

**SYLWIA KELLER-PRZYBYŁKOWICZ**

**MARIUSZ LEWANDOWSKI**

**MAŁGORZATA KORBIN**

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Kierownik Tematu: dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz Pracownia Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach ul Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice, tel.+48 46 8345254; e-mail: sylwia.keller@inhort.pl

*Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.20.2018, Zadanie 73.*

## Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z tolerancją wegetatywnych podkładek jabłoni na niskie temperatury poprzez analizę transkryptomu i ocenę stopnia polimorfizmu genów kandydujących

**Identification of the genome regions correlated with cold hardiness of apple rootstocks by transcriptomic analysis of differentially expressed candidate genes**

**Słowa kluczowe:** adnotacja, EST, jabłoń, qPCR, RNAseq, sekwencjonowanie NGS, transkryptom

Celem tematu była analiza fenotypowa 17 podkładek jabłoni z kolekcji IO z zastosowaniem oceny nasilenia reakcji obronnej badanych roślin po przemrożeniu oraz oceny zmian ekspresji genów kandydujących (CG) (qPCR), wytypowanych na podstawie sekwencjonowania transkryptomu dwóch podkładek wzorcowych i 15 innych z kolekcji Instytutu, a także wytypowanie nowych fragmentów EST genów o zróżnicowanej ekspresji w podkładkach wzorcowych, dla poszerzenia dotychczasowej bazy markerów mrozoodporności.

Badania fenotypowe 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) sztucznie przemrażanych w komorze BINDER GmbH (temp: -10°C, -12°C i -14°C). Próby kontrolne stanowiły podkładki nie traktowane ww. temperaturami.

Ocenę stopnia reakcji badanych obiektów po zastosowaniu niskich temperatur, przeprowadzono w układzie genotyp/podkładka/temperatura. Dla wszystkich badanych podkładek wykonano pomiary: średnicy pędu przewodnikowego podkładki (mm), stopnia regeneracji podkładek (skala 1–5); wysokości pędu przewodnikowego podkładki (cm); długości przyrostów jednorocznych (cm); świeżej masy korzeni podkładek (g).

W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano, że żadna z temperatur nie spowodowała śmierci całej puli badanych genotypów, ale kondycja roślin pod koniec okresu wegetacji była słabsza niż roślin kontrolnych. Największy wigor posiadały podkładki przemrażane w temperaturze  $-10^{\circ}\text{C}$ . Najślabszym wigorem charakteryzowały się podkładki przemrażane w temperaturze  $-14^{\circ}\text{C}$ . 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 (Żurawicz i Lewandowski, 2014). 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.

Skolekcjonowaną w ramach zadania bazę sekwencyjną z eksperymentów RNAseq z dwóch sezonów badawczych (2016 i 2017) poddano weryfikacji metodą qPCR. W tym celu, z tej samej puli roślin, do badań molekularnych dotyczących oceny zmian ekspresji genów kandydujących (CG) (qPCR) zachodzących w podkładkach wzorcowych oraz w podkładkach z kolekcji Instytutu, wyizolowano matryce RNA (Zeng i Yang, 2000). Całkowite RNA ( $1\mu\text{g}$ ) poddano transkrypcji do stabilnego cDNA (AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit, Agilent). Do amplifikacji fragmentów dsDNA użyto par oligonukleotydów zaprojektowanych do sekwencji 30 genów (EST, 2016 i 2017) wytypowanych na podstawie odczytów sekwencji transkryptomów wzorcowych podkładek jabłoni. W pierwszym etapie badań przeprowadzono ocenę zmian profilu 15 fragmentów EST (2016) w genomach 17 podkładek jabłoni. Wytypowane sekwencje kodują: białka 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  $\text{Zn}^{2+}$ , 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 podkładkach ( $-10^{\circ}\text{C}$ ). Osiem 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) ( $-12^{\circ}\text{C}$ ,  $-14^{\circ}\text{C}$ ), natomiast gen *Md475472* — aktywacji (wzrost 100x) ( $-12^{\circ}\text{C}$ ,  $-14^{\circ}\text{C}$ ).

W drugim etapie badań przeprowadzono ocenę zmian w profilu ekspresji 15 EST (RNAseq, 2017) w genomach podkładek wzorcowych: wrażliwej M.9 i tolerancyjnej P 60.

RNA wyizolowane z tkanek ksylemu i korzenia z roślin traktowanych oraz kontrolnych, przepisane na stabilne cDNA, stanowiło matrycę do reakcji amplifikacji fragmentów dsDNA, do których użyto par oligonukleotydów komplementarnych do sekwencji transkryptów o zróżnicowanej ekspresji.

