Wpływ czynników biotycznych i abiotycznych na zmiany aktywności wybranych genów w roślinach podkładek dla jabłoni hodowli IO-PIB

Sylwia Keller-Przybyłkowicz, Mariusz Lewandowski, Agnieszka Walencik, Krystyna Strączyńska, Bogusława Idczak, Renata Czarnecka, Krzysztof Strojny
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
Sylwia.Keller@inhort.pl

WSTĘP

Współczesne rolnictwo stawia czoła wyzwaniom zmieniającego się klimatu, wymagając nowoczesnych i zaawansowanych rozwiązań. W odpowiedzi na te potrzeby w IO-PIB w Skierniewicach podjęto próbę uzyskania innowacyjnych podkładek dla jabłoni, stworzonych z myślą o maksymalizacji plonów oraz skutecznej ochronie przed skutkami mrozu i porażeniem *Phytophthora cactorum*. *Phytophthora cactorum* to polipatogen infekujący wiele gatunków roślin żywicielskich. Jest głównym czynnikiem zgnilizny korzeni u truskawek i zgnilizny pierścieniowej podstawy pnia jabłoni, powodując zahamowanie wzrostu roślin i rozwoju systemu korzeniowego. Zarodniki rozprzestrzeniają się przez wiatr i deszcz, który dostaje się do gleby z zainfekowanych roślin.

Ocenę mrozoodporności w doświadczeniach polowych trudno jest przeprowadzić ze względu na niską powtarzalność warunków pogodowych, a uszkodzenia zarówno części nadziemnej jak i systemu korzeniowego podczas mroźnych i bezśnieżnych zim stanowią istotny problem polskiej hodowli roślin tego gatunku. Dotychczasowe badania wykazały, że w przypadku roślin drzewiastych tolerancja na niskie temperatury ma charakter poligeniczny, a molekularny mechanizm regulacji mrozoodporności nie został jak dotąd rozpoznany.

Zważywszy, że molekularny mechanizm regulacji obu cech nie jest jasny, głównym celem prezentowanego badania była identyfikacja genów potencjalnie zaangażowanych w ich kontrolę. W badaniu zastosowano technikę sekwencjonowania transkryptomów podkładek: PJ-173 (próby kontrolnej i poddanej inokulacji *P. cactorum*) oraz P 66 (próby kontrolnej i przemrażanej).

MATERIAŁY I METODY

- ***Immunizacja podkładek grzybem Phytophtora cactorum: (107 ml · -1, liczona w komorze Bürckera).***

1. Szczep grzyba *P. cactorum* (ZORS, IO-PIB)—Podłoże PDA - 25° C / 14 dni,
2. Podłoże z płatkami owsianymi (5g płatków owsianych / 15 ml wody) - 14 dni inkubacji, następnie zmieszane z glebą – ponowna inkubacja 10 dni / 23-25° C,
3. Wyselekcjonowane podładki PJ-173/2012, PJ-191/2016, M.9, P 59, P 60 (różnią się reakcją roślin na *P. cactorum*) umieszczono w podłożu zmieszanym z zarodnikami grzyba i umieszczono w tunelu foliowym celem dalszego wzrostu i obserwacji.

Rys. 1. Przygotowanie podłoża do przeprowadzenia zakażenia roślin grzybem *P. cactorum*

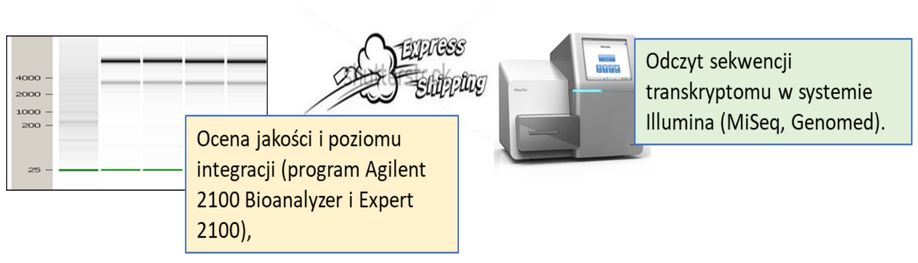
- ***Przemrażanie podkładek:***

1. Rośliny podkładek, M.9, a także P 59, P 60 i P 66 (pędy, liście, korzeń).
2. Mrożenie w komorze do sztucznego przemrażania (BINDER GmbH): temp. -10°C, -12°C i -14°C (czas 3 h, tempo obniżania się temp. 2°C/ h;
3. Kontrolę stanowiły podkładki nieprzemrażane.
4. Po zabiegu podkładki przeniesiono do chłodni szkółkarskiej (0°C).

