

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 2018.

Arkadiusz Kosmala, Adam Augustyniak, Dawid Perlikowski, Izabela Pawłowicz, Włodzimierz Zwierzykowski, Agnieszka Płazek, 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. *Festuca pratensis* jest z kolei gatunkiem wykorzystywanym jako źródło genów tolerancji mrozu. Wykazano również, że dzięki obecności subgenomu 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.

Odporność na suszę jest cechą poligeniczną i wielokomponentową. Na szczególną uwagę w przypadku badania mechanizmów tej odporności u roślin zasługują jej trzy główne komponenty – unikanie suszy (ang. drought avoidance), tolerancja suszy (ang. drought tolerance) i regeneracja po ustąpieniu warunków stresowych (ang. recovery). W niniejszym zadaniu badawczym analizowano wszystkie trzy komponenty odporności na suszę. W wyniku realizacji badań w roku 2018 wyselekcjonowano formy introgresywne, które charakteryzowały się szerokim spektrum komponentów odporności na suszę. Planowane w dalszej perspektywie testy zimotrwałości umożliwią dodatkowo wyodrębnienie pośród wyselekcjonowanych form, genotypów odpornych na sekwencję stresów susza/zima. Ważnym czynnikiem wpływającym na plonowanie roślin jest również potencjał ich odporności na stesy biotyczne, w tym choroby grzybowe i wirusowe.

Cel, materiał badawczy i metodyka badań

Cel badań:

1. Analiza profilu akumulacji transkryptów, kodujących Cor14b dla dwóch wyselekcjonowanych form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea*, różniących się potencjałem mrozoodporności – 180/30/138 i 180/30/19 (analiza ekspresji genów na poziomie transkrypcji metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym).
2. Analiza profilu akumulacji białek Wcor80 i Cor14b dla dwóch wyselekcjonowanych form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea*, różniących się potencjałem mrozoodporności – 180/30/138 i 180/30/19 (analiza ekspresji genów na poziomie białka metodą Western blot).
3. Przeprowadzenie testów tolerancji suszy polowej w eksperymencie „pod daszkami” form introgresywnych (BC₅) – ocena funkcjonowania roślin w warunkach suszy i po powtórnym nawodnieniu; rozpoczęcie testów zimotrwałości w warunkach polowych.
4. Ocena stopnia podatności roślin na podstawowe choroby (w okresie letnim i jesiennym).

Materiał badawczy do analiz molekularnych (ekspresja genu *cor14b* i poziom akumulacji białek Wcor80 i cor14b) 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 (cele badawcze nr 1 i 2).

Materiał badawczy do realizacji celu nr 3 i 4 stanowiły cztery populacje form introgressywnych pokolenia BC₆ *L. multiflorum*/*F. arundinacea* (185/4, 6, 10 i 12) oraz populacja roślin kontrolnych *L. multiflorum* odm. Atos.

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 aktywności i gen dla ubikwityny). Procedurę RT-PCR w czasie rzeczywistym opisano dodatkowo w pracy Pawłowicz i in. (2017). Analiza związana z profilowaniem akumulacji *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 Western blot ze specyficznymi przeciwciałami.

Testy odporności na suszę przeprowadzono w namiotach z foliowym zadaszeniem, wyposażonych w system nawadniający i odwadniający. 280 roślin po rozklonowaniu wysadzono w czterech powtórzeniach, każde powtórzenie w oddzielnym namiocie. Doświadczenie prowadzono w dwóch grupach. W pierwszej grupie (namiot nr 4) rosły klony, którym stworzono „komfortowe” warunki wilgoci poprzez sztuczne nawadnianie. Natomiast w drugiej grupie (namioty nr 1, 2 i 3), rosły klony, którym stworzono warunki suszy (przez cały czas trwania eksperymentu rośliny nie były podlewane). Określono bonitację, suchą i zieloną masę w warunkach kontrolnych i trzech punktach czasowych suszy.

Ocenę porażenia i podatności roślin na podstawowe choroby przeprowadzono na wszystkich roślinach uprawianych w ramach projektu na polu doświadczalnym ‘pod daszkami’. Ocena wizualna została wykonana dwukrotnie, latem i jesienią, a więc po selekcji roślin pod kątem ich odporności na suszę.

Po ostatnim pokosie w eksperymencie ‘pod daszkami’, rozpoczęto nawadnianie. Po 14 dniach nawadniania zmierzony został potencjał odrostu każdej rośliny (odrost, sucha i zielona masa). Rośliny pozostawiono w namiotach na okres zimowy, celem określenia ich zdolności do przetrwania w warunkach naturalnych.

