

SPRAWOZDANIE Z REALIZACJI BADAŃ NA RZECZ POSTĘPU BIOLOGICZNEGO W PRODUKCJI ROŚLINNEJ W ROKU 2016

Zadanie 26: Identyfikacja czynników determinujących odporność jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) na suszę i mróz

Dotacja MRiRW HOR hn-801-Pb-8/16

Celem projektu jest analiza biochemicznych podstaw adaptacji jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) do temperatur mrozowych oraz suszy glebowej i identyfikacja czynników mających największy wpływ na poziom odporności na badane stresy. W obliczu dynamicznych zmian klimatycznych, postępującej degradacji środowiska naturalnego oraz wymogów nowoczesnych systemów rolniczych, poszerzenie wiedzy dotyczącej mechanizmów determinujących odporność na suszę i mróz może mieć istotne znaczenie dla uprawy tego gatunku.

We wszystkich zadaniach badawczych realizowanych w roku 2016 wykorzystane zostało dziesięć linii DH jęczmienia ozimego, o zróżnicowanym poziomie odporności na mróz i suszę glebową, wyselekcjonowanych na podstawie wyników uzyskanych w drugim roku realizacji projektu (2015).

Temat badawczy 1: Analizy proteomiczne linii DH jęczmienia ozimego skrajnie zróżnicowanych pod względem odporności na suszę i mróz - zmiany indukowane pod wpływem suszy glebowej

Celem tematu badawczego 1 był rozdział, selekcja i identyfikacja białek różnicujących linie DH jęczmienia ozimego o zróżnicowanym poziomie tolerancji na suszę glebową występującą w fazie kłoszenia. W ramach tego tematu przeprowadzono również identyfikację białek wyselekcjonowanych w roku 2015, różnicujących linie DH o różnym poziomie tolerancji na temperatury mrozowe. Analiza adnotacji funkcjonalnych zidentyfikowanych białek pozwoliła na określenie procesów i mechanizmów determinujących poziom tolerancji jęczmienia ozimego na mróz i suszę glebową.

Próbki (liście o łącznej masie 0,5 g, 3 próby z 6 roślin) do analiz proteomicznych pobierano z roślin po 3 tygodniach wzrostu w warunkach suszy glebowej (35% połowej pojemności wodnej (ppw)) aplikowanej w fazie kłoszenia. Kontrolę stanowiły rośliny rosnące w warunkach optymalnego nawodnienia (75% ppw).

Białka wyekstrahowano metodą fenolową i rozdzielono za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej (2DE). Analizy uzyskanych elektroforegramów wykonywano w programie PDQuest 8.0 (Bio-Rad). Wybrane białka najsilniej różnicujące badane linie DH, zostały poddane trawieniu trypsyną, wyekstrahowane i identyfikowane metodą MALDI-TOF. Identyfikację białek przeprowadzono techniką Peptide Mass Fingerprinting (PMF) z wykorzystaniem widm MS/MS. Bazy danych przeszukiwano wykorzystując oprogramowanie Mascot 2.4 (Matrix Science, England, <http://www.matrixscience.com>).

Wykazano, iż badane linie DH jęczmienia ozimego charakteryzują się istotnym zróżnicowaniem proteomu zarówno w roślinach kontrolnych, jak i w roślinach rosnących w warunkach stresu suszy glebowej oraz w roślinach poddanych hartowaniu na mróz. Obserwowane różnice miały w przeważającej większości charakter ilościowy, co sugeruje ewolucyjne przystosowanie do niekorzystnych czynników środowiskowych.

Większość puli zidentyfikowanych białek różnicujących linie DH o różnym poziomie tolerancji na suszę i mróz związana jest z procesem fotosyntezy. W badanym materiale

oznaczono dwie izoformy A i B aktywazy RuBisCO. Zidentyfikowano również białko strukturalne dużej podjednostki RuBisCO, na której znajduje się centrum aktywne enzymu. Kolejne zidentyfikowane białka (transketolaza, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu, kinaza fosfoglicerynowa i fosfataza sedoheptulozo-1,7-bisfosforanowa) uczestniczą w cyklu Calvina. Zidentyfikowano również białko OEE1 (oxygen-evolving enhancer protein 1) powiązane z fotosystemem II, a więc uczestniczące w reakcjach fazy świetlnej procesu fotosyntezy. W reakcji na hartowanie istotne zmiany w akumulacji obserwowano w przypadku białek związanych z metabolizmem energetycznym (fosfogliceromutaza zależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu, izomeraza triozofosforanowa, dehydrogenaza jabłczanowa, urydylotransferaza utp-glukozy-1-fosforanowa, karboksylaza fosfoenolpirogronianowa i fruktozo-1,6-bisfosfataza). Dwa z nich (izomeraza triozofosforanowa i dehydrogenaza jabłczanowa) wydają się pełnić istotną funkcję również w odpowiedzi na stres związany z deficytem wody.