Rys. 2 . Przemrażanie roślin podkładek dla jabłoni do oceny tolerancji na mróz

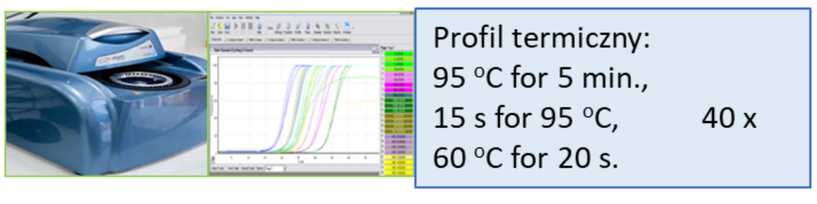
- ***Sekwencjonowanie transkryptomów:***

izolacja RNA (Zeng &Yang 2000)



Adnotacja funkcjonalna DEG — baza danych dot. szlaków metabolicznych KEGG (Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes)

- ***Profilowanie ekspresji genów*** (qPCR)



- ***Obliczanie względnej ekspresji***: metoda $2^{-\Delta\Delta Ct.}$
- ***Wizualizacja danych***: GraphPadPRISM 8.1, obliczone wartości porównani do M.9 i znormalizowano względem genu referencyjnego PAL (stres mrozu)/ 18sRNA (porażenie *P. cactorum*), przypisano jako średni ± błąd standardowy.

WYNIKI

Analiza transkrytpomów roślin podkładek dla jabłoni traktowanych *P. cactorum* oraz mrozem

W ramach RNAseq przygotowano 4 biblioteki cDNA i zmapowano je do genomu referencyjnego (ASM211411v1: www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_002114115.1/)

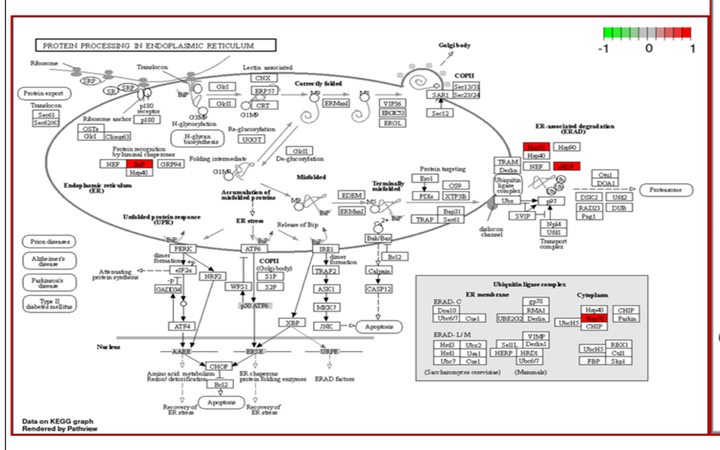
2 Biblioteki cDNA—kontrola K_PJ173/2012 i zainfekowane: Z_PJ173/2012—**34G czystych danych**

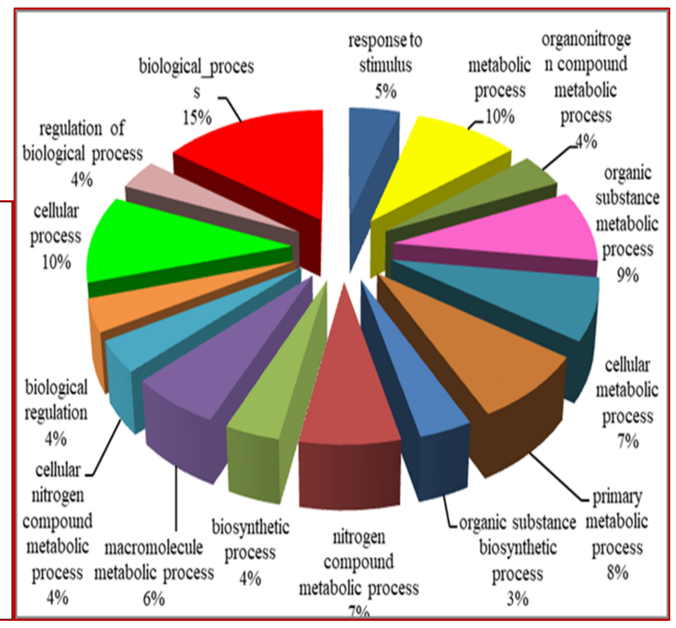
2 Biblioteki cDNA—kontrola nieprzemrażana P 60 i próba przemrażana P 60—**45G czystych danych**

Analiza wzbogacania KEGG, przypisanie grup funkcyjnych:

procesy biologiczne, BP (7 681),
składniki komórkowe, CC (2 724),
czynniki molekularne, MF (4 938).

