

Ocena zmian profilu ekspresji genów kandydujących w podkładkach jabłoni o odmiennym stopniu tolerancji mrozowej

Evaluation of changes in the expression profile of candidate genes in apple rootstockss with a different degree of frost tolerance

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz[✉], Mariusz Lewandowski^{ORCID}

Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,
Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,
✉ e-mail: sylwia.keller@inhort.pl

Celem przeprowadzonych badań była identyfikacja genów sprzężonych z cechą mrozoodporności podkładek jabłoni. Ocena zmian w poziomie ekspresji wyizolowanych genów przeprowadzono metodami RNAseq i qRT-PCR, dla podkładek zróżnicowanych po względem stopnia tolerancji mrozowej: P 66 (tolerancyjna) i M.9 (wrażliwa).

W wyniku przeprowadzonych odczytów sekwencji RNA (sekwencjonowanie *de novo* w systemie Illumina Solid) dla w/w podkładek zidentyfikowano około 167 milionów odczytów unikatowych sekwencji, z których do wstępnych badań weryfikacyjnych wytypowano 15 o zróżnicowanym profilu ekspresji. Sekwencje poddano adnotacji funkcjonalnej. Wytypowane geny kodują: białka strukturalne i integralne błon komórkowych i wakuoli komórkowych, czynników transkrypcyjnych, białek regulujących transport międzykomórkowy i wewnątrzkomórkowy, białek hydrolizujących wiązania C-O i C-N oraz białek wiążących makro- i mikroelementy. Celem weryfikacji typu regulacji sekwencji transkryptomu uzyskanych z sekwencjonowania nowej generacji (NGS), dla tych samych prób przeprowadzono ilościową analizę transkryptu genów (qRT-PCR). Spośród badanych genów, trzy reprezentowały identyczny typ regulacji w badanych układach eksperymentalnych RNA-seq i qRT-PCR. Wytypowane geny stanowią potencjalne sekwencje kandydujące do sporządzenia markerów funkcjonalnych, umożliwiających wczesną selekcję podkładek jabłoni tolerancyjnych na mróz.

Słowa kluczowe: adnotacja funkcjonalna genów, *Malus domestica* Borkh., sekwencjonowanie, profil ekspresji, ilościowa reakcja amplifikacji

The aim of presented study was to identify putative candidate genes associated with apple rootstock winter hardiness. The assessment of changes in expression profile of isolated differentially expressed genes, was performed using two subsequent experiments: RNAseq (based on New Generation Sequencing, NGS) and qRT-PCR (Real Time transcript amplification). In terms of traits of interests two apple rootstocks P 66 (frost tolerant) and M.9 (frost sensitive) were evaluated. As a result of the RNA sequence readings (*de novo* sequencing, Illumina Solid system), approximately 167 million reads of unique sequences were identified. Finally, fifteen functionally annotated expressed tags, representing different expression profile, were chosen. Selected putative genes coding: structural and integral proteins of cell membranes and cellular vacuoles, transcription factors, proteins regulating intercellular and intracellular transport, C-O and C-N bonds hydrolyzes, and proteins binding macro- and microelements.

In order to verify the type of regulation of the transcriptome sequences obtained in NGS technology, qRT-PCR tests were carried out for the same samples layout. Three of studied sequences, represented identical type of regulation in both RNA-seq and qRT-PCR experiments. The selected genes seems to represent potential candidate sequences (functional molecular markers), enabling the early selection of frost-tolerant apple rootstocks.

Key words: expression profile, gene annotation, *Malus domestica* Borkh., new generation sequencing (NGS), quantitative transcript level (qRT-PCR)

Wstęp

Zimowe uszkodzenia roślin wieloletnich uprawianych w regionach o umiarkowanym klimacie stanowią duży problem w hodowli. Długotrwałe przymrozki, często bez pokrywy śnieżnej, szybkie ocieplenie i kolejne fale wiosennych

przymrozków powodują znaczne straty zarówno w naziemnych organach roślinnych, jak i systemie korzeniowym drzew. Co więcej, uszkodzenia mrozowe podczas kwitnienia roślin, powodują istotne zmniejszenie plonów i są bardziej niebezpieczne niż długotrwałe działanie ujemnych

temperatur w okresie zimowym (Aygu. 2005).

Jednym z mechanizmów adaptacji roślin do tolerancji na mróz jest regulacja obejmująca zmiany biochemiczne związane z transkryptomycznym przeprogramowaniem funkcji komórkowych, które pozwalają roślinom tolerować obecność kryształów lodu w tkankach (Wisniewski i in. 2003, Kalberer i in. 2006). Drugim mechanizmem jest tzw. regulacja unikania zamrożenia podczas głębokiego ochłodzenia ($-38^{\circ}\text{C}/-42^{\circ}\text{C}$), polegająca na zmianie wody komórkowej w emulsję lodową, zmniejszając tym samym stopień rozcieńczenia cząsteczek kriochronnych, takich jak cukry, sole itp. Dodatkowo regulacja tempa migracji wody między komórkami i w przestrzeniach pozakomórkowych może prowadzić także do stopniowego hamowania nagłego tworzenia się kryształów lodu w strukturach komórkowych (Wisniewski i in. 2003).

Tak złożony oraz poligeniczny mechanizm tolerancji mrozowej roślin nie jest w pełni rozpoznany, a dotychczasowe prace genetyczne prowadzone były głównie w USA, Nowej Zelandii, Norwegii i Japonii. W wyniku tych badań zidentyfikowano kilka grup genów, których ekspresja ulegała zmianom pod wpływem działania niskiej temperatury w genomach m.in. brzoskwini, truskawki i jabłoni. Należą do nich geny, kodujące białka z grupy dehydryn – *DREB* (*dehydration response elements binding protein*) aktywowane w wiązkach przewodzących (Feng i in. 2012, Takata i in. 2007, Zhao i in. 2012), geny CBF (C-repeat binding factor;) – czynniki transkrypcyjne (Wisniewski i in. 2007, 2011), geny z grupy MADS-box – aktywowane w pąkach kwiatowych u roślin wieloletnich (Du i in. 2008) oraz geny COR (cold regulated gene) (Wisniewski i in. 2007).