Wśród zidentyfikowanych białek znalazły się również białka typowe dla reakcji obronnych. Akumulowane pod wpływem deficytu wody: S-transferaza glutationowa i oksydaza poliaminowa biorą udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny, którego występowanie związane jest z generowaniem reaktywnych form tlenu.

Spora pula zidentyfikowanych białek uczestniczy w procesach syntezy, przemianach potranslacyjnych i metabolizmie białek. Począwszy od transkrypcji (2'-metylotransferaza guanino-tRNA) i dojrzewania RNA (chloroplast stem-loop binding protein), translacji (białka L12-3, L19-1, S3 i Sa2, ribosomal-recycling factor), modyfikacjach potranslacyjnych (β -1,3-galaktozylotransferaza) i transporcie (białka MCF), a skończywszy na procesie degradacji (PLCPs, cynkowa metaloproteinaza).

W procesie hartowania na mróz istotne znaczenie wydaje się posiadać również aktywna, białko wchodzące w skład mikrofilamentów tworzących cytoszkielet komórkowy. Zarówno niska temperatura jak i dehydratacja wywołuje reorganizację cytoszkieletu aktynowego, co stanowi sygnał uruchamiający reakcje obronne przystosowujące komórkę do niekorzystnych czynników środowiskowych.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M, (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68: 850-858

Temat badawczy 2: Analiza endogennej zawartości kwasu abscysynowego (ABA) – zmiany indukowane pod wpływem hartowania oraz suszy glebowej

Cel tematu badawczego 2 było określenie roli kwasu abscysynowego (ABA) w nabywaniu tolerancji na mróz i suszę glebową u jęczmienia ozimego.

Próbki (liście o łącznej masie 0,5 g, 2 próby z 6 roślin) do analiz pobierano z siewek w fazie 3-4 liści poddanych hartowaniu na mróz (3 tyg. w 4/2°C, fotoperiod 9/15h (dzień/noc)) oraz z roślin znajdujących się w fazie kłoszenia po 3 tygodniach wzrostu w warunkach suszy glebowej (35% polowej pojemności wodnej (ppw)). Kontrolę stanowiły odpowiednio siewki niehartowane oraz rośliny rosnące w warunkach optymalnego nawodnienia (75% ppw).

Zawartość ABA zmierzono pośrednią immunometodą ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) wg zmodyfikowanego protokołu Walker-Simmons i Abrams (1991) z zastosowaniem monoklonalnych, specyficznych przeciwciał MAC 252 (Babraham Technix, Cambridge, UK).

Zawartość ABA w siewkach jęczmienia ozimego wybranych linii DH w fazie 3-4 liści wynosiła od 1,1 do 2,4 nmol g⁻¹ s.m. Pod wpływem niskiej temperatury (3 tygodnie w 4°C) nastąpił istotny spadek, (średnio o 33%) zawartości tego hormonu. Zawartość ABA w hartowanych siewkach wynosiła 1,1-1,5 nmol g⁻¹ s.m. i nie była istotnie zróżnicowana.

Analiza korelacji pomiędzy konstytutywną zawartością ABA i poziomem mrozoodporności badanych linii DH wykazała, że obie cechy są istotnie ujemnie skorelowane ($r=-0,655$). Wykazano również, iż po usunięciu danych dla jednej z badanych linii DH (łamacz korelacji) względna zawartość ABA (% kontroli) w liściach po hartowaniu siewek koreluje dodatnio w stopniu umiarkowanym i statystycznie istotnie z poziomem tolerancji na mróz ($r=0,718$, $p\leq 0,05$).

Zawartość ABA w liściach roślin w fazie kłoszenia, rosnących w warunkach optymalnego nawodnienia (75% ppw), wynosiła od 1,53 do 2,62 nmol g⁻¹ s.m i nie była istotnie zróżnicowana. Wynikiem suszy glebowej była intensywna akumulacja ABA. Po 3 tyg. wzrostu w warunkach deficytu wody (35% ppw) zawartość ABA wynosiła od 10,01 do 20,12 nmol g⁻¹ s.m.). Poziom akumulacji był istotnie uzależniony od cech genotypowych.

Zawartość ABA w siewkach po zakończeniu procesu hartowania wydaje się nie mieć istotnego znaczenia w odniesieniu do osiąganego poziomu tolerancji na mróz badanych linii DH jęczmienia ozimego. Istotne znaczenie wydaje się mieć natomiast konstytutywny poziom ABA oraz amplituda zmian indukowanych działaniem niskiej temperatury. Być może odzwierciedla ona ogólny stopień wrażliwości danego genotypu na stropy środowiskowe. Podobnie, zawartość ABA w liściach kłoszących się roślin rosnących w warunkach suszy glebowej wydaje się odzwierciedlać raczej poziom stresu niż poziom tolerancji na ten czynnik stresowy.

