

Sprawozdanie merytoryczne z wykonania zadania nr 35: „Identyfikacja genów związanych z ekspresją zimotrwałości i tolerancji suszy u form introgressywnych *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea*”, w roku 2017.

Arkadiusz Kosmala, Katarzyna Masajada, 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. *L. 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. *F. 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 stresy abiotyczne i biotyczne.

Material badawczy, cel i metodyka badań

Material badawczy stanowiły tetraploidalne formy introgressywne (pokolenie BC₅) *L. multiflorum*/*F. arundinacea*, zróżnicowane m.in. pod kątem tolerancji suszy i mrozoodporności (Tabela 1).

Tabela 1. Charakterystyka form introgressywnych wykorzystanych w badaniach

Genotyp	Zimotrwałość (w warunkach polowych)	Tolerancja suszy polowej/i*laboratoryjnej	Mrozoodporność (w warunkach laboratoryjnych)	Odporność na <i>M. nivale</i> (w warunkach laboratoryjnych)
180/30/19	++	++	-	++
180/30/75	++	++	+	++
180/30/84	-	+*	+	-
180/30/138	-	+**	++	-

Legenda: ++ (wysoka), + (średnia/niska), - (brak); * analiza parametrów fizjologicznych wykonana w roku 2016 wskazała na niski potencjał tolerancji symulowanej suszy w doniczkach u formy 180/30/84. ** analiza parametrów fizjologicznych wykonana w roku 2016 wskazała na wysoki potencjał tolerancji symulowanej suszy w doniczkach u formy 180/30/138.

Cel badań:

1. Analiza profilu akumulacji transkryptów, kodujących akwaporyny tonoplastowe: tip 1-1 i tip 1-2 dla dwóch wyselekcjonowanych form introgressywnych *L. multiflorum* /*F. arundinacea* – 180/30/138 i 180/30/84, różniących się potencjałem tolerancji suszy (analiza ekspresji genów na poziomie transkrypcji metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym).
2. Analiza profilu akumulacji białek tip1-1 i tip1-2 dla dwóch analizowanych form introgressywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea* – 180/30/138 i 180/30/84, różniących się potencjałem tolerancji suszy (analiza ekspresji genów na poziomie białka metodą Western blot).
3. Przygotowanie specyficznych przeciwciał anty-Wcor80 i anty-Cor14b niezbędnych do zbadania poziomu akumulacji tych białek w warunkach hartowania na mróz u wyselekcjonowanych form introgressywnych – 180/30/138 i 180/30/19.

4. Krzyżowanie wsteczne form introgresywnych *L. multiflorum/F. arundinacea* o stosunkowo wysokim stopniu tolerancji suszy i zimotrwałości lub o stosunkowo wysokim potencjale mrozoodporności – uzyskanie kolejnego pokolenia wstecznego.
5. Analiza profilu akumulacji transkryptów, kodujących *Wcor80* dla dwóch wyselekcjonowanych form introgresywnych *L. multiflorum/F. arundinacea* – 180/30/138 i 180/30/19, różniących się potencjałem mrozoodporności (analiza ekspresji genów na poziomie transkrypcji metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym).

Materiał badawczy do realizacji celu nr 1 i 2 stanowiły dwie formy introgresywne pokolenia BC₅ *L. multiflorum/F. arundinacea* wyselekcjonowane w roku 2016 – forma o stosunkowo wysokim potencjale tolerancji suszy laboratoryjnej (180/30/138) i forma o stosunkowo niskim potencjale tolerancji (180/30/84). Analizy prowadzono w 5 punktach czasowych: warunki kontrolne, 3, 6 i 11 dzień suszy oraz warunki po powtórnym nawodnieniu (10 dni po nawodnieniu). Materiał badawczy do realizacji celu nr 3 i 5 stanowiły dwie formy introgresywne pokolenia BC₅ *L. multiflorum/F. arundinacea* wyselekcjonowane w roku 2015 – forma o stosunkowo wysokim potencjale mrozoodporności (180/30/138) i forma o stosunkowo niskim potencjale tolerancji (180/30/19). Analizy prowadzono w 5 punktach czasowych: warunki kontrolne, 3, 7, 14 i 21 dzień hartowania na mróz. W krzyżowaniu z tetraploidalnymi formami *L. multiflorum* odmiany Atos wykorzystano formy introgresywne BC₅: 180/30/138 o stosunkowo wysokim potencjale mrozoodporności oraz 180/30/19 i 180/30/75 o stosunkowo wysokim potencjale zimotrwałości i tolerancji suszy.

