

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 2016.

Arkadiusz Kosmala, Adam Augustyniak, 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 (pokolenie BC₅) formy introgresywne *L. multiflorum*/*F. arundinacea*, zróżnicowane pod kątem tolerancji suszy i mrozoodporności.

Cel badań:

1. Określenie fizjologicznych markerów tolerancji suszy w warunkach symulowanych (zawartość wody, relatywna zawartość wody, wyciek elektrolitów, fluorescencja chlorofilu) dla czterech wyselekcjonowanych form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea*; selekcja dwóch genotypów o skrajnych wartościach parametrów fizjologicznych, charakteryzujących poziom tolerancji suszy.
2. Przygotowanie puli cDNA dla kolejnych punktów czasowych eksperymentu hartowania na mróz (niska temperatura) i suszy oraz sond i starterów dla (i) genów *tip1-1* i *tip1-2* oraz (ii) *Wcor80* i *Cor14b*, dla dwóch analizowanych form introgresywnych *L. multiflorum* /*F. arundinacea*.
3. Przygotowanie specyficznych przeciwciał anty-akwaporynowych (anty-*tip1-1* i anty-*tip1-2*) niezbędnych do zbadania poziomu akumulacji tych białek w warunkach stresu suszy u dwóch wyselekcjonowanych form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea*.

Metodyka badań:

1. Analiza fizjologicznych markerów tolerancji suszy prowadzona była w symulowanych warunkach laboratoryjnych (metodykę podano w pracach Kosmala i in. 2012; Perlikowski i in. 2014). Genotypy (180/30/19, 180/30/75, 180/30/84 i 180/30/138) poddane zostały działaniu krótkotrwałej suszy (11 dni) w doniczkach w warunkach laboratoryjnych. W trakcie prowadzenia eksperymentu wykonane zostały następujące pomiary fizjologiczne: zawartość wody (WC), relatywna zawartość wody (RWC), wyciek elektrolitów (EL), fluorescencja chlorofilu, bazując na materiale roślinnym w postaci liści. Parametry fizjologiczne analizowano w warunkach kontrolnych, w trzecim, szóstym i 11 dniu suszy oraz w 10 dni po rozpoczęciu nawadniania (czyli w pięciu punktach czasowych). Każdy parametr fizjologiczny, dla każdego genotypu i każdego punktu czasowego, analizowany był dla 10 klonów. Formy kontrolne *F. arundinacea* (30 genotypów) poddano selekcji w symulowanych warunkach polowych (14 tygodni suszy w 1 lokalizacji) w trzech namiotach (3 powtórzenia biologiczne). Określona została dla nich bonitacja, sucha i zielona masa w 4 punktach czasowych suszy oraz potencjał odrostu po nawodnieniu (w 1 punkcie czasowym).

2. Analizy molekularne prowadzone były na dwóch formach introgresywnych o skrajnych parametrach fizjologicznych, opisujących ich poziom tolerancji suszy: 180/30/138 – formie o stosunkowo wysokim stopniu tolerancji i 180/30/84 – formie o stosunkowo niskim poziomie tolerancji oraz dwóch formach introgresywnych o skrajnych parametrach fizjologicznych, opisujących ich poziom tolerancji niskiej temperatury, w tym mrozu: 180/30/138 – formie o stosunkowo wysokim stopniu tolerancji mrozu i 180/30/19 – formie o stosunkowo niskim poziomie tolerancji.

Badania prowadzono w 5 punktach czasowych eksperymentu: w warunkach kontrolnych przed rozpoczęciem stresu suszy, w 3, 6 i 11 dniu suszy, 10 dni po ponownym nawodnieniu oraz w 5 punktach czasowych hartowania na mróz: w dniu przed hartowaniem, w 3, 7, 14 i 21 dniu hartowania.

Badania molekularne obejmowały: izolację RNA, odwrotną transkrypcję, PCR. Analizy 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 Strand cDNA Synthesis Kit/ Verte Kit/ Verte MMLV, do izolacji prążków z żelu – Gel Extraction Kit Qiaex II, do izolacji plazmidów - GeneJet Plazmid Miniprep Kit i in. Zidentyfikowano unikalne rejony cDNA analizowanych genów, do których zaprojektowano startery (oligo) i sondę (znakowany oligo), celem wykorzystania w amplifikacji DNA, połączonej z analizą ilościową poziomu transkrypty (RT-PCR w czasie rzeczywistym).

3. Na podstawie sekwencji cDNA uzyskanych dla *tip1-1* i *tip1-2* w roku 2014, ustalono sekwencję aminokwasową, kodowanych przez nie białek. Zaprojektowano 2 peptydy (sekwencja aminokwasowa), które posłużyły do immunizacji i otrzymania dwóch przeciwciał. Jakość przeciwciał sprawdzono przy wykorzystaniu techniki Western blot. Prace obejmowały: (1) izolację białka z liści, oczyszczanie białka, oznaczanie stężenia białka, (2) elektroforezę w żelu poliakryloamidowym (SDS-PAGE), wybarwienie białka (np. CBB), (3) elektrotransfer białka na membranę nitrocelulozową, wybarwienie białek Ponceau, (4) reakcję z przeciwciałami, w tym z przeciwciałem drugorzędowym, detekcję sygnału przy wykorzystaniu m.in. reakcji peroksydazy chrozanowej (Kosmala i in. 2012).