Z uwagi na słabo rozpoznane podłoże molekularne cechy mrozoodporności, w przeprowadzonych badaniach wykorzystano techniki umożliwiające wnikliwą analizę sekwencji całego transkryptomu podkładek jabłoni. Dzięki sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS – *New Generation Sequencing*) oraz ilościowej analizie zmian poziomu transkryptu genów (Real-Time quantitative PCR) w roślinach reprezentujących odmienne cechy fenotypowe, możliwe było szybkie rozpoznanie sekwencji eksonowych nowych transkryptów sprzężonych z różnymi cechami użytkowymi rodzaju *Malus* (Bai i in. 2014).

W niniejszej pracy zastosowano najnowsze techniki identyfikacji unikatowych sekwencji genów o zróżnicowanej ekspresji, które pozwoliły na określenie typu regulacji genów oraz wytypowanie fragmentów transkryptomu podkładek

jabłoni, biorących udział w regulacji mechanizmu ich tolerancji na mróz. Ponadto dostępna sekwencja genomu jabłoni odmiany 'Golden Delicious' (Velasco i in. 2010), a częściowo także jej transkryptomu (Bai i in. 2014) umożliwiła adnotację funkcjonalną tych unikatowych sekwencji.

Celem badań podjętych w Instytucie Ogrodnictwa (IO) była ocena profilu ekspresji genów, sprzężonych z cechą tolerancji na mróz podkładek jabłoni pochodzących z kolekcji IO. Poprzez analizę porównawczą wyników uzyskanych w eksperymencie RNAseq oraz oszacowania ilości transkryptu wytypowanych genów (qRT-PCR) przeprowadzono również wstępną weryfikację typu ich regulacji.

Materiał i Metody

Materiał roślinny do badań stanowiły matryce RNA wyizolowane z dwóch podkładek jabłoni o zróżnicowanym stopniu tolerancji na stres niskich temperatur – wrażliwej M.9 i tolerancyjnej P 66. Kontrolowane mrożenie wytypowanych podkładek przeprowadzono w komorze do sztucznego przemrażania materiałów roślinnych (BINDER GmbH). Zastosowano 3 temperatury mrożenia: -10°C , -12°C i -14°C , czas mrożenia 3 h, tempo obniżania się temp. $2^{\circ}\text{C}/\text{h}$. Kontrolę stanowiły podkładki nie poddawane działaniu niskich temperatur. Po zabiegu podkładki przeniesiono do chłodni szkółkarskiej (0°C) celem ich aklimatyzacji.

Próbki RNA izolowano z roślin traktowanych oraz z roślin kontrolnych, niepoddawanych w/w stresowi stosując metodę opisaną przez Zeng i Yang 2000. Uzyskany osad rozpuszczono w wodzie wolnej od RNAz (DEPC). Jakość, stopień integracji oraz koncentrację RNA oceniono metodą elektroforezy mikroprzepływowej przy użyciu Bioanalyzera 2100 i programu Expert 2100 (Agilent).

Odczyty sekwencji transkryptomu podkładki M.9 – próba kontrolna oraz próby przemrażane w temp. -10 , -12 , -14°C i podkładki P 66 – próba kontrolna oraz próby przemrażane w temp. -10 , -12 , -14°C (łącznie sekwencjonowaniu poddano 8 prób badawczych) przeprowadzono dla matrycy wyizolowanego totalnego RNA, przy użyciu platformy SOLiDGenome Analyzer, Illumina (Genomed, S.A). Następnie uzyskane DEG (differentialy expressed genes) zostały zmapowane przy użyciu programu BBmap, a ilości odczytów dla poszczególnych genów policzono przy pomocy programu HTseq. Końcowe wyniki opracowano w środowisku R [2] i znormalizowano przy pomocy pakietu DEseq2. Poziom korelacji pomiędzy badanymi próbami oszacowano przy użyciu współczynnika Pearsona (zakres od -1 do 1).

Do testów qRT-PCR, użyto RNA (1µg) wyizolowane z tej samej puli roślin, które poddano następnie odwrotnej transkrypcji do stabilnego cDNA przy użyciu zestawu Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent). Reakcję prowadzono w obecności uniwersalnego startera oligo-dT (0,1µg/µl) oraz enzymu – odwrotnej transkryptazy (RT) w zoptymalizowanych warunkach termicznych: 25°C/5 min., 42°C/5 min. – przyłączenie oligo-dT, 55°C/15 min – RT, 95°C/5 min. – inaktywacja enzymu (termocyklery Biometra Basic). Stabilne cDNA stanowiło matrycę dla ilościowej reakcji amplifikacji (qRT-PCR).

Reakcje qRT-PCR dla wytypowanych sekwencji transkryptów prowadzono na matrycy cDNA w termocyklerze RotorGen 6000 (Corbett) w obecności barwnika fluorescencyjnego SybrGreenI i uniwersalnego zestawu Kapa SybrqPCR (Kapa Biosystems). W każdym układzie eksperymentalnym w reakcji zastosowano dwie pary starterów specyficznych komplementarnych do sekwencji: genu referencyjnego *PAL* oraz genu badanego. Matrycę cDNA, przygotowano w rozcieńczeniach o znanej koncentracji, umożliwiającich sporządzenie krzywej standardowej reakcji amplifikacji. Badany układ eksperymentalny – gen ref. *PAL*/gen badany zawierał: cDNA oraz oligonukleotydy zaprojektowane do 15 sekwencji DEG (differentially expressed genes).

Profil termiczny ilościowej reakcji amplifikacji był następujący: 95°C/5 min. (aktywacja polimerazy), 95°C – 15 s, 60°C – 20 s (przyłączenie oligonukleotydów), 72°C – 20s (odczyt poziomu fluorescencji).

Ocenę poziomu ekspresji w każdej z badanych

prób przeprowadzono poprzez analizę krzywych amplifikacji (metoda porównania krzywych standardowych $\Delta\Delta C_t$, program komputerowy RotorGen. 6000 Series Software 1.7.), wyznaczonych w oparciu o pomiar fluorescencji barwnika SybrGreen w każdym cyklu reakcji. Analizę statystyczną przeprowadzono dla powtórzeń biologicznych (min. dwie próby roślinne) oraz powtórzeń technicznych (min. 2 powtórzone mieszaniny reakcyjne o tym samym składzie). Dla każdej z prób obliczono odchylenie standardowe (SD, standard deviation) natomiast dla średnich odczytów określono relatywny (krotność zmiany) poziom zmiany ilości amplikonu w badanym układzie gen referencyjny vs. gen badany (program komputerowy Rotor-Gen 6000 Series Software 1.7.).

