

## **Badanie zróżnicowania genetycznego i funkcjonalnego mikrosymbiontów koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*) z dwóch stref klimatycznych: subpolarnej i umiarkowanej w celu identyfikacji szczepów o potencjalnym zastosowaniu w rolnictwie**

Azot jest jednym z najbardziej niedostępnych pierwiastków w glebie, dlatego istnieje konieczność wprowadzania sztucznych nawozów azotowych w celu zwiększenia plonów roślin. Niestety, związki te są drogie i mają bardzo negatywny wpływ na środowisko oraz jakość uzyskiwanych plonów. Z tych powodów, biologiczne wiązanie azotu (ang. Biological Nitrogen Fixation, BNF), które dostarcza rocznie ~200 milionów ton tego pierwiastka, stanowi korzystną alternatywę dla sztucznych nawozów azotowych. Spośród różnych układów biologicznych, symbiotyczne interakcje roślin bobowatych (*Fabaceae*) z bakteriami glebowymi należącymi do rodziny *Rhizobiaceae* charakteryzują się najwyższą wydajnością procesu wiązania azotu.

Bobowate należą do dużej i ważnej ekonomicznie grupy roślin obejmującej około 18.000 gatunków, z których wiele jest istotnym źródłem roślinnego białka w diecie człowieka (fasola, groch, soja, soczewica, orzech ziemny), bogatym źródłem związków mających zastosowanie w medycynie, paszy dla zwierząt (koniczyna, lucerna, wyka, łubin) i ma wiele innych zastosowań w przemyśle (np. akacja). Spośród tych roślin, ostatnio znacznie wzrosło zainteresowanie uprawą koniczyny, gdyż roślina ta jest bogatym źródłem naturalnych izoflawonoidów (genisteiny, daidzeiny, formononetiny i biochaniny), które są składnikami wielu suplementów diety.

Rośliny bobowate posiadają unikalną zdolność nawiązywania symbiozy z bakteriami glebowymi, zwanymi ogólnie ryzobiami, w warunkach niedoboru azotu w glebie. Wówczas ryzobia indukują tworzenie specjalnych organów na korzeniach roślin, zwanych brodawkami, po zasiedleniu których redukują azot atmosferyczny do amoniaku. Natomiast przy braku roślin bobowatych, ryzobia egzystują w glebie jako wolnożyjące bakterie i wtedy narażone są na działanie różnych czynników środowiskowych, takich jak: niedobór substancji odżywczych, czy stres wywołany niską temperaturą. Występowanie ryzobiów w różnych strefach klimatycznych i niszach ekologicznych (gleba, ryzosfera i brodawki korzeniowe roślin) sugeruje, że bakterie te wykształciły efektywne mechanizmy adaptacyjne, których poznanie mogłoby przyczynić się do lepszego zrozumienia funkcjonowania symbiozy rośliny bobowate - ryzobia. Jednak pomimo ogromnego znaczenia ekonomicznego i ekologicznego procesu BNF, zastosowanie ryzobiów w zrównoważonym rolnictwie jest dotychczas niewielkie. Jednym z powodów jest poznanie w niewystarczającym stopniu zdolności adaptacyjnych tych bakterii do różnych czynników stresowych i brak wyselekcjonowanych szczepów o wysokiej aktywności promującej wzrost roślin.

Celem tego projektu jest zbadanie zróżnicowania genetycznego i funkcjonalnego mikrosymbiontów koniczyny łąkowej (*Trifolium pratense*) rosnącej w dwóch strefach klimatycznych: subpolarnej i umiarkowanej, w celu określenia zdolności adaptacyjnych tych bakterii do stresu niskiej temperatury i wyselekcjonowania szczepów o dużym potencjale rolniczym. Szczepy te powinny charakteryzować się dużą efektywnością w promowaniu wzrostu i produktywności roślin oraz wysoką tolerancją na niskie temperatury.

W ramach tego projektu zostaną przeprowadzone analizy dla dwóch kolekcji szczepów pochodzących z północnej Norwegii oraz południowo-wschodniej Polski (po 60 szczepów z każdej kolekcji). Planujemy określić zróżnicowanie genetyczne oraz własności fenotypowe i symbiotyczne tych bakterii, jak również ich zdolności adaptacyjne do różnych warunków środowiskowych, w tym stresu niskiej temperatury. Realizacja tego projektu powinna dostarczyć kompleksowych danych dotyczących funkcjonowania ryzobiów w warunkach glebowych i podczas symbiozy z koniczyną, jak również ich zdolności adaptacyjnych do stresu temperaturowego. Dodatkowym efektem realizacji tego projektu może być identyfikacja szczepów o wysokiej konkurencyjności i efektywności symbiotycznej.

Zróżnicowanie genetyczne izolatów zostanie określone w oparciu o profile plazmidowe, analizy PCR-RFLP regionu międzygenowego 16S-23S rRNA i analizy sekwencji genów podstawowego metabolizmu i wybranych genów symbiotycznych. Profile metaboliczne szczepów zostaną ustalone przy użyciu płytek Biolog, zaś przeżywalność i wzrost bakterii w różnych temperaturach, zdolność adhezji i tworzenia biofilmu przy użyciu bakterii wyznakowanych markerami genetycznymi *gfp* i *dsRed* oraz mikroskopu fluorescencyjnego i pomiarów spektrofotometrycznych. Symbiotyczne właściwości szczepów zostaną określone w testach roślinnych z użyciem koniczyny jako gospodarza roślinnego. Ponadto, zostanie wykonana analiza porównawcza transkryptomów i proteomów wybranych szczepów z obu kolekcji hodowanych w optymalnej i niskiej temperaturze, a uzyskane wyniki pozwolą na zidentyfikowanie genów i białek uczestniczących w przystosowaniu ryzobiów do tego czynnika abiotycznego i ustalenia różnic w odpowiedzi stresowej pomiędzy szczepami z dwóch stref klimatycznych.

Podsumowując, dane uzyskane z realizacji tego projektu przyczynią się do lepszego poznania symbiotycznych oddziaływań ryzobiów z roślinami bobowatymi i identyfikacji wysoce efektywnych szczepów, co może w przyszłości zwiększyć zastosowanie tych bakterii w zrównoważonym rolnictwie i przyczynić się do wzrostu produktywności roślin i jakości uzyskiwanych plonów.