Wyniki i Wnioski

1. Potencjał tolerancji suszy u czterech badanych form introgresywnych w symulowanych warunkach laboratoryjnych był różny. Fizjologiczne markery tolerancji tego stresu to głównie relatywna zawartość wody i zawartość wody w liściach oraz wyciek elektrolitów, obrazujący stopień zniszczenia błon biologicznych. W zaawansowanej suszy (11 dzień) uwodnienie liści było najwyższe u formy introgresywnej 180/30/138, a najniższe u formy 180/30/84. Podobnie, najwyższy poziom wycieku elektrolitów w tych samych warunkach obserwowano u formy 180/30/84. Natomiast forma 130/80/138 nie wykazywała uszkodzenia błon w trakcie suszy. Co ciekawe, forma o najwyższym poziomie tolerancji suszy, wykazywała również najwyższy poziom mrozoodporności, jak wykazały badania z roku 2015. Obie wyselekcjonowane formy introgresywne zostały wykorzystane w dalszych pracach molekularnych. Ponadto, wyselekcjonowano dwa genotypy *F. arundinacea* o zróżnicowanym potencjale tolerancji suszy polowej – będą one roślinami referencyjnymi dla form introgresywnych w badaniach mechanizmów tolerancji suszy.
2. Każdy z wyselekcjonowanych genotypów form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea* rozklonowano dodatkowo na 10 klonów. Celem zbioru tkanki w postaci liści do analiz molekularnych, rośliny traktowano symulowanymi warunkami suszy. Zbioru tkanki (jedna próbka - 100 mg liści) z 10 powtórzeń biologicznych na genotyp dokonano: w warunkach kontrolnych (przed rozpoczęciem suszy), w 3, 5 i 11 dniu suszy oraz 10 dni po ponownym nawodnieniu. Z każdego powtórzenia biologicznego pobierano trzy próbki (powtórzenia techniczne) w danym punkcie czasowym. W sumie do dalszych badań związanych z ekspresją genów *tip 1-1* i *tip 1-2* uzyskano 150 próbek tkanki na jedną formę introgresywną (300 próbek ogółem). W dalszej kolejności realizacji zadania wyizolowano całościową pulę RNA z liści dwóch form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea* (150 próbek na formę introgresywną), przy wykorzystaniu komercyjnych zestawów do izolacji RNA (RNeasy Plant Mini Kit/ Magnova Poli (dT)25 RNA magnetic particles). Uzyskano w sumie 300 próbek totalnego RNA, po 150 na genotyp, w tym po 30 próbek na każdy analizowany punkt czasowy eksperymentu. Jakość wyizolowanej puli RNA sprawdzono w żelu agarozowym, stosując pule zbiorcze z jednego

punktu czasowego dla danego genotypu. 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, przy wykorzystaniu zestawów do odwrotnej transkrypcji (Transcriptor first Stand cDNA Synthesis Kit/ Verte Kit/ Verte MMLV). Jakość uzyskanych pul cDNA sprawdzono amplifikując sekwencje *tip1-1* (759 nt) i *tip1-2* (750 nt), przy wykorzystaniu starterów, których sekwencję uzyskano w projekcie w roku 2014. W każdym z przypadków uzyskano fragmenty cDNA o wymaganej długości (liczbie par zasad). Uzyskane fragmenty ligowano z wektorem pGEM, a po kolejnych krokach eksperymentalnych (transformacja *E. coli* i izolacja plazmidu), poddano je sekwencjonowaniu, celem potwierdzenia poprawności ich sekwencji. Sekwencjonowanie potwierdziło obecność, w każdej z analizowanych próbek, cDNA *tip1-1* i *tip 1-2* o poprawnej sekwencji. Na bazie uzyskanych dwóch sekwencji cDNA zaprojektowano również sekwencje starterów (oligo) i sond (znakowanych oligo). Uzyskano dwa startery i jedną sondę dla genu *tip1-1* oraz dwa startery i jedną sondę dla genu *tip 1-2*. Wykorzystując ten sam schemat eksperymentalny uzyskano dwa startery i jedną sondę dla genu *Wcor80* oraz dwa startery i jedną sondę dla genu *Cor14b*.

3. Na podstawie kompletnych sekwencji aminokwasowych białek tip 1-1 i tip 1-2, uzyskanych w 2014 r., zaprojektowano unikalne peptydy do produkcji przeciwciał – 1 peptyd dla białka tip 1-1 i 1 peptyd dla białka tip 1-2, wykorzystując m.in. program BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Skuteczność przeciwciał w kierunku identyfikacji białek akwaporynowych sprawdzono przy wykorzystaniu następujących eksperymentów, zgodnie z procedurami opisanymi w materiałach i metodach. Uzyskane ekstrakty białkowe reprezentowały populację niezdegradowanych białek. Obraz białek przeniesionych z żelu na filtr nitrocelulozowy był wiernym odbiciem żelu wybarwionego Coomassie blue, co świadczyło o prawidłowych parametrach elektrotransferu. Oba wyprodukowane przeciwciała okazały się być wysoce specyficzne w kierunku białek akwaporynowych, tip 1-1 i tip 1-2. W przypadku każdego z przeciwciał identyfikowano pojedynczy produkt białkowy o pożądanej masie cząsteczkowej.