Profile ekspresji wytypowanych genów, uzyskane w eksperymencie RNAseq i qRT-PCR następnie porównywano celem weryfikacji typu regulacji (up/down).

Wyniki

Baza adnotowanych transkryptów wytypowanych z plików wynikowych NGS

Po przeprowadzeniu wstępnych analiz korelacji pomiędzy próbkami RNA z podkładek tolerancyjnej P 66 i wrażliwej M.9 uzyskano łącznie 166 987 057 odczytów sekwencji (tj. ponad 500 tys. zróżnicowanych transkryptów). Całkowitą liczbę sekwencji odczytanych dla każdej pojedynczej próby zestawiono w tabeli 1, natomiast w Tab. 2 przedstawiono typ regulacji (porównanie poziomu transkryptu pomiędzy próbkami), sekwencje oraz ich funkcjonalną adnotację. Wielkości molekularne opracowanych sekwencji oszacowano w zakresie 20–380 pz.

Tabela 1
Table 1

Liczba odczytanych sekwencji w badanych próbach.
Number of sequences read out in the tested samples.

	Genotyp/traktowanie podkładki Genotype/treatment of apple rootstock	liczba odczytanych sekwencji Number of sequence reads
Wrażliwa	M.9 Kontrola zbiorcza	16 768 301
	M.9 (-10°C)	32 732 590
	M.9 (-12°C)	19 494 823
	M.9 (-14°C)	16 260 592
Tolerancyjna	P 66 Kontrola zbiorcza	19 587 737
	P 66 (-10°C)	25 391 667
	P 66 (-12°C)	16 512 288
	P 66 (-14°C)	20 238 759
Razem		166 987 057

Tabela 2

Table 2

Typ regulacji w eksperymencie RNAseq, odczyty sekwencji oraz adnotacja funkcjonalna fragmentów DEG.

Type of regulation in the RNAseq experiment, sequence and functional annotation of DEG fragments.

Identyfikator genu/regulacja w badanym układzie porównawczym Gene ID/ type of gene regulation observed in comparable layout	Sekwencja Sequence	Adnotacja funkcjonalna Functional gene annotation
<i>MDP0000883315</i> <i>Up-M.9K vs. M.9 -10</i>	ATTCACATTCCCATTCCCATTCCCCTCCCATTCCCC- GACGTTTCTCCTCCACAACGGC TTCAGCGACGAGGTCGATGTCTCTGACATCGAGATGATCAC- GATCCAGACCGTCACCGGA AAGGTTGTCATTGGGATGGATGTTGCTGCCT	Białko transmembranowe, transportujące jony potasu, komponent błony komórkowej.
<i>MDP0000254705</i> <i>Down-M.9K vs. M.9 -10</i>	CATTCCCATTCCCATTCCCCTCCCATTCCCCGACTCGTTTC- TCTCCACAACGGCTTCA GCGACGAGGTCGATGTCTCTGACATCGAGATGATCACGATC- CAGACCGTCACCTACACCA GCCTCAGGGACCTCCTCCCGCCGTCGCCGAGCCATCGATC- TCGC	Białko proliferacji komórek o właściwościach czynnika wzrostowego.
<i>MDP0000208730</i> <i>Up-M.9K vs. M.9-12</i>	CATTCCCATTCCCATTCCCCTCCCATTCCCCGACTTCTCC- TCCACAACGGCTTCCAGC GACGAGGTCGATGTCTCTGACATCGAGATGATCACGATCCA- GACCGTCACCTACACCAGC	Białko wiążące jony wapnia Ca ²⁺ (kalmodulina), regulujące procesy sekrecji.
<i>MDP0000310262</i> <i>DownM.9K vs. M.9-12</i>	CCACAACGGCTTCAGCGACGAGGTCGATGTCTCTGACATC- GAGATGATCACGATCCAGAC CGTCACCTACACCAGCCTCACGGACTCCTCCGGCGTCGCC- GCAGCCATCGATCATGTCA CCGATTCACAATTCCAGCTGGCACACGACGAGACTTTCCGA- TAAAGAAACCC	Esteraza biorąca udział w hy- drolizie estrów zawierających domenę SGNH.
<i>MDP0000195260</i> <i>Down-M.9 K vs M.9 -14</i>	CCACAACGGCTTCAGCGACGAGGTCGATGTCTCTGACATC- GAGATGATCACGATCCAGAC CGTCACCTACACCAGCCTCAGGGACCTCCTCCCGCGTCGCC- GCAGCCATCGATCATGTCA CCGATTCACAATTCCAGC	Białko wiążące jony cynku, biorące udział w regulacji odporności na choroby.
<i>MDP0000920400</i> <i>Up- M.9 K vs M.9 -14</i>	CGTTTCTCCTCCACAACGGCTTCAGCGACGAGGTCGATGTC- TCTGACATCGAGATGATCA CGATCCAGACCGTCACCTACACCAGCCTCAGGGACCTCCTCC	Białko sekrecyjne, aktywowane w tkankach zranionych.
<i>MDP00007527209</i> <i>Down-P66K vs P 66 -10</i>	AGGAATGGAAGTGGCTGTGGTGCATGCTACCAGGTGAGGTG- CAAGATCCCTCAGCATTGC AGCAGTGTGGGGTAACTACGGTGGTGACAGACCACGGC- GAAGGCGACAAGAACTGAACT TCATCTTCAGCCCAAGATCTTATGCAAAGTGGACAAACAC	Białko wiążące jony cynku.
<i>MDP0000301184</i> <i>Up-P 66K vs P 66 -10</i>	ACATGGAGTTTTTCTTAAGCACATAACTTGGTTTCTTTGTAT- CACGGTACTCTTGCCCTG CTCTATGTACCTCTCAATACACATATGTATCCTCTAGAGCA- ACATATTATGGTAGCCAG ATTGCTACGGGAACCCAACTGGAGCTTGTGGGTTTGGAGA- ATATGG	Białko integrujące błonę komórkową.

Tabela 2 cd.

Table 2 cd.

Typ regulacji w eksperymencie RNAseq, odczyty sekwencji oraz adnotacja funkcjonalna fragmentów DEG.

Type of regulation in the RNAseq experiment, sequence and functional annotation of DEG fragments.

