

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 2015.

Arkadiusz Kosmala, Adam Augustyniak, Katarzyna Masajada, Marcin Rapacz, Agnieszka Płażek, Ewa Pocięcha, Włodzimierz Zwierzykowski, Eugeniusz Paszkowski

Wprowadzenie

Trawy pastewne, a wśród 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 introgressywne *L. multiflorum*/*F. arundinacea*.

Cel badań:

1. Ocena przetrwania roślin; wybór genotypów tolerujących sekwencję stresów w układzie susza/zima;
2. Poznanie fizjologiczno-molekularnych wskaźników odporności na *Microdochium nivale*;
3. Określenie fizjologicznych markerów mrozoodporności (odrost po mrożeniu i wyciek elektrolitów);
4. Sklonowanie cDNA wybranych genów, potencjalnie związanych z tolerancją niskiej temperatury: *Wcor80* i *Cor14b*.

Metodyka badań:

Testem zimotrwałości w warunkach polowych poddano 234 obiekty roślinne w jednej lokalizacji (Szelejewo). Ocena zimotrwałości została dokonana na podstawie: (i) oszacowania suchej i mokrej masy roślin, które przetrwały, (ii) potencjału odrostu roślin, które przetrwały.

M. nivale jest głównym ‘sprawcą’ pleśni śniegowej. W pierwszej części tematu dotyczącego oceny stopnia porażenia form introgressywnych infekowano 20 genotypów, charakteryzujących się stosunkowo wysokim stopniem tolerancji suszy i wykazujących brak objawów porażenia mączniakiem prawdziwym traw, plamistościami liści i rdzą koronową. Dalsze analizy prowadzono tylko na wybranych 2 genotypach o stosunkowo najniższym stopniu porażenia i na 2 genotypach o najwyższym stopniu porażenia *M. nivale*. Zawartość cukru oznaczano metodą antronową (Ashwell 1975, Zagrodzki i in. 1989). Analizę zawartości kwasu abscysynowego (ABA) wykonano metodą HPLC opisaną przez Żur i in. (2014). Profil kwasów fenolowych oznaczono metodą HPLC z detekcją fluorymetryczną.

Ocenę poziomu mrozoodporności przeprowadzono na podstawie określenia zdolności roślin do odrostu po stresie mrozu według skali Larsen’a (1978). Badanie uszkodzeń błon komórkowych u dwóch wyselekcjonowanych genotypów polegało na konduktometrycznym pomiarze wycieku elektrolitów z uszkodzonych tkanek liści po mrożeniu po różnym czasie hartowania roślin w niskiej temperaturze. Wyznaczono wartość T_{EL50} (temperatura powodująca 50% wyciek elektrolitów) dla każdego badanego momentu hartowania.

Badania molekularne związane z klonowaniem cDNA dla dwóch genów *Cor14b* i *Wcor80* obejmowały m.in. projektowanie starterów; 5', 3' RACE; klonowanie w wektorze pGEM, w tym izolację RNA, odwrotną transkrypcję, PCR, oczyszczanie produktów, izolację plazmidu; sekwencjonowanie.

Wyniki

Na podstawie analizy potencjału odrostu, suchej i zielonej masy po zimie wyselekcjonowano 4 genotypy, które różniły się poziomem zimotrwałości. Formy introgresywne **180/30/19** i **180/30/75** uznano za rośliny o najwyższym stopniu zimotrwałości, natomiast formy introgresywne **180/30/138** i **180/30/84** (nie przezimowały) za rośliny o najniższym stopniu zimotrwałości.

Wyselekcjonowano 4 genotypy – 2 o najwyższym poziomie odporności na *M. nivale* (**180/30/19** i **180/30/75**) i 2 o najniższym stopniu odporności (**180/30/84** i **180/30/138**). Poziom odporności był zbieżny z poziomem zimotrwałości wyselekcjonowanych genotypów. Genotypy odporne na pleśń charakteryzowały się wyższą zawartością cukrów zarówno w liściach, jak i w węzłach krzewienia. Mimo ogólnej tendencji zużycia cukrów w trakcie trwania infekcji u obu typów roślin, u roślin odpornych zawartość cukrów w 7 dniu infekcji była wyższa niż odpowiednio u roślin wrażliwych. Genotypy odporne wykazywały także wyższą zawartość ogólnej puli fenoli niż genotypy wrażliwe, aczkolwiek ta różnica nie była tak duża, jak w przypadku cukrów. W liściach i węzłach roślin odpornych odnotowano większe ilości kwasu abscysynowego w 1 dniu infekcji niż w 7 dniu, w odniesieniu do genotypów wrażliwych.

Do dalszych prac wyselekcjonowano formę introgresywną **180/30/138** – o najwyższym poziomie odrostu po mrożeniu i formę **180/30/19** – o najniższym poziomie odrostu (brak odrostu). Genotyp **180/30/138** wykazał najwyższą stabilność błon po pełnym, trzytygodniowym okresie hartowania na mróz. Genotyp **180/30/19** wykazał po tym czasie niższy poziom stabilności błon. Jednocześnie zaobserwowano różną dynamikę hartowania u obu genotypów. W pierwszych i w zaawansowanych dniach hartowania genotyp **180/30/19** charakteryzował się większym poziomem wycieku elektrolitów, w porównaniu z genotypem **180/30/138**. Wyjątkiem był siódmy dzień hartowania, w którym stabilność błon komórkowych była wyższa u genotypu **180/30/19**.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów molekularnych sklonowano dwie, kompletne sekwencje cDNA *Cor14b* i *Wcor80* w wektorze pGEM.

Wnioski

- wyselekcjonowano dwa genotypy o stosunkowo wysokim i dwa o stosunkowo niskim poziomie tolerancji stresów środowiskowych, w tym zimotrwałości.
- temperatura (brak dominacji mrozu) nie była głównym czynnikiem warunkującym zimotrwałość wyselekcjonowanych form introgresywnych. Ich potencjał mrozoodporności oznaczono w symulowanych testach laboratoryjnych.
- wyselekcjonowano dwie formy introgresywne: genotyp o stosunkowo wysokim poziomie mrozoodporności (180/30/138) i genotyp o stosunkowo niskim poziomie mrozoodporności (180/30/19), po trzech tygodniach hartowania na mróz.
- poziom wycieku elektrolitów jest bardzo dobrym wskaźnikiem poziomu tolerancji mrozu u wybranych form introgresywnych, skorelowanym z poziomem odrostu roślin po mrożeniu.
- poziom mrozoodporności u wyselekcjonowanych form nie był skorelowany z poziomem zimotrwałości i odporności na *M. nivale* badanych form. Forma mrozoodporna 180/30/138 nie wykazywała zimotrwałości i odporności na porażenie *M. nivale*, natomiast mniej mrozoodporna forma 180/30/19 była zimotrwała i odporna na *M. nivale*.
- brak korelacji pomiędzy poziomem zimotrwałości i mrozoodporności badanych form introgresywnych wynikał najprawdopodobniej z warunków atmosferycznych panujących zimą 2014/2015 – temperatura (brak dominacji mrozu) nie była głównym czynnikiem selekcyjnym.
- przeprowadzone prace eksperymentalne umożliwiły uzyskanie sekwencji cDNA dwóch genów *Wcor80* i *Cor14b* dla form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea*.

- uzyskane sekwencje cDNA zostaną wykorzystane w planowanych na przyszłe lata analizach poziomu ekspresji tych genów w warunkach niskiej temperatury u form introgresywnych, zróżnicowanych pod kątem mrozoodporności (180/30/138 i 180/30/19).