

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 2014.

Arkadiusz Kosmala, Dawid Perlikowski, Izabela Pawłowicz, Agnieszka Płazek, Zbigniew Zwierzykowski, 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 rozpoczęto prace zmierzające do selekcji genotypów, które wykazują stosunkowo wysoki poziom tolerancji sekwencji stresów susza/zima oraz do wyznaczenia fizjologicznych i molekularnych wskaźników tolerancji analizowanych stresów.

Materiał badawczy, cel i metodyka badań

Materiał badawczy stanowiły diploidalne (polikrosy, pokolenie BC₄ i BC₅) i tetraploidalne (pokolenie BC₅) formy introgresywne *L. multiflorum*/*F. arundinacea* wraz z kontrolami *L. multiflorum*.

Cel badań:

1. Przeprowadzenie testu tolerancji roślin długotrwałej suszy (14 tygodni) w warunkach polowych/symulowanych ‘pod daszkami’ (ang. ‘rain out’ experiments).
2. Ocena porażenia i podatności roślin na podstawowe choroby.
3. Określenie potencjału plonowania każdego genotypu po ustąpieniu warunków suszy.
4. Rozpoczęcie testu zimotrwałości w warunkach polowych.
5. Sklonowanie cDNA dla dwóch genów akwaporyn tonoplastowych *tip1-1* i *tip1-2*.

Metodyka badań:

Testy tolerancji suszy 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).

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: w czerwcu oraz w sezonie późnoletnim (połowa września), a więc po selekcji roślin pod kątem ich tolerancji suszy.

Po ostatnim pokosie w eksperymencie ‘pod daszkami’, rozpoczęto nawadnianie. Po 14 dniach nawadniania zmierzony został potencjał odrostu każdej rośliny. Rośliny pozostawiono w namiotach na okres zimowy, celem określenia ich zdolności do przezimowania w warunkach naturalnych.

Badania molekularne związane z klonowaniem cDNA dla dwóch genów akwaporyn tonoplastowych *tip1-1* i *tip1-2* obejmowały m.in. projektowanie starterów; 5’, 3’ RACE; klonowanie w wektorze pGEM, w tym izolację RNA, odwrotną transkrypcję, PCR, oczyszczanie produktów, izolację plazmidu; sekwencjonowanie. Ten etap prac badawczych był niezbędny, celem poznania sekwencji

cDNA dwóch genów akwaporyn tonoplastowych. Sekwencja ta posłuży projektowaniu starterów i sond wymaganych w analizach RT-PCR w czasie rzeczywistym i produkcji specyficznych przeciwciał.

Wyniki

Przeprowadzono analizy potencjału tolerancji suszy dla 280 genotypów, w 4 powtórzeniach (3 namioty 'suche' i 1 namiot nawadniany), czyli w sumie przebadano 1120 obiektów. Wykonano 7 'pokosów' – dla każdego pokosu obliczono suchą i moką masę, a następnie określono poziom odrostu; przed pokosem określano bonitację. Wyselekcjonowano 10 genotypów form introgresywnych o stosunkowo najwyższym stopniu tolerancji stresu długotrwałej suszy. Wykazano, że populacja form introgresywnych pokolenia BC₅ cechowała się wyższym stopniem tolerancji suszy w porównaniu z populacją form polikrosowych BC₄ i BC₅.

W czerwcu odnotowano jedynie śladowe występowanie mączniaka traw i to głównie na dolnych liściach roślin rosnących w namiocie kontrolnym, gdzie panowała wyższa wilgotność gleby. Ocena przeprowadzona we wrześniu wykazała zdecydowanie większą zdrowotność roślin poddanych stresowi suszy, w porównaniu do roślin pod namiotem nawadnianym. Najsilniejsze objawy chorób odnotowano na dolnych liściach, znajdujących się w obszarze podwyższonej wilgotności powietrza. Rośliny w namiocie nawadnianym wykazały stosunkowo silne porażenie grzybami powodującymi plamistość liści oraz rdzę koronową: stopień ten był zróżnicowany i wahał się w granicach od 0-4 w skali 0-5. Jedynie na trzech roślinach stwierdzono słabe objawy mączniaka prawdziwego traw. W wielu przypadkach obserwowano infekcję mieszaną tj. w miejscu zakażenia grzybami wywołującymi plamistość liści pojawiała się rdza koronowa. Rośliny traktowane suszą wykazywały niewielkie porażenie mączniakiem i plamistościami liści (ocena wahała się w granicach 0-4), natomiast w ogóle nie występowała na nich rdza. Na podstawie oceny fitopatologicznej wybrano 23 genotypy o najwyższym stopniu odporności na patogeny, w tym 20 form introgresywnych

Przeprowadzono analizy potencjału odrostu po nawodnieniu dla 280 genotypów, w 4 powtórzeniach (3 namioty 'suche' i 1 namiot nawadniany), czyli w sumie przebadano 1120 obiektów. Wyselekcjonowano 7 genotypów o stosunkowo najwyższym stopniu odrostu po nawodnieniu (po stresie długotrwałej suszy). Wykazano, że najwyższym potencjałem odrostu po nawodnieniu cechowały się w większości przypadków genotypy, które wykazały wcześniej wysoki stopień tolerancji deficytu wody w glebie, tzn. te, które płonowały stosunkowo wysoko w warunkach suszy. Do testów związanych z oceną potencjału zimotrwałości pozostały 'pod daszkami' 234 genotypy.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów molekularnych sklonowano dwie, kompletne sekwencje cDNA *tip 1-1* i *tip 1-2* w wektorze pGEM. Kolejne etapy badań, z uwzględnieniem uzyskanych sekwencji cDNA, będą obejmować:

- przeprowadzenie reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym w wybranych punktach czasowych stresu suszy,
- produkcję przeciwciał i analizę akumulacji białka w wybranych punktach czasowych stresu suszy.

Wnioski

- ✓ Wśród badanych form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea* i form kontrolnych obserwowano szeroki zakres tolerancji deficytu wody w glebie w trakcie długotrwałej suszy polowej.
- ✓ Badane genotypy w warunkach suszy wykazały istotnie wyższą odporność na rdzę koronową, mącznika prawdziwego traw oraz patogeny powodujące plamistość liści, w porównaniu do genotypów uprawianych w optymalnych warunkach wilgotnościowych.
- ✓ W wyniku prowadzonych analiz wyselekcjonowano trzy genotypy o stosunkowo wysokim stopniu tolerancji suszy, wysokim potencjale odrostu i odporności na choroby.

- ✓ Przeprowadzone prace molekularne umożliwiły uzyskanie sekwencji cDNA dwóch genów akwaporyn tonoplastowych (wakuola) dla form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea*.