Identyfikator genu/regulacja w badanym układzie porównawczym Gene ID/ type of gene regulation observed in comparable layout	Sekwencja Sequence	Adnotacja funkcjonalna Functional gene annotation
<i>MDP0000165364</i> <i>Down-P66 vs P66 -12</i>	TTAAGCACATAACTTGGTTTCTTTGTATCACGGTACTCTTGCC-TGCTCTATGTACCTCTC AATACACATATGTATCCTCTAGAGCAACATATTATGGTAGCC-CAGATTGCTACGGGAACC CAACTGGAGCTTGTGGGTTTGGAGAATATGGCTC	Białko strukturalne błony komórkowej.
<i>MDP0000392485</i> <i>Up-P66 vs P66 -12</i>	ACAGCGATCGTTGGAGGAAGATTTCAAGATCATGGTTGCA-ATCAGCCTTTAATGTGGTTT GCGGTAGTCATTTTTTATGCTCGTCGATGTGTATGGTTGG-CATGTATATTCTGGCTATC CTATGTTCCACTCTTGGCCGTTCTGGTTCTAGGAGCCAAACT	Białko o aktywności liazy, katalizuje cięcie wiązań węglowych (C-C, C-O, C-N).
<i>MDP0000948602</i> <i>Down-P 66 K cs P66 -14</i>	AGACTCATATTCTGACACAGGAACAACGGGAAATCAGTGCC-CAGTTCTTGAAACAACCC TATGGAATCACATTCCCGGAAAAACCCAGATGGCCGGTT-TCTTCCGATGGCCGGGTCTC CACCGATTTCTTGTCTAGGTTTATAGGAGTGAAGTCTCC	Czynnik transkrypcyjny, regulujący procesy zależne od DNA.
<i>MDP0000575908</i> <i>Down-P 66 K cs P66 -14</i>	AGACCATCCTTCACTCAAAAACGACGCTGTCGGGGTGTCTGT-TAGGGTCGCCCCGAGATTGA GTCAGCACCCGCGCTGCTTAAAGCCCTACTCGACTGCGC-CAGGCTCACCGAGTCGGACAC CGACCGCGCCGTCAAATCACTGATTCGACTCAGGGATC-GATCTCAGACCACGGAGATC	Białko strukturalne błony komórkowej.
<i>MDP0000127750</i> <i>Up-M.9 K vs M.9 -14</i>	TCACTCAAAAACGACGCTGTCGGGGTGTCTGTTAGGGTC-GCCCCGAGATTGAGTCAGCACC GCCGCTGCTTAAAGCCCTACTCGACTGCGCCAGGCTCACC-GAGTCGGACACCGACGCGCC GTCAAATCACTGATTCGACTCAGGGAATCGATCTCAGAC-CACGGAGATCCAACCC	Czynnik transkrypcyjny.
<i>MDP0000228546</i> <i>Up-M.9 vs M. -14</i>	TATGCTGCTTTCGACACTACACCATGTTGTATGGCCAAAGAG-TGGATGGTATGCAGTTCC CTTGACAAGCCTAATAGAAGTTTCACAGGTGAAGAAAGCG-TATCAGAAAAGCAAGGCTGTC GCCTCCAACCCA	Białko strukturalne błony komórkowej.
<i>MDP0000695032</i> <i>Down P 66 K vs. P 66 -14</i>	AATCCAACATTCGTATGCTGCTTTCGACACTACACCATGTTG-TATGGCCAAAGAGTGGAT GGTATGCAGTTCCCTTGACAAGCCTAATAGAAGTTTCACAGGTGAAGAAAGCGTATCAGA AAGCAAGGCTGTGCCTCCACCCA	Białko o aktywności kinazy serynowo-treoninowej, fosforylujące reszty aminokwasowe w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne.

Adnotacje funkcjonalne przeprowadzono dla 4 000 genów wykazujących indukcję (*up regulation*) oraz 4000 genów podlegających inhibicji (*down regulation*) w badanych układach porównawczych eksperymentu RNAseq. Dla poszczególnych sekwencji identyfikatory GO (*gene ontology*) przypisano na podstawie pliku (gff) z opisem genów wyłonionych dla genomu *Malus domestica*.

Zestawiono pliki wynikowe zawierające: identyfikator genu *Malus domestica*, surowe dane dotyczące ilości zmapowanych do genu odczytów, estymowaną przez program DEseq2 zmianę krotności ekspresji (*fold change*) w pierwszej próbce względem drugiej próbki (skala logarytmiczna), wartość (p) wykonanego przez program DEseq2 testu statystycznego, *contig* (pokrycie) z referencyjnym genomem *Malus domestica*, w którym zawiera się dany gen, współrzędne początku i końca odczytu genu w *contigu* oraz terminy GO (*gene ontology terms*) związane z danymi dotyczącymi przewidzianej funkcji genu.

Ocena profili ekspresyjnych genów wytypowanych poprzez analizę NGS:

Do amplifikacji fragmentów dscDNA użyto łącznie 15 par oligonukleotydów zaprojektowanych w badaniach własnych (Tab. 3) do sekwencji genów wytypowanych na podstawie odczytów sekwencji

zawartych w tabeli 2.

Dla 9 z badanych genów zaobserwowano różnicowane profile ekspresji w badanych materiale roślinnym.

W przypadku podkładki M.9 cztery wytypowane sekwencje genów o zdefiniowanej adnotacji: MD883315 (wykres 1b), MD7527209 (wykres 1e), MD228546 (-12°C) (wykres 1g) i MD392485 (-14°C) (wykres 1d) wykazały wzrost, a trzy: MD127750 (-14°C) (wykres 1a), MD575908 (-10°C) (wykres 1i) oraz MD301184 (-10°C) (wykres 1h) spadek poziomu transkryptu.

Dla podkładki P 66, wzrost poziomu transkryptu odnotowano w przypadku czterech DEG: MD883315, MD392485, MD165364 (dla prób traktowanych temp. -10°C) (wykresy 1b, d-f) i MD920400 (dla prób traktowanych temp. -12°C) (wykres 1c), natomiast cztery spośród badanych genów: MD127750, MD7527209, MD301184 (dla prób traktowanych temp. -10°C) i MD165364 (dla prób traktowanych -12°C) ulegały inhibicji (wykresy 1a, e, h, f).

Ponadto trzy z wytypowanych sekwencji genów: MD920400, MD163564 i MD7527209 (wykresy 1c, f, e.) ulegały nadekspresji, a jeden inhibicji (MD575908, wykres 1i) w genomach obu analizowanych podkładek. W przypadku pozostałych wytypowanych genów nie obserwowano zmian w profilach ekspresyjnych.