Rys. 3. Przykładowy szlak (KEGG) ze zmapowanymi DEG's, up-regulowanymi w roślinach kontrolnych w przeprowadzonych testach RNAseq



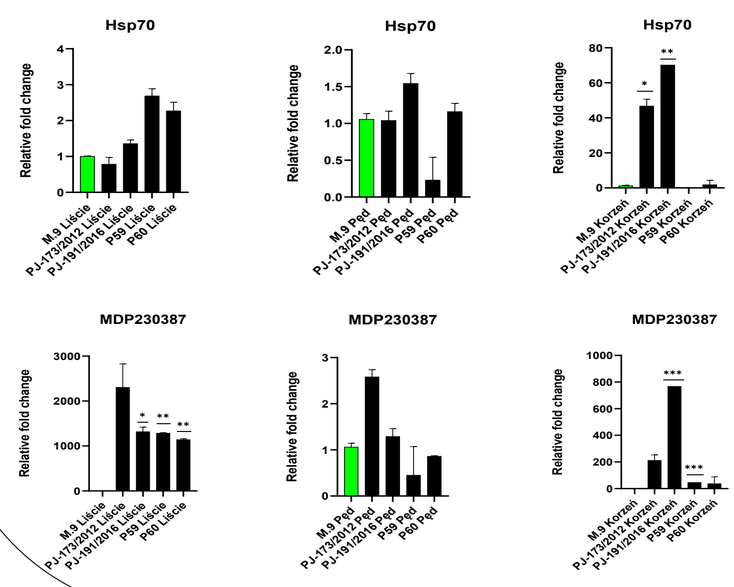


Profilowanie ekspresji genów wytypowanych w eksperymentach RNAseq

Po przeprowadzeniu analizy funkcjonalnej uzyskanych odczytów sekwencji genów o zróżnicowanej ekspresji, do dalszych badań walidacyjnych wytypowano dwa geny zaangażowane w regulację odpowiedzi badanych podkładek dla jabłoni na stres abiotyczny i abiotyczny (identyfikatory i funkcje genów przedstawiono w tabeli 1).

ID genu	Funkcja genu	Sekwencje oligo (PrimerPRO3)
MdP321783	Białko integralne błony komórkowej	F: AAGATGGACTGCGAAGGATG R: GCGCCTTCTTGTCGTACACT
LOC103435785	Białko Hsp70: koduje 22.0 kDa class IV heat shock protein-like, mediator of RNA polymerase II transcription subunit. Ubiquitin ligase formation, związany z regulacją informacji genetycznych (Genetic Information Processing)	F: ACACCAGACACCAGACACTG R: CCCCATTTTCCAACTTGGCG

Rys. 4. Profile ekspresji wytypowanych DEGs



Wyniki testów qPCR

- Wzrost aktywności, w odniesieniu do podkładki standardowej M.9, obu badanych genów odnotowano w próbkach liści, pędów i korzeni podkładki PJ-191/2016.
- Największą zmianę w liczbie transkryptów obu genów (w przypadku Hsp70 70-krotny, a w przypadku MDP230387; 720-krotny) oszacowano w próbach skolekcjonowanych z korzeni roślin tej podkładki.
- W przypadku genu MDP230387 największy wzrost liczby transkryptu (ponad 1000-krotny) oszacowano w próbach liści skolekcjonowanych z podkładek PJ-191/2016, P 59 oraz P 60.

PODSUMOWANIE

- Potwierdzono złożony proces regulacji odpowiedzi roślin na stresy (abiotyczny i biotyczny), które zachodzą na poziomie przetwarzania białek siateczki śródplazmatycznej jak i na poziomie zmian integracji błony komórkowej.
- Wytypowane sekwencje mogą być wykorzystane do opracowania funkcjonalnych markerów molekularnych do wczesnej selekcji podkładek.
- Umożliwią monitorowanie badanych cech użytkowych podkładek dla jabłoni.

Badania wykonano w ramach zadań celowych finansowanych przez MRiRW– Zad.3.14. pt: „Wytworzenie materiałów wyjściowych podkładek wegetatywnych dla jabłoni (Malus Mill.) odpornych na zgniliznę pierścieniową podstawy pnia jabłoni, wytrzymałych na niskie ujemne temperatury oraz bezciernistych„