Ocenę zmian ekspresji przeprowadzono dla 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 foso-lipidowej — *Md432351*, *Md240736*, *Md247173*, *Md843015*; dwóch genów, które podlegają aktywacji pod wpływem czynników stresu — *Md834597*, *Md668869* oraz genu kodującego białka z rodziny auksyn regulujących rozpoczęcie fazy spoczynku roślin (Velasco i in., 2010; Bai i in., 2014)

Na podstawie testów qPCR dla podkładki M.9, wytypowano grupę genów, aktywowanych w korzeniu 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 podkładki M.9. W przypadku tolerancyjnej podkładki P 60 dla pięciu genów (*Md32326*, *Md240736*, *Md318613*, *Md455030*, *Md163192*) 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.

Dodatkowo, na podstawie przeprowadzonych testów walidacyjnych (RNAseq vs. qPCR) (Imelfort i Edwars, 2009) wytypowano łącznie 13 fragmentów EST, dla których odnotowano zróżnicowaną regulację w układzie genotyp/ gen/ temperatura przemrażania.

Ostatnim etapem badań była analiza transkryptomu jabłoni, poprzez sekwencjonowanie NGS oraz wytypowanie specyficznych fragmentów EST (sprzężonych z cechą mrozoodporności). Sekwencjonowanie i analiza porównawcza w układach genotyp podkładki/ kontrola vs. genotyp podkładki/ temperatura mrożenia próbek (M.9 — wrażliwa i P 60 — tolerancyjna) pozwoliła na odczyt 233 606 825 sekwencji (tj. 500 tys. transkryptów) (Xu, 2010).

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 stresów abiotycznych i regulujących komórkowe systemy naprawcze.

#### WNIOSKI

1. Podkładki P 66, P 67 i P 68 można uznać za tolerancyjne na stres niskich temperatur.

2. Poziom ekspresji badanych genów zależy od genotypu podkładki, badanej tkanki roślinnej (ksylem / korzeń) i stosowanej temperatury przemrażania.
3. Trzynaście EST, o odrębnym typie regulacji w podkładkach tolerancyjnych i wrażliwych na mróz, zidentyfikowano jako potencjalne markery tolerancji na stres niskiej temperatury.
4. Wytypowane i adnotowane sekwencje transkryptomu jabłoni poszerzają bazę danych, z której wyłonione zostaną przypuszczalne markery funkcjonalne badanej cechy podkładek jabłoni.

#### LITERATURA

- Bai Y., Dougherty L., Xu K. 2014. Towards an improved apple reference transcriptome using RNA-seq. *Mol. Genet Genomics*, vol. 289: 427 — 438.
- Imelfort M., Edwards D. 2009. De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies. *Briefings in Bioinformatics*, Vol. 10, Issue 6: 609 — 618
- Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J., Dhingra A., Cestaro A., Kalyanaraman A., Fontana P., Bhatnagar S.K., Troglio M., Pruss D., Salvi S., Pindo M., Baldi P., Castelletti S., Cavaiuolo M., Coppola G., Costa F., Cova V., Dal Ri A., Goremykin V., Komjanc M., Longhi S., Magnago P., Malacarne G., Malnoy M., Micheletti D., Moretto M., Perazzolli M., Si-Ammour A., Vezzulli S., Zini E., Eldredge G., Fitzgerald L.M., Gutin N., Lanchbury J., Macalma T., Mitchell J.T., Reid J., Wardell B., Kodira C., Chen Z., Desany B., Niaz F., Palmer M., Koepke T., Jiwan D., Schaeffer S., Krishnan V., Wu C., Chu V.T., King S. T., Vick J., Tao Q., Mraz A., Stormo A., Stormo K., Bogden R., Ederle D., Stella A., Vecchiatti A., Kater M. M., Masiero S., Lasserre P., Lespinasse Y., Allan A. C., Bus V., Chagné D., Crowhurst R. N., Gleave A. P., Lavezzo E., Fawcett J.A., Proost S., Rouzé P., Sterck L., Toppo S., Lazzari B., Hellens R. P., Durel C. E., Gutin A., Bumgarner R. E., Gardiner S.E., Skolnick M., Egholm M., Van de Peer Y., Salamini F., Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42 (10): 833 — 841, DOI:10.1038/ng.654.
- Xu. 2010. The Apple genome: A delicious promise. *New York Fruit Quarterly*, 18 (4).
- Żurawicz E., Lewandowski M. 2014. Controlled Freezing as a Low-Temperature Tolerance Test for Apple Rootstocks. *Acta Horticulture* 1058: 451 — 456.