

# Sprawozdanie merytoryczne z wykonania zadania nr 35: „Identyfikacja genów związanych z ekspresją zimotrwałości i tolerancji suszy u form introgresywnych *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea*”, w roku 2019.

Arkadiusz Kosmala, Adam Augustyniak, Dawid Perlikowski, Włodzimierz Zwierzykowski, Eugeniusz Paszkowski

## Wprowadzenie

Trawy pastewne, a pośród nich kostrzewy (*Festuca*) i życice (*Lolium*) są doskonałymi gatunkami do badań molekularnej kontroli cech związanych z tolerancją stresów środowiskowych. *Lolium multiflorum* Lam. (życica wielokwiatowa) to gatunek trawy o wysokiej jakości paszowej, lecz niskiej tolerancji stresów abiotycznych i biotycznych. Z kolei *F. pratensis* Huds. (kostrzewa łąkowa) i *F. arundinacea* Schreb. (kostrzewa trzcinowa) – charakteryzują się wysokim stopniem odporności na patogeny oraz tolerancji mrozu, suszy i wysokiego zasolenia. Gatunki *Lolium* i *Festuca* krzyżują się ze sobą. Stwarza to możliwość przeniesienia korzystnych cech z gatunków jednego rodzaju do gatunków drugiego rodzaju na drodze krzyżowania. Alloheksaploidalny gatunek *F. arundinacea* wykorzystywany jest głównie jako źródło genów tolerancji suszy. *Festuca pratensis* jest z kolei gatunkiem wykorzystywanym jako źródło genów tolerancji mrozu. Wykazano również, że dzięki obecności sub-genomu kostrzewy łąkowej w genomie kostrzewy trzcinowej, ten drugi gatunek może być także doskonałym źródłem genów odpowiedzialnych za zimotrwałość, w tym mrozoodporność. W niniejszym zadaniu badawczym prowadzone są prace zmierzające do selekcji genotypów, które wykazują stosunkowo wysoki poziom tolerancji sekwencji stresów susza/zima i odporności na podstawowe choroby oraz do wyznaczenia fizjologicznych i molekularnych wskaźników tolerancji/odporności na analizowane stesy abiotyczne i biotyczne.

## Cel, materiał badawczy i metodyka badań

### Cel badań:

- Ocena stopnia przetrwania form introgresywnych BC<sub>6</sub> *L. multiflorum*/*F. arundinacea* w eksperymencie ‘pod daszkami’ (przeprowadzenie testu na zimotrwałość).
- Analiza fizjologicznych parametrów związanych z tolerancją suszy (relatywna zawartość wody, zawartość wody, wyciek elektrolitów, fluorescencja chlorofilu) u wyselekcjonowanych form introgresywnych BC<sub>6</sub> w symulowanych warunkach fitotronowych.
- Analiza fizjologicznych parametrów związanych z tolerancją niskiej temperatury, w tym mrozu (wyciek elektrolitów) u wyselekcjonowanych form introgresywnych BC<sub>6</sub> w symulowanych warunkach fitotronowych.
- Przygotowanie do analizy ekspresji genów *Wcor80* i *cor14b* w warunkach hartowania na mróz (izolacja RNA i odwrotna transkrypcja) u wyselekcjonowanych form introgresywnych BC<sub>6</sub>.

### Materiał badawczy do realizacji celu nr 1

Testy zimotrwałości prowadzono na następujących populacjach:

Formy introgresywne BC<sub>6</sub> 185/4  
Formy introgresywne BC<sub>6</sub> 185/6  
Formy introgresywne BC<sub>6</sub> 185/10  
Formy introgresywne BC<sub>6</sub> 185/12  
*L. multiflorum* odm. Atos

W sumie testom zimotrwałości poddano 792 obiektów roślinnych. Testy prowadzono w 1 lokalizacji.

### Materiał badawczy do realizacji celu nr 2, 3 i 4

Do prac fizjologiczno-molekularnych wykorzystano dwie formy introgresywne z populacji BC<sub>6</sub>185/4:

- formę introgresywną 185/4/28 – o stosunkowo najwyższym poziomie tolerancji stresów środowiskowych (zima i susza).

- formę introgresywną 185/4/49 – o stosunkowo najniższym poziomie tolerancji stresów środowiskowych (zima i susza).