Tabela 3
Table 3

Sekwencje zaprojektowanych oligonukleotydów (qRT-PCR).

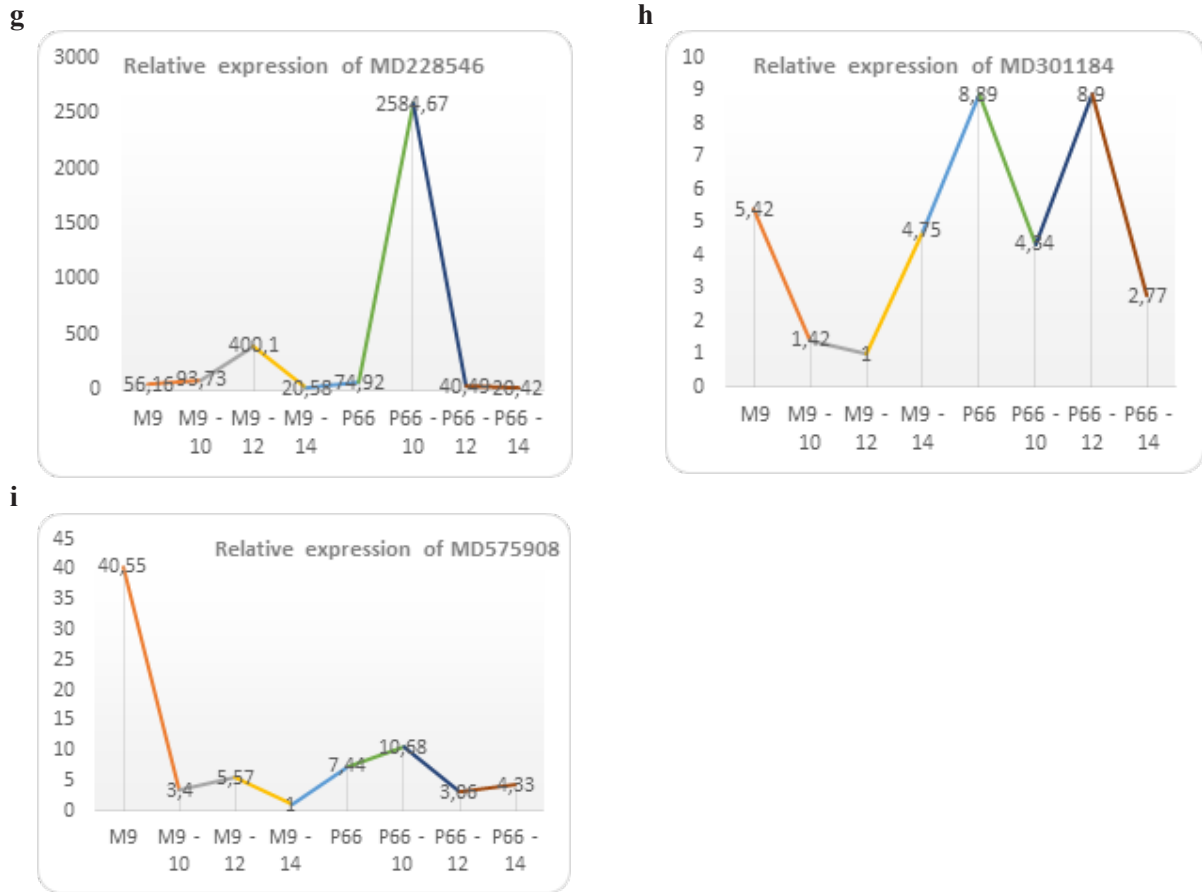
Sequences of designed oligonucleotides (qRT-PCR).

Identyfikator genu/ EST	SEKWENCJA 5' Sequence of Oligos 5'	SEKWENCJA 3' Sequence of Oligos 3'
ID of the gene/ EST		
<i>PAL (gen ref.)</i>	<i>tatcgaccaatttctgggtg</i>	<i>atgcagcatgtaaacctga</i>
<i>MD883315</i>	<i>tcattccattccattcc</i>	<i>catccateccaatgacaacct</i>
<i>MD254705</i>	<i>cattccattccattccca</i>	<i>aggaggtccctgagget</i>
<i>MD208730</i>	<i>cccattccactccattc</i>	<i>tgtaggtgacggtctggat</i>
<i>MD310262</i>	<i>cacaacggctcagega</i>	<i>ctttateggaaagtctctcgt</i>
<i>MD195260</i>	<i>cacaacggctcagega</i>	<i>gctggaattgtgaatcggtga</i>
<i>MD920400</i>	<i>ctctccacaacggcttc</i>	<i>aggaggtccctgaggct</i>
<i>MD7527209</i>	<i>aggaatggaactggctgtg</i>	<i>gtgtttgtccactttgcat</i>
<i>MD301184</i>	<i>ttccttaagcacataactggtttc</i>	<i>aaaccacaaagetccagtt</i>
<i>MD165364</i>	<i>tggttctttgtatcacgtact</i>	<i>catatttccaaaccacaagc</i>
<i>MD392485</i>	<i>gcgatcgttgaggaagatt</i>	<i>tttggctcctagaaccagaac</i>
<i>MD948602</i>	<i>agactcataltctgacacaggaac</i>	<i>gagacttcactctataaacctagc</i>
<i>MD575908</i>	<i>ttagggtcggccgagatt</i>	<i>ctcgggtgctgagatcg</i>
<i>MD127750</i>	<i>ttagggtcggccgagatt</i>	<i>ttggatctccgtggtctga</i>
<i>MD228546</i>	<i>atgctgtttgacactaca</i>	<i>tgggttgaggcgacag</i>
<i>MD695032</i>	<i>ccaacattcgtatgctgcttc</i>	<i>gtggaggcacagccttg</i>

Wykresy 1 a-i. Zmiany w poziomie ekspresji genów wytypowanych na podstawie eksperymentu RNA-seq.

Figures 1 a-i. Changes in the level of expression of the selected genes are based on the RNA-seq experiment.





