

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 2020.

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 były 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:

1. Przygotowanie do analizy ekspresji genów *tip1-1* i *tip1-2* w warunkach suszy i ponownego nawodnienia (izolacja RNA i odwrotna transkrypcja) u wyselekcjonowanych form introgresywnych BC₆.
2. Analizy RT-PCR w czasie rzeczywistym dla wybranych punktów czasowych suszy i ponownego nawodnienia (geny *tip1-1* i *tip1-2*) oraz hartowania na mróz (geny *Wcor80* i *Cor14b*) u wyselekcjonowanych form introgresywnych BC₆.
3. Analizy Western blot dla wybranych punktów czasowych suszy i ponownego nawodnienia (białka *tip1-1* i *tip1-2*) oraz hartowania (białka *Wcor80* i *Cor14b*) u wyselekcjonowanych form introgresywnych BC₆.
4. Namnożenie materiału roślinnego – krzyżowanie (polikrosy) wyselekcjonowanych w 2019 r. form introgresywnych BC₆ o wysokim potencjale odporności na stesy środowiskowe (susza/zima).

Materiał badawczy do realizacji celu nr 1, 2 i 3

Prace prowadzono na dwóch wyselekcjonowanych w roku 2019 formach introgresywnych BC₆ *L. multiflorum*/*F. arundinacea*:

- formie introgresywnej 185/4/28 – o stosunkowo najwyższym poziomie tolerancji stresów środowiskowych (susza i zima).
- formie introgresywnej 185/4/49 – o stosunkowo najniższym poziomie tolerancji stresów środowiskowych (susza i zima).

Materiał badawczy do realizacji celu nr 4

W krzyżowaniu wykorzystano formy introgresywne BC₆ wyselekcjonowane w 2019 roku i charakteryzujące się wysokim stopniem odporności na stesy środowiskowe w układzie susza/zima. Formy te zostały zestawione w polikros. Krzyżowanie prowadzono w warunkach kontrolowanych. W krzyżowaniu wykorzystano 20 form introgresywnych.

Metodyka badań:

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.

Analizy RT-PCR w czasie rzeczywistym prowadzono przy wykorzystaniu termocyklera Bio-Rad CFX 96 (Biorad). Procedurę RT-PCR w czasie rzeczywistym opisano dodatkowo w pracy Pawłowicz i in. (2017). Analiza związana z profilowaniem akumulacji *tip 1-1*, *tip 1-2*, *Wcor80* i *Cor14b* obejmowała: (i) izolację i oczyszczanie białek; (ii) elektroforezę białek w żelu poliakryloamidowym (SDS-PAGE); (iii) elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową oraz (iv) reakcję białek ze specyficznymi przeciwciałami (Western blot).

Wyniki i wnioski

1. Uzyskano w sumie 180 próbek RNA, po 90 na genotyp, w tym po 30 próbek na każdy analizowany punkt czasowy eksperymentu. Jakość wyizolowanej puli RNA sprawdzono w żelu agarozowym. Stwierdzono, że zastosowane procedury zbioru tkanki i ekstrakcji RNA zapewniły uzyskanie dobrych jakościowo pul mRNA dla każdego analizowanego genotypu i punktu czasowego. Wszystkie próbki mRNA poddano odwrotnej transkrypcji i uzyskano całościowe pule cDNA.
2. W warunkach kontrolnych i w warunkach suszy poziom akumulacji transkryptu genu *tip 1-1* był wyższy u formy 185/4/49. Po powtórny nawodnieniu – u formy 185/4/28. Poziom transkryptu spadał u obu form introgresywnych w suszy. W warunkach kontrolnych i w warunkach suszy poziom akumulacji transkryptu genu *tip 1-2* był wyższy u formy 185/4/28. Po powtórny nawodnieniu – nie zaobserwowano różnic pomiędzy badanymi formami introgresywnymi. Poziom akumulacji transkryptu spadał u obu form introgresywnych w suszy.
3. W trakcie trwania hartowania na mróz (do 14 dnia) obserwowano wzrost poziomu akumulacji transkryptu genu *Cor14b* u formy 185/4/49. Jednak poziom tej akumulacji zarówno w kontroli, jak i w 14 dniu hartowania był wyższy u formy introgresywnej 185/4/28. Po 3 tygodniach hartowania, poziom akumulacji transkryptu genu *Cor14b* obniżył się u obu analizowanych form. W tych warunkach nie obserwowano również różnic pomiędzy badanymi formami. W 14 dniu hartowania na mróz obserwowano wzrost poziomu akumulacji transkryptu genu *Wcor80* u formy 185/4/49, a następnie spadek w 21 dniu. Poziom akumulacji transkryptu tego genu był wyższy u formy introgresywnej 185/4/49, zarówno w 14, jak i w 21 dniu hartowania. Forma introgresywna 185/4/28 wykazała natomiast stopniowy spadek poziomu akumulacji transkryptu genu *Wcor80* w trakcie hartowania na mróz. Nie obserwowano różnic w poziomie akumulacji transkryptu tego genu pomiędzy badanymi formami w warunkach kontrolnych. Wykazano, że profile relatywnej ekspresji genu *Cor14b* mogą być dobrym wskaźnikiem poziomu tolerancji niskiej temperatury u badanych form introgresywnych.
4. Poziom akumulacji białka *tip 1-1* wzrastał w warunkach suszy u obu analizowanych form introgresywnych. Poziom ten był wyższy w warunkach kontrolnych i w warunkach suszy u formy 185/4/28. Poziom akumulacji *tip 1-2* wzrastał w warunkach suszy również u obu analizowanych form introgresywnych. Poziom ten był wyższy w warunkach kontrolnych, w warunkach suszy i po ponownym nawodnieniu u formy 185/4/28. Wykazano, że profile akumulacji białek *tip 1-1* i *tip 1-2* mogą być dobrym wskaźnikiem poziomu tolerancji suszy u badanych form introgresywnych.
5. Poziom akumulacji białka *Cor14b* wzrósł w 21 dniu hartowania u formy introgresywnej 185/4/28. Poziom ten był istotnie wyższy u tej formy we wszystkich analizowanych punktach czasowych eksperymentu, w odniesieniu do formy 185/4/49. Z kolei poziom akumulacji *Wcor80* wzrósł w 14 dniu hartowania u formy introgresywnej 185/4/49 i był u niej istotnie wyższy w tym punkcie czasowym, w odniesieniu do formy 185/4/28. Wykazano, że profile akumulacji białka *Cor14b* mogą być dobrym wskaźnikiem poziomu tolerancji niskiej temperatury u badanych form introgresywnych.
6. W polikrosy zestawiono cztery grupy roślin – trzy grupy z populacji form introgresywnych 185/4 i jedną grupę z populacji 185/10. Były to populacje, w obrębie których w latach ubiegłych wyselekcjonowano najwięcej roślin o stosunkowo wysokim potencjale tolerancji stresów środowiskowych, w układzie susza/zima. Otrzymane formy introgresywne po selekcji pod kątem ich tolerancji suszy i zimotrwałości, stanowiąc będą bazę dla hodowli do dalszych prac, zmierzających do

wyprowadzenia form wyjściowych traw pastewnych, tolerujących sekwencję stresów środowiskowych.