#### Metodyka badań:

Oceny zimotrwałości dokonano na podstawie: (i) oszacowania suchej i mokrej masy roślin, które przetrzymały, wyrażonej w [g], (ii) potencjału odrostu roślin, które przetrzymały, w skali [0-9; 9 – ocena najwyższa].

Analiza fizjologicznych markerów tolerancji suszy prowadzona była w symulowanych warunkach laboratoryjnych. Genotypy poddano działaniu krótkotrwałej suszy (11 dni) w doniczkach w warunkach laboratoryjnych. W trakcie prowadzenia eksperymentu wykonano następujące pomiary fizjologiczne: zawartość wody (WC), relatywna zawartość wody (RWC), wyciek elektrolitów (EL) oraz fluorescencja chlorofilu, bazując na materiale roślinnym w postaci liści. Parametry fizjologiczne analizowano w warunkach kontrolnych i 11 dniu suszy oraz w 10 dni po rozpoczęciu nawadniania.

Analiza fizjologicznych markerów tolerancji mrozu prowadzona była w symulowanych warunkach fitotronowych. Każdą formę introgresywną poddano pre-hartowaniu (7 dni), a następnie hartowaniu (21 dni). Badanie uszkodzeń błon komórkowych u dwóch wyselekcjonowanych genotypów polegało na konduktometrycznym pomiarze wycieku elektrolitów z uszkodzonych tkanek liści po mrożeniu, po różnym czasie hartowania roślin w niskiej temperaturze. Wyznaczono wartość  $T_{EL50}$  (temperatura powodująca 50% wyciek elektrolitów) dla każdego badanego momentu hartowania.

Izolację RNA i odwrotną transkrypcję prowadzono przy wykorzystaniu komercyjnych zestawów do prac molekularnych, m.in. do izolacji RNA – RNeasy Plant Mini Kit/ Magnova Poli (dT)25 RNA magnetic particles, do odwrotnej transkrypcji – Transcriptor first Stand cDNA Synthesis Kit/ Verte Kit/ Verte MMLV.

### **Wyniki i wnioski**

1. Zaobserwowano duże różnice w plonowaniu po zimie dla poszczególnych populacji form introgresywnych. Średnie populacyjne dla wybranych parametrów plonowania w przypadku trzech populacji (185/4, 185/6 i 185/10) były wyższe, a w przypadku jednej populacji (185/12) niższe w odniesieniu do średnich populacyjnych dla form kontrolnych *L. multiflorum*.
2. Wyselekcjonowane do prac fizjologiczno-molekularnych dwie formy introgresywne cechowały się zróżnicowanym stopniem odporności na sekwencję stresów środowiskowych – forma 185/4/28 (wysoki stopień zimotrwałości i odporności na suszę); forma 185/4/49 (niski stopień zimotrwałości i odporności na suszę).
3. U obu wyselekcjonowanych form introgresywnych zaobserwowano istotny spadek uwodnienia tkanek liścia w warunkach suszy, na podstawie oznaczonych parametrów zawartości wody (WC) i relatywnej zawartości wody (RWC) w komórkach. Forma introgresywna 185/4/49 wykazała niższe wartości WC i RWC w 11 dniu suszy, w porównaniu do formy 185/4/28. Po powtórnym nawodnieniu, obie formy nie wykazywały różnic w analizowanych parametrach; natomiast zaobserwowano u nich istotny wzrost wartości WC i RWC, w odniesieniu do wartości w 11 dniu suszy. Badane formy introgresywne różniły się również większością parametrów fluorescencji chlorofilu w warunkach suszy, obrazujących poziom aktywności fotosystemu II. Parametry te osiągały niższe wartości u formy introgresywnej 185/4/49.
4. Wyselekcjonowane formy introgresywne charakteryzowały się stosunkowo niskim poziomem mrozoodporności, ale forma 185/4/28 była bardziej mrozoodporna. Efektywność hartowania na mróz była niewielka w przypadku obu form introgresywnych.
5. Uzyskane w projekcie pule cDNA (cel nr 4) zostaną wykorzystane w reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym, celem określenia ekspresji genów *Cor14b* i *Wcor80* w warunkach niskiej temperatury na poziomie transkryptu, w ostatnim roku trwania projektu.