Wyniki i wnioski

1. Uzyskano dwa profile akumulacji transkryptu dla genu *cor14b* – jeden dla formy introgressywnej 180/20/138 (o wysokim stopniu mrozoodporności) i jeden dla formy introgressywnej 180/30/19 (o niskim stopniu mrozoodporności). W trakcie trwania hartowania na mróz obserwowano stopniowy wzrost ekspresji genu *cor14b* u obu analizowanych form, aż do piątego dnia hartowania. Następnie obserwowano spadek poziomu akumulacji transkryptu. W trakcie hartowania na mróz poziom transkrypcji genu *cor14b* był zawsze wyższy u formy introgressywnej 180/30/138. Profile relatywnej ekspresji genu *cor14b* mogą być dobrym markerem tolerancji niskiej temperatury u badanych form introgressywnych.
2. Uzyskano cztery profile akumulacji białek: (i) dwa profile akumulacji białka *Wcor80* – jeden dla formy introgressywnej 180/20/138 i jeden dla formy introgressywnej 180/30/19 oraz (ii) dwa profile akumulacji białka *Cor14b*. Zaobserwowano istotne różnice międzygenotypowe w poziomie akumulacji białek *Wcor80* i *Cor14b* u form introgressywnych o różnym poziomie mrozoodporności. Profile akumulacji tych białek mogą być dobrym markerem tolerancji niskiej temperatury u badanych form introgressywnych.
3. Biorąc pod uwagę średnie wartości badanych parametrów plonowania dla poszczególnych populacji, stwierdzono, że najwyższym potencjałem tolerancji warunków stresowych cechowała się populacja form introgressywnych 185/4 (bonitacja 6,1; sucha masa 11,2 g; zielona masa 69,5 g). Natomiast najniższym stopniem tolerancji – populacja form introgressywnych 185/12 (bonitacja 4,3; sucha masa 6,9 g; zielona masa 41,5 g). Średnie parametry plonowania uzyskane dla populacji 185/12 były istotnie niższe w odniesieniu do średnich parametrów plonowania uzyskanych dla populacji form kontrolnych *L. multiflorum* odm. Atos (bonitacja 4,7; sucha masa 9,1 g; zielona masa 49,3 g). Pozostałe dwie badane populacje form introgressywnych, 185/6 i 185/10, cechowały się średnimi wyższymi w odniesieniu do populacji roślin kontrolnych, lecz niższymi w stosunku do populacji 185/4. Jednocześnie obserwowano stosunkowo szeroki zakres tolerancji warunków suszy w obrębie poszczególnych analizowanych populacji roślin. W czerwcu na roślinach uprawianych w namiotach odnotowano występowanie głównie mączniaka traw

(*Erysiphe graminis*). Porażenie to nie było duże, głównie w stopniu 1 i 2, w skali 0-5. W roku 2018 odnotowano zdecydowanie więcej przypadków porażenia wirusem (98 roślin), powodującym żółte smugi liści, w porównaniu do lat wcześniejszych, ale porażenie to występowało tylko w stopniu 1-2; u kilku roślin w stopniu 3 i 4. Wytypowano 20 form introgresywnych, u których nie stwierdzono żadnych objawów porażenia. Ponieważ jednak obserwowany stopień porażenia poszczególnych populacji roślin był stosunkowo niski, zastosowano dodatkowe kryterium – potencjał tolerancji suszy (bonitacja, sucha i mokra masa – wartości powyżej średniej dla populacji).

4. Biorąc pod uwagę średnie wartości badanych parametrów plonowania dla poszczególnych populacji, stwierdzono, że najwyższym potencjałem regeneracji po ustąpieniu suszy cechowała się populacja form introgresywnych 185/4 (odrost 4,4; sucha masa 5,9 g; zielona masa 35,8 g). Natomiast najniższym stopniem regeneracji – populacja form introgresywnych 185/12 (odrost 2,2; sucha masa 1,7 g; zielona masa 10,6 g). Średnie parametry plonowania uzyskane dla populacji 185/12 były istotnie niższe w odniesieniu do średnich parametrów plonowania uzyskanych dla populacji form kontrolnych *L. multiflorum* odm. Atos (odrost 2,3; sucha masa 1,8 g; zielona masa 10,7 g). Pozostałe dwie badane populacje form introgresywnych, 185/6 i 185/10, cechowały się średnimi wyższymi w odniesieniu do populacji roślin kontrolnych, lecz niższymi w stosunku do populacji 185/4. Jednocześnie obserwowano stosunkowo szeroki zakres regeneracji roślin po ustąpieniu warunków suszy w obrębie poszczególnych analizowanych populacji. Ponadto, w każdej z badanych populacji roślin były genotypy zarówno o stosunkowo wysokim poziomie regeneracji po ustąpieniu warunków suszy, jak i genotypy o stosunkowo niskim poziomie regeneracji. Druga ocena porażenia przeprowadzona jesienią (po wtórnym nawodnieniu) nie wykazała również, podobnie jak latem, występowania ostrych objawów chorobowych. Rośliny uprzednio traktowane suszą wykazywały niewielkie porażenie mączniakiem i plamistościami liści (ocena wahała się w granicach 1-3), natomiast w ogóle nie występowała na nich rdza. Zaobserwowane objawy wskazywały na sporadyczne występowanie na badanych roślinach takich grzybów, jak *Drechslera siccans*, *D. dictyoides* oraz *Bipolaris sorokiniana*. Wytypowano 20 form introgresywnych, u których nie stwierdzono żadnych objawów porażenia i które jednocześnie charakteryzowały się stosunkowo wysoką regeneracją po wtórnym nawodnieniu.

Wszystkie rośliny, które przetrwały warunki suszy i regenerowały po nawodnieniu pozostawiono ‘pod daszkami’ na okres zimowy, celem określenia potencjału ich zimotrwałości. Formy introgresywne, które będą charakteryzowały się wysokim potencjałem odporności na stresy zimowe, choroby grzybowe oraz wysokim potencjałem tolerancji suszy i zdolnością do regeneracji po ustąpieniu warunków stresowych zostaną w kolejnych latach trwania projektu wykorzystane do namnożenia materiału roślinnego (polikrosy).