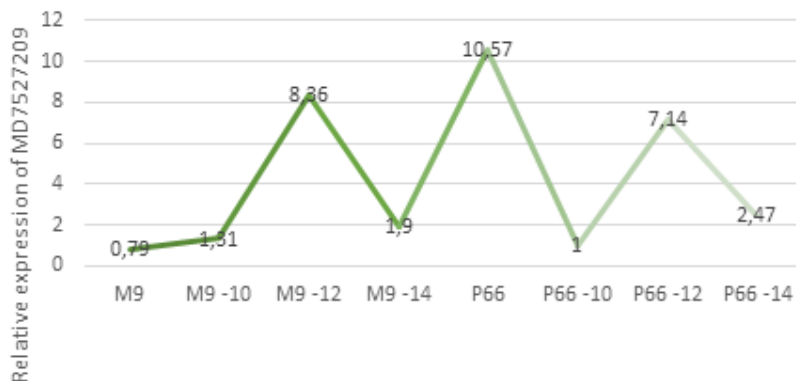
Weryfikacja poziomu transkryptów genów wytypowanych na podstawie eksperymentu RNA-seq poprzez analizę porównawczą wyników uzyskanych metodą qRT-PCR

Na podstawie analiz przeprowadzonych w oparciu o pomiary ekspresji wytypowanych sekwencji przeprowadzono weryfikację przypuszczalnych markerów mrozoodporności.

Spośród sekwencji transkryptomu, dla których testem qRT-PCR określono profil ekspresji

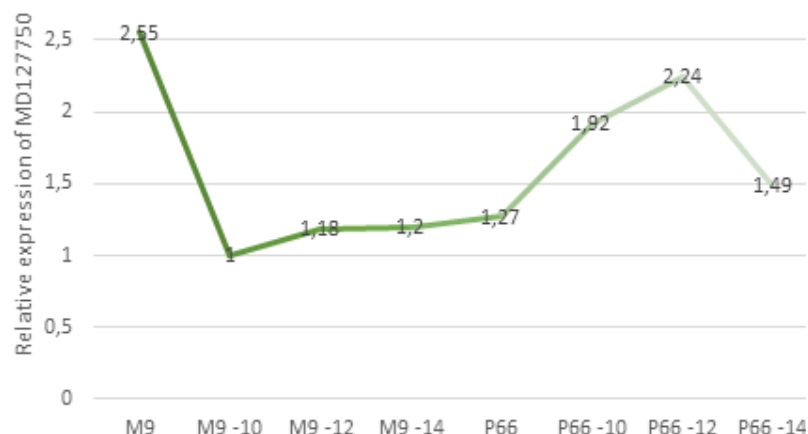
w podkładkach wzorcowych, trzy reprezentowały identyczny typ regulacji jak w badanych układach eksperymentalnych testu RNA-seq.

Spadek poziomu transkryptu (typ regulacji down) w obu przeprowadzonych testach, wywołany zastosowaniem niskiej temperatury, zaobserwowano dla genów: MD7527209 (wykres 3) (podkładka P 66), MD575908 (wykres 5) (podkładka P 66), MD127750 (wykres 4) (podkładka M.9).



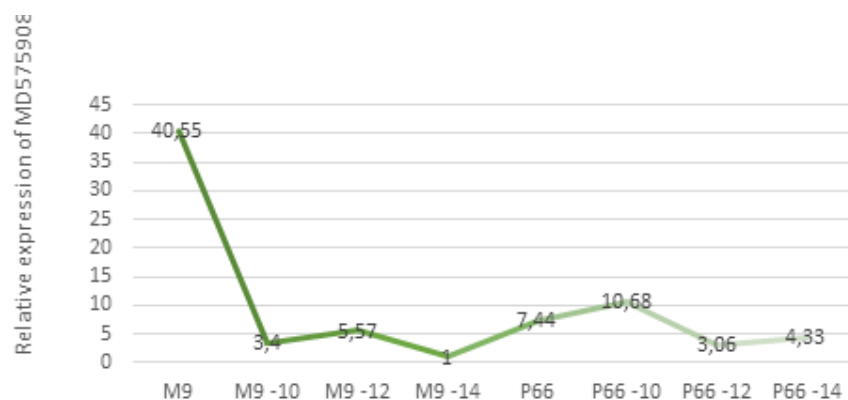
Wykres 2. Profil ekspresji genu MD7527209 uzyskany metodą qRT-PCR. Strzałkami wskazano typ regulacji (*down-regulation*) genu w układzie eksperymentalnym prób porównanych po analizie transkryptomu podkładek jabłoni (P66 vs. P66 -10°C, tabela 2).

Figure 2. Expression profile of MD7527209 gene obtained by qRT-PCR method. The arrows indicate the type of down regulation of the gene in the experimental setup of samples compared after transcriptome analysis of apple rootstocks (P66 vs. P66 -10°C, Table 2).



Wykres 3. Profil ekspresji genu MD254705 uzyskany metodą qRT-PCR. Strzałkami wskazano typ regulacji (*down regulation*) genu w układzie eksperymentalnym prób porównanych po analizie transkryptomu podkładek jabłoni (M.9 vs. M.9 -10°C. tabela 2).

Figure 3. Expression profile of MD254705 gene obtained by qRT-PCR method. The arrows indicate the type of down regulation of the gene in an experimental set of samples compared after transcriptome analysis of apple rootstocks (M.9 vs. M.9 -10°C. Table 2).



Wykres 4. Profil ekspresji genu MD575908 uzyskany metodą qRT-PCR. Strzałkami wskazano typ regulacji (*down regulation*) genu w układzie eksperymentalnym prób porównanych po analizie transkryptomu podkładek jabłoni (P66 vs. P66 -12°C).

Figure 4. Expression profile of MD575908 gene obtained by qRT-PCR method. The arrows indicate the type of down regulation of the gene in an experimental set of samples compared after transcriptome analysis of apple rootstocks (P66 vs. P66 -12°C).

Dyskusja

Mechanizm tolerancji roślin sadowniczych na mróz jest regulowany przez wiele genów i nie został dotychczas w pełni rozpoznany, a molekularna ocena zmian zachodzących w genomie roślinnym pod wpływem czynnika stresu, jest trudna (Lub. 1991). Autorzy zwracają uwagę na fakt, że poziom ekspresji genów zależy m.in. od genotypu, sposobu uprawy oraz warunków zewnętrznych/klimatycznych (Girardi i in. 2013). Ponadto Kalberer i współpracownicy (2006) zaobserwowali, że temperatura może regulować procesy mrozoodporności w różny sposób zarówno w roślinach aklimatyzowanych jak i nieaklimatyzowanych.

