

ARKADIUSZ KOSMAŁA¹
ADAM AUGUSTYNIAK¹
DAWID PERLIKOWSKI¹
IZABELA PAWŁOWICZ¹
WŁODZIMIERZ ZWIERZYKOWSKI¹
AGNIESZKA PŁAŻEK²
EUGENIUSZ PASZKOWSKI³

¹ Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

² Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

³ DANKO Hodowla Roślin

Kierownik Tematu: dr hab. Arkadiusz Kosmała Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, tel. 61 6550285, e-mail: akos@igr.poznan.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.18.2018, Zadanie nr 35.

Identyfikacja genów związanych z ekspresją zimotrwałości i tolerancji suszy u form introgresywnych *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea*

Identification of genes associated with winter-hardiness and drought tolerance in the introgression forms of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea*

Słowa kluczowe: cor14b, mrozoodporność, odporność na choroby, odporność na suszę, trawy, Wcor80, zimotrwałość

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

Trawy pastewne, a pośród nich kostrzewy (*Festuca*) i życice (*Lolium*) są doskonałymi gatunkami do badań molekularnej kontroli cech związanych z tolerancją stresów środowiskowych. *Lolium 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 trzinowa) — charakteryzują się wysokim stopniem odporności na patogeny oraz tolerancji mrozu, suszy i wysokiego zasolenia (Kosmała i in., 2006, 2009, 2012). 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 (Kosmala i in. 2012; Perlikowski i in., 2016 a, b; Augustyniak i in., 2018). *Festuca pratensis* jest z kolei gatunkiem wykorzystywanym jako źródło genów tolerancji mrozu (Kosmala i in., 2006, 2009). 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 (Kosmala i in., 2007; Augustyniak i in., 2018). 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. 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. Ważnym czynnikiem wpływającym na plonowanie roślin jest również potencjał ich odporności na stresy biotyczne, w tym choroby grzybowe i wirusowe (Płażek i in., 2018). Podstawowe cele badań w roku 2018 obejmowały:

- analizę profilu akumulacji transkryptów, kodujących *Cor14b* dla dwóch wyselekcjonowanych form introgresywnych *L. multiflorum/F. arundinacea*, różniących się potencjałem mrozoodporności,
- analizę profilu akumulacji białek *Wcor80* i *Cor14b* dla dwóch wyselekcjonowanych form introgresywnych *L. multiflorum/F. arundinacea*, różniących się potencjałem mrozoodporności,
- przeprowadzenie testów tolerancji suszy polowej w eksperymencie „pod daszkami” form introgresywnych (BC6),
- ocenę 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 odporności (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 introgresywnych pokolenia BC6 *L. multiflorum/F. arundinacea* (185/4, 6, 10 i 12) oraz populacja roślin kontrolnych *L. multiflorum* odm. Atos.

OPIS WYNIKÓW

Uzyskano dwa profile akumulacji transkryptu dla genu *cor14b* — jeden dla formy introgresywnej 180/20/138 i jeden dla formy introgresywnej 180/30/19. 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 introgresywnej 180/30/138.

Uzyskano cztery profile akumulacji białek: (i) dwa profile akumulacji białka Wcor80 — jeden dla formy introgresywnej 180/20/138 i jeden dla formy introgresywnej 180/30/19 oraz (ii) dwa profile akumulacji białka Cor14b. Zaobserwowano istotne różnice międzygenotypowe w poziomie akumulacji białek Wcor80 i Cor14b u form introgresywnych o różnym poziomie mrozoodporności.

Na podstawie średnich wartości badanych parametrów plonowania dla poszczególnych populacji, stwierdzono, że najwyższym potencjałem tolerancji warunków suszy cechowała się populacja form introgresywnych 185/4 (bonitacja 6,1; sucha masa 11,2 g; zielona masa 69,5 g). Natomiast najniższym stopniem tolerancji — populacja form introgresywnych 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 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 tolerancji warunków suszy w obrębie poszczególnych analizowanych populacji roślin.

W czerwcu na roślinach uprawianych w namiotach odnotowano występowanie głównie mączniaka traw. 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.

Na podstawie średnich 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*.

WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

1. Profile relatywnej ekspresji genu *cor14b* w warunkach hartowania na mróz mogą być dobrym markerem tolerancji niskiej temperatury u form introgressywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea*.
2. Profile akumulacji białek Cor14b i Wcor80 w warunkach hartowania mogą być również dobrym markerem tolerancji niskiej temperatury u badanych form introgressywnych.
3. Wyselekcjonowano formy introgressywne BC₆ *L. multiflorum*/*F. arundinacea* o wysokim potencjale tolerancji suszy, regeneracji metabolizmu po ustąpieniu warunków suszy i odporności na choroby.

LITERATURA

- Augustyniak A., Perlikowski D., Rapacz M., Kościelniak J., Kosmala A. 2018. Insight into cellular proteome of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms to decipher crucial mechanisms of cold acclimation in forage grasses. *Plant Sci.* 272: 22 — 31.
- Kosmala A., Bocian A., Rapacz M., Jurczyk B., Zwierzykowski Z. 2009. Identification of leaf proteins differentially accumulated during cold acclimation between *Festuca pratensis* plants with distinct levels of frost tolerance. *J. Exp. Bot.* 60: 3595 — 3609.
- Kosmala A., Perlikowski D., Pawłowicz I., Rapacz M. 2012. Changes in the chloroplast proteome following water deficit and subsequent watering in a high and a low drought tolerant genotype of *Festuca arundinacea*. *J. Exp. Bot.* 63: 6161 — 6172.
- Kosmala A., Zwierzykowski Z., Gąsior D., Rapacz M., Zwierzykowska E., Humphreys M.W. (2006). GISH/FISH mapping of genes for freezing tolerance transferred from *Festuca pratensis* to *Lolium multiflorum*. *Heredity* 96: 243 — 251.
- Kosmala A., Zwierzykowski Z., Zwierzykowska E., Łuczak M., Rapacz M., Gąsior D., Humphreys M. W. 2007. Introgression-mapping of the genes for winter hardiness and frost tolerance transferred from *Festuca arundinacea* into *Lolium multiflorum*. *J. Hered.* 98: 311 — 316.
- Perlikowski D., Kierszniowska S., Sawikowska A., Krajewski P., Rapacz M., Eckhardt Ä., Kosmala A. 2016. Remodeling of leaf cellular glycerolipid composition under drought and re-hydration conditions in grasses from the *Lolium-Festuca* complex. *Front. Plant Sci.* 7:1027. DOI: 10.3389/fpls.2016.01027.
- Perlikowski D., Czyżniejewski M., Marczak Ł., Augustyniak A., Kosmala A. 2016. Water deficit affects primary metabolism differently in two *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms with a distinct capacity for photosynthesis and membrane regeneration. *Front. Plant Sci.* 7:1063. DOI: 10.3389/fpls.2016.01063.
- Płażek A., Pocięcha E., Augustyniak A., Masajada K., Dziurka M., Majka J., Perlikowski D., Pawłowicz I., Kosmala A. 2018. Dissection of resistance to *Microdochium nivale* in *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms. *Plant Physiol. Biochem.* 123: 43 — 53.