNA-seq sezon IV, 2018) 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 2018 na podstawie odczytów sekwencji fragmentów transkryptów, reprezentujących zróżnicowany poziom ekspresji w genomach wzorcowych podkładek jabłoni.

Ocenę zmian ekspresji przeprowadzono dla następujących fragmentów EST: dziewięciu EST genów kodujących białka stanowiące komponenty błony komórkowej i organelli – Md258197, Md141228, Md352930, Md241358, Md786461, Md228548, Md198091, Md255592, Md134238; pięciu genów kodujących białka biorące udział w transporcie makro- i mikroelementów oraz w dyfuzji jonów Mg<sup>2+</sup> przez błonę komórkową – Md135041, Md280910, Md893990, Md154241 i Md496812, a także jednego genu o adnotacji Md773609, biorącego udział w tworzeniu białek receptorowych błony komórkowej. Analiza wytypowanych 15 EST z przeprowadzona dla podkładek P 66 i M.9 pozwoliła na zidentyfikowanie dwóch genów: Md141228 oraz Md496812, dla których odnotowano istotny spadek ekspresji w tkankach ksylemu u obu przemrażanych podkładek. Dla podkładki wrażliwej M.9 traktowanej temperaturą -10°C zaobserwowano wzrost ilości transkryptu Md134238, Md198091, Md241358, Md255592, Md258197, Md352930 oraz spadek aktywności transkryptu genu Md893990. W przypadku podkładki tolerancyjnej P 60 obserwowano spadek ilości transkryptu genów Md141221, Md496812, Md235041 (dla temp. -10°C), natomiast obniżenie temperatury do -14°C powodowało wzrost aktywności ww. genów. Podobną aktywację odnotowano także dla genów Md134238, Md198091, Md255592, Md893990 (dla temp. -12°C), genu Md241358 (dla temp. -10°C) oraz genów Md258197, Md289101, Md352930 (dla temp. -14°C).

c. Walidacja poziomu transkryptów 15 genów wytypowanych na podstawie eksperymentu RNA-seq, metodą qPCR (sezon NGS 2018).

Na podstawie analiz przeprowadzonych w oparciu o pomiary ekspresji wytypowanych sekwencji EST (2018) przeprowadzono analizę porównawczą typu regulacji poziomu ich transkryptów (*up/down regulation*) w eksperymencie RNAseq oraz teście qPCR w celu wyłonienia przypuszczalnych markerów mrozoodporności. W przypadku pięciu wytypowanych sekwencji EST odnotowano ten sam rodzaj regulacji w testach qPCR jak i w przeprowadzonych eksperymentach RNAseq. Dla dwóch zwalidowanych sekwencji deEST Md258197 i Md141228, zaobserwowano spadek ekspresji (*down regulation*) w próbach uzyskanych z podkładki M.9 traktowanych temperaturą -10°C (M.9, -10°C

/down). Podobnie, spadek aktywności genu Md496812 w obu przeprowadzonych testach, odnotowano dla podkładki M.9 potraktowanej temperaturą  $-12^{\circ}\text{C}$  (M.9,  $-12^{\circ}\text{C}/\text{down}$ ). Aktywację (*up regulation*) oraz inhibicję (*down regulation*) dla genów Md893990 (P 60,  $-12^{\circ}\text{C}/\text{up}$ ) oraz Md198091 (P 60,  $-10^{\circ}\text{C}/\text{down}$ ) w obu typach układów eksperymentalnych zaobserwowano dla podkładki tolerancyjnej P 60 traktowanej odpowiednio temperaturą  $-12^{\circ}\text{C}$  i  $-10^{\circ}\text{C}$ .

### **Temat badawczy 3**

#### Weryfikacja uzyskanych danych z eksperymentów RNAseq.

Celem tematu była kontynuacja adnotacji funkcjonalnej sekwencji zgromadzonych w bibliotece transkryptomowej podkładek jabłoni i ocena poziomu ekspresji (metodą qPCR) wytypowanych 15 sekwencji fragmentów EST, o potwierdzonym typie regulacji oraz dalsza ich weryfikacja jako potencjalnych markerów mrozoodporności.

Materiał do analiz stanowiła skolekcjonowana dotychczas baza sekwencji bibliotek cDNA (2015-2018) z sekwencjonowania transkryptomu wzorcowych podkładek jabłoni o zróżnicowanym stopniu tolerancji na niskie temperatury. Adnotacje funkcjonalne dla poszczególnych genów (identyfikatory GO, *gene ontology*) zostały przypisane na podstawie uzyskanych plików (gff) z opisem genów wyłonionych dla genomu *Malus domestica*.

Spośród adnotowanych sekwencji wybrano kolejnych 15 (sezon IV), które poszerzają bazę EST przydatną do dalszych analiz w ramach realizacji zadania.

Wytypowane sekwencje kodują: 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.

W wyniku przeprowadzonej analizy profilu ekspresji zaobserwowano: spadek poziomu transkryptu genów o adnotacji Md187047 oraz Md230387 w genomie przemrażanej podkładki tolerancyjnej P 60, natomiast istotny wzrost ekspresji w przemrażanej podkładce wrażliwej M.9. Kolejną grupę genów stanowiły geny wykazujące wysoką aktywność w nieprzemrażanej podkładce P 60 oraz w podkładce M.9 potraktowanej temperaturą  $-10^{\circ}\text{C}$ . Do grupy tej zaliczono geny o adnotacjach: Md467354, Md515106, Md629440, Md836749, Md920349. Jednocześnie w przypadku tych genów odnotowano, że poziom ekspresji w genomie podkładki wrażliwej był większy w odniesieniu do porównywanej podkładki tolerancyjnej. Ponadto w wyniku analizy porównawczej badanej puli roślin zaobserwowano 300 - krotny wzrost poziomu transkryptu genu Md827881 tylko dla przemrażanej ( $-12^{\circ}\text{C}$ ) podkładki M.9.