Obecnie rozpoznanych jest zaledwie kilka grup genów, które regulują te procesy w roślinach modelowych tj: rzodkiewnik (*Arabidopsis thaliana*), pomidor (*Lycopersicon* Mill.) oraz w niektórych gatunkach roślin sadowniczych jak brzoskwinia (*Prunus persica*), truskawka (*Fragaria x ananasa* Duch) i jabłoń (*Malus domestica* Borkh.) (Medina i in. 1999, 2011; Thomashow 1998; Chinnusamy i in. 2006). Są to geny z grupy: dehydryn (Takata i in. 2007, Artlip i in. 1997), geny CBF (*C-repeat Binding Factor*) (Wisniewski i in. 2007, 2011, Gilmour i in. 1998), geny z grupy *MADS box* i *DREB* (Du i in. 2008) oraz geny COR (*Cold Regulated*) (Wisniewski i in. 2007, Zhao i in. 2012, Feng

i in. 2012). Ostatnie badania potwierdziły także wpływ genów z grupy ERF (ethylene response factors: AP2 / ERF-uczestniczą w szlaku produkcji etylenu), w regulacji tolerancji roślin na mróz (Girardi i in. 2013).

Z uwagi na bardzo złożony i słabo rozpoznany mechanizm mrozoodporności roślin sadowniczych w niniejszych badaniach zastosowano bardzo czułe techniki oparte na analizie funkcjonalnej sekwencji transkryptomu podkładek ekstremalnie reagujących na stres niskich temperatur.

W przeprowadzonych badaniach analizie poddano materiał genetyczny dwóch podkładek jabłoni: M.9 wrażliwej, powszechnie stosowanej w polskich sadach produkcyjnych oraz P 66 charakteryzującej się wysokim stopniem tolerancji na działanie ujemnych temperatur. W prowadzonych doświadczeniach polowych potwierdzono również, że podkładka M.9 znacznie silniej reaguje na stres niskich temperatur niż np.: podkładki P 2, P 16, P 66 czy Antonówka (Quamm. 1990, Callesse. 1996). Tak zróżnicowany materiał pozwolił na prawidłową weryfikację uzyskanych odczytów sekwencji ich transkryptów.

Istotnym elementem w planowaniu tego typu prac jest znajomość/dostępność sekwencji genomu badanego gatunku. Jak wiadomo z dotychczasowych prac prowadzonych w tym zakresie, wielkość oszacowanego genomu referencyjnego jabłoni (diploid, $2n=2x=34$) opracowanego dla odmiany 'Golden Delicious' wynosi 742,3 Mb (Velasco i in. 2010). Wiedza ta stanowiła podstawę prowadzenia badań, polegających na porównaniu sekwencji transkryptów względem bazy sekwencji genomowej gatunku *Malus*, podjętych przez Girardi i in. (2013) oraz Bai (2014), co pozwoliło na zdefiniowanie prawie 60 tys. genów funkcjonalnych, aktywowanych lub inhibowanych w genomach odmian 'Royal Gala' i 'Golden Delicious' (Wisniewski i in. 2008, Girardi i in. 2013, Bai i in. 2014).

Ponadto dzięki zastosowaniu różnorodnych dostępnych platform, takich jak Illumina Solexa, 454 Roche czy ABI-Solid, (Kumar i Blaxte. 2010) dotychczas opracowano i zdefiniowano ponad 800 milionów par zasad genomu *Malus* (Velasco i in. 2010). Niemniej jednak zastosowanie metody sekwencjonowania *de novo* (bez znajomości genu referencyjnego), także umożliwiło odczytanie ponad 71 tysięcy nowych genów funkcjonalnych/transkryptów o zróżnicowanej ekspresji w genomie tego gatunku (Imelfort i Edward. 2009, X. 2010, Edwards i Batle. 2010, Bai i in. 2014).

Jak podają autorzy, przed sekwencjonowaniem całych genomów, fragmenty o wysokiej masie

cząsteczkowej DNA (cząsteczka DNA z kilku Mb rozdrobnione są na małe kawałki (500 bp do 135 Kbp) i użyte do konstruowania genomowych bibliotek. Xu (2010) przy zastosowaniu metody Illumina dla genomu *Malus* uzyskał 39,2 milionów odczytów sekwencji takich bibliotek, co stanowi ok. 13 miliarda nowo wygenerowanych i zsekwencjonowanych nukleotydów. Analiza bioinformatyczna i złożenie 39,2 milionów odczytów doprowadziło do sporządzenia 122 146 kontigów sumarycznych o długości 604 Mb, które można poddawać adnotowaniu (Xu. 2010). Należy zwrócić uwagę, że ilość sekwencji uzyskana w przeprowadzonych badaniach wyniosła ponad 500 tys. zróżnicowanych transkryptów o rozpoznanej funkcji biologicznej, co znacznie wzbogaca bazę sekwencyjną transkryptomu badanych dwóch podkładek jabłoni. Technologia NGS, zastosowana w opisanych badaniach, umożliwiła wyłonienie genów kodujących m.in. białka strukturalne błony komórkowej, białka integralne błony komórkowej oraz czynniki transkrypcyjne. Z dotychczasowych badań wiadomo, że grupy właśnie tych genów są bardzo silnie zaangażowane w regulację odporności na niskie, ujemne temperatury u roślin drzewiastych i jako pierwsze ulegają aktywacji pod wpływem stresu (Orvar i in. 2000).

Pomimo wysokiej czułości metody RNAseq pozwalającej na ujawnienie specyficznego zestawu genów, indywidualne pomiary ekspresji techniką NGS i qPCR bywają niespójne (Everaert i in. (//)). Niski stopień korelacji (zaledwie kilka%) ekspresji genów zidentyfikowanych metodą qRT-PCR i RNAseq zaobserwowano również w niniejszych badaniach, jednak brak precyzyjnych doniesień w tym zakresie. Przeprowadzona weryfikacja wytypowanych sekwencji o zróżnicowanej ekspresji w podkładkach ekstremalnie reagujących na działanie niskich temperatur umożliwiła wybór trzech (z dziewięciu przeanalizowanych) genów o identyfikatorach: MD7527209, MD127750, MD575908, dla których zweryfikowano stabilny typ regulacji.

Ze względu na potrzebę ukierunkowania hodowli na wytwarzanie podkładek dpornych na mróz, uzyskane wyniki poszerzają wiedzę dotyczącą regulacji mechanizmu ich tolerancji na poziomie molekularnym, a tym samym mogą istotnie wspierać prace genetyczno-hodowlane w tym zakresie.