Metodyka badań:

Analizy RT-PCR w czasie rzeczywistym prowadzono przy wykorzystaniu termocyklera Bio-Rad CFX 96 (Biorad). Normalizację różnic w ilości zastosowanego cDNA przeprowadzono w oparciu o dwa geny referencyjne (gen dla aktyny i gen dla ubikwityny). Procedurę RT-PCR w czasie rzeczywistym opisano dodatkowo w pracy Pawłowicz i in. (2017). Analiza związana z oszacowaniem jakości przeciwciał anti-*Wcor80* i anti-*Cor14b* oraz z profilowaniem akumulacji tip 1-1 i tip 1-2 obejmowała: (i) izolację i oczyszczanie białek; (ii) elektroforezę białek w żelu poliakryloamidowym (SDS-PAGE); (iii) elektrotransfer białek na membranę nitrocelulozową oraz (iv) reakcję Western blot ze specyficznymi przeciwciałami.

Wyniki i Wnioski

1. Wykazano, że w przypadku *tip 1-1* analizowane formy introgresywne różniły się statystycznie istotnie poziomem akumulacji transkryptu w warunkach kontrolnych i w warunkach rehydratacji. Wyższy poziom akumulacji zaobserwowano u genotypu 180/30/84. Nie stwierdzono natomiast różnic międzygenotypowych w warunkach suszy. W przypadku *tip 1-2* analizowane formy introgresywne różniły się statystycznie istotnie poziomem akumulacji transkryptu tylko w warunkach kontrolnych. Wyższy poziom akumulacji zaobserwowano u genotypu 180/30/84. Nie stwierdzono natomiast różnic międzygenotypowych w warunkach suszy i w warunkach powtórnej rehydratacji. Na tym etapie badań nie można wykluczyć, że profile akumulacji transkryptów *tip 1-1* i *tip 1-2* będą stanowiły dobry system markerowy do selekcji genotypów, różniących się potencjałem tolerancji suszy i regeneracji po ustąpieniu stresu.
2. Poziom akumulacji białek tip 1-1 i tip 1-2 był w każdym punkcie czasowym eksperymentu wyższy u formy introgresywnej 180/30/138. Prawdopodobnie profile akumulacji tych białek mogą być dobrym markerem tolerancji suszy u badanych form introgresywnych.
3. Dwa wyprodukowane przeciwciała okazały się być wysoce specyficzne w kierunku białek *Wcor80* i *Cor14b*. W przypadku każdego z przeciwciał identyfikowano pojedynczy produkt białkowy o pożądanej masie cząsteczkowej. Ze względu na swoją wysoką specyficzność, uzyskane przeciwciała będą mogły zostać wykorzystane w projekcie w latach następnych do analizy poziomu ekspresji genów *Wcor80* i *Cor14b* na poziomie białka, w warunkach hartowania na mróz u wyselekcjonowanych form introgresywnych. Będą to badania komplementarne do analiz ekspresji tych genów na poziomie transkryptu, przy wykorzystaniu RT-PCR w czasie rzeczywistym.
4. Wszystkie wykorzystane do krzyżowań wstecznych formy introgresywne cechowały się stosunkowo wysoką płodnością męską (m.in. pękające pylniki), umożliwiającą zawiązanie stosunkowo dużej liczby ziarniaków. Uzyskane z trzech kombinacji krzyżówkowych ziarniaki charakteryzowały się stosunkowo wysokim potencjałem kiełkowania. Otrzymane formy introgresywne pokolenia BC₆, po selekcji pod kątem ich tolerancji suszy i zimotrwałości, stanowiąc

będą bazę do rozmnożenia roślin i dalszych prac, zmierzających do wyprowadzenia form wyjściowych, tolerujących sekwencję stresów środowiskowych, dla hodowli.

5. Wykazano, że w przypadku *Wcor80* analizowane formy introgresywne różniły się poziomem akumulacji transkryptu w warunkach kontrolnych oraz w 3 i 14 dniu hartowania. Wyższy poziom akumulacji zaobserwowano u genotypu 180/30/19 w kontroli i na początku hartowania, natomiast u genotypu 180/30/138 w 14 dniu hartowania. W trakcie hartowania na mróz forma introgresywna 180/30/138 wykazywała tendencję do stopniowego wzrostu poziomu akumulacji transkryptu, natomiast forma introgresywna 180/30/19 – do stopniowego spadku poziomu akumulacji. Profile relatywnej ekspresji *Wcor80* mogą być prawdopodobnie dobrym markerem tolerancji niskiej temperatury u badanych form introgresywnych.