Ponadto utworzona baza sekwencyjna stanowić będzie podstawę do sporządzenia markerów molekularnych, w przyszłości wykorzystanych do wczesnej selekcji pożądanych genotypów podkładek jabłoni.

Wnioski

1. Dla badanych podkładek zaobserwowano zróżnicowane profile ekspresji badanych genów.
2. Fragmenty trzech genów (wytypowane z eksperymentu RNA-seq) stanowią potencjalne sekwencje kandydujące do sporządzenia markerów funkcjonalnych, umożliwiając monitorowanie tolerancji podkładek jabłoni na niskie temperatury.

Badania finansowano ze środków projektu MRiRW: Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, decyzja HOR.hn.802.4.2019 z dnia 14.05.2019 r. Zadanie nr 73.

Literatura

- Artlip, T. S., Callahan, A.M., Bassett, C.L., Wisniewski, M.E. (1997). Seasonal expression of a dehydrin in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Plant Molecular Biology*, 33: 61–70.
- Aygun, A. (2005). The late spring frost hardiness of some apple varieties at various stage of flower buds. *Tarim Bilimeri Degrisi*, 11 (3): 283–285.
- Bai Y, Dougherty, L., Xu, K. (2014). Towards an improved apple reference transcriptome using RNA-seq. *Mol. Genet Genomics*, 289: 427–438.
- Callesen, O. (1996). Testing 20 apple rootstocks. VI Inter. Symposium on Integrated Canopy, Rootstock, Environmental Physiol.in Orchard Systems. *Acta Hort.*, 451: 137–146.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J. K. (2006). Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiol. Plant.*, 126: 52–61. DOI: 10.1111/j.1399–3054.2006.00596.
- Du, X., Xiao, Q., Zhao, R., Wu, F., Xu, Q., Chong, K., Meng, Z. (2008). *TrMADS3*, a New Mad-box gene, from a perennial species *Taihangiarupestris* is upregulated by cold and experiences seasonal fluctuation in expression level. *Dev. Genes Evol.*, 218: 281–292.
- Edwards, D., Batley, J. (2010). Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 8 (10): 2–9.
- Feng M-X., Zhao, Q., Zhao L-L., Qiao, Y., Xie X-B., Li H-F., Yao Y-X., You C-X., Hao Y-J. (2012). The cold-induced basis helix-loop-helix transcription factor gene *MdCl-bHLHI* encodes an ICE-like protein in apple. *Plant Biology*, 12: 22.
- Gilmour, S. J., Zarka, D.G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton J. M., Thomashow, M. F. (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold induced COR gene expression. *The Plant Journal*, 16: 433–442. DOI: 10.1046/j.1365–313x.1998.00310.
- Girardi, C. L., Rombaldi, C. V., Cero, J. D., Nobile, P. M., Laurens, F., Bouzayen, M., Quecini, V. (2013). Genome-wide analysis of the AP2/ERF superfamily in apple and transcriptional evidence of ERF involvement in scab pathogenesis. *Scientia Horticulturae*, 151: 112–121.
- Everaert C, Luybaert M, Maag, J. L. V., Cheng, Quek Xiu, Marcel, E. (2017). Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using wholetranscriptomeRT-qPCR expression. *Nature*: 7. 1559. DOI: 10.1038/s41598–017–01617–3
- Imelfort, M., Edwards, D. (2009). De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies. *Briefings in Bioinformatics*, 10 (6): 609–618.
- Kalberer, S., Wisniewski, M., Arora, R. (2006). Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: Current understanding and emerging concepts. *Plant Science*, 171: 3–16.
- Kumar, S., Blaxter M. L. (2010). Comparing *de novo* assemblers for 454 transcriptome data. *BMC Genomics*, 11: 571.
- Luby, J. J. (1991). Breeding cold-hardy fruit crops in Minnesota. *HortSci.*, 26: 507–512.
- Medina, J., Bagues, M., Terol, J., Perez-Alonso, M., Salinas, J. (1999). The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiol.*, 119: 463–469.
- Medina, J., Catalá, R., Salinas, J. (2011). The CBFs: Three *Arabidopsis* transcription factors to cold acclimate. *Plant Science*, 180: 3–11.
- Orvar Bjorn, L., Sangwan, V., Omann, F., Dhirdsa, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin, cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal*, 23 (6): 785–794.
- Quamme, H.A. (1990). Cold hardiness of apple rootstocks. *Com.Fruit Tree*, 23: 11–16.
- Takata, N., Kasuga, J., Takezawa, D., Arakawa, K., Fujikawa, S. (2007). Gene expression associated with increased supercooling capability in xylem parenchyma cells of larch (*Larix kaempferi*). *Journal of Experimental Botany*, 58 (13): 3731–3742.
- Thomashow, M. F. (1998). Role of Cold-Responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.*, 118: 1–7. DOI: org/10.1104/pp.118.1.1.
- 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., Niazi, 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., Vecchietti, 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 x domestica* Borkh.). *Nature Genetics*, 42 (10): 833–841.
- Wisniewski, M., Bassett, C., Gusta, V. L. (2003). An overview of cold hardiness in woody plants: Seeing the forest through the trees. *HortScience*, 38 (5): 952–959.
- Wisniewski, M., Bassett, C., Norelli, J., Artlip, T. (2007). Using biotechnology to improve resistance to environmental stress in fruit crops: The importance of understanding physiology. *Acta Hort.*, 738: 145–156.
- Wiśniewski, M., Bassett, C., Norelli, J., Macarisisn, D., Artlip, T., Gasic, K., Korban, S. (2008). Expressed sequence tag analysis of the response of apple (*Malus x domestica* 'Royal Gala') to low temperature and water deficit. *Physiologia Plantarum*, 133: 298–317.
- Wisniewski, M., Norelli, J., Bassett, C., Artlip, T., Macarisin, D. (2011). Ectopic expression of novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus x domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. *Planta*, 233 (5): 971–983.
- Xu. (2010). The Apple genome: A delicious promise. *New York Fruit Quarterly*, 18 (4): 11–14
- Zeng, Ying, Yang, Tao (2002): RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 417–417
- Zhao, T., Liang, D., Wang, P., Liu, J., Ma F. (2012). Genome-wide analysis and expression profiling of the DREB transcription factor gene family in *Malus* under abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics*, 287: 423–436.