Walker-Simmons MK, Abrams SR (1991) Use of ABA immunoassays. W: Davies WJ, Jones HG (red) Abscisic acid, physiology and biochemistry. Bios Scientific Publishers, Oxford, str. 53-63

Temat badawczy 3: Analiza aktywności enzymatycznego (SOD, CAT, POX) i niskocząsteczkowego systemu antyoksydacyjnego – zmiany indukowane pod wpływem hartowania

Celem tematu badawczego 3 było określenie roli jaką odgrywa system antyoksydacyjny w nabywaniu tolerancji na mróz i suszę glebową u jęczmienia ozimego. W roku 2016 przeprowadzono analizę zmian indukowanych pod wpływem hartowania, skutkującego nabywaniem odporności na mróz.

Próbki (liście o łącznej masie 0,3 g, 3 próby biologiczne z 6 roślin) pobrano z roślin po 3 tygodniach wzrostu w warunkach suszy glebowej (35% ppw.). Kontrolę stanowiły liście pobierane z roślin rosnących w warunkach optymalnego uwodnienia.

Zebrane próbki zhomogenizowano w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,0) z dodatkiem 1 mmol dm⁻³ EDTA w 4°C, a następnie odwirowano (14 000 rpm, 3 min.). Zawartość białka w ekstrakcie oznaczono metodą Bradford (1976).

Aktywność dysmutazy anionorodnika aponadtlenkowego (SOD) zmierzono spektrofotometrycznie metodą Minami i Yoshikawa (1979). Pomiar wykonano przy $\lambda = 540$ nm na spektrofotometrze Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 20, przy użyciu oprogramowania UV KinLab.

Aktywność katalazy (CAT) zmierzono poprzez pomiar szybkości rozkładu H₂O₂ metodą opracowaną przez Aebi (1984). Aktywność enzymu zmierzono spektrofotometrycznie przy $\lambda=240$ nm, przyjmując za jednostkę aktywności ilość enzymu, która rozkłada 1 μ M H₂O₂, co odpowiada spadkowi 0,0145 absorbancji w ciągu jednej minuty, w przeliczeniu na 1 mg białka.

Aktywność peroksydazy niespecyficznej (POX) oznaczono poprzez pomiar ilości produktów oksydacji p-fenylenodiaminy w obecności H₂O₂ wg. Bergmeyer (1965). Aktywność enzymu

zmierzono spektrofotometrycznie przy $\lambda=460$ nm i wyrażono jako spadek absorbancji w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na mg białka.

Całkowitą aktywność antyoksydantów niskocząsteczkowych zmierzono wg protokołu Brand-Williams i wsp. (1995) przy zastosowaniu 0,5 mM stabilnych wolnych rodników 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) w metanolu. Absorbancję zmierzono czytnikiem płytek mikrotitracyjnych Model 680 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) przy $\lambda=515$ nm po 30 min w 37°C.

Przeprowadzone analizy wykazały, że aktywność SOD była uzależniona zarówno od genotypu jak i warunków wzrostu jęczmienia ozimego oraz interakcji obu czynników. W siewkach rosnących w warunkach kontrolnych aktywność SOD wynosiła od 66,4 do 77,0 U/ml. Proces hartowania na mróz wywołał zróżnicowaną reakcję, której kierunek uzależniony był od cech genotypowych. Istotny wzrost aktywności enzymu obserwowano u czterech linii DH (o średnio 3,5 U/ml) i spadek u trzech kolejnych (o 5,67 U/ml). U pozostałych linii DH nie stwierdzono istotnych zmian aktywności SOD. Jednakże z jednym wyjątkiem (DH602) wszystkie bardziej tolerancyjne na mróz linie DH charakteryzowały się istotnie wyższą aktywnością tego enzymu po zakończeniu procesu hartowania, w porównaniu do linii o wysokiej wrażliwości na temperatury mrozowe.

Proces hartowania drastycznie obniżył aktywność CAT u wszystkich badanych linii DH jęczmienia ozimego. Średnio, aktywność tego enzymu zmalała o ponad 45% wartości charakterystycznej dla warunków kontrolnych. Obserwowana amplituda zmian była istotnie wyższa dla linii DH o niższej tolerancji na temperatury mrozowe.

Podobną zależność zaobserwowano analizując zmiany aktywności peroksydazy niespecyficzej (POX). Wprawdzie odwrotnie niż w przypadku CAT, aktywność enzymu u większości badanych linii rosła pod wpływem hartowania (średnio z 2,86 do 3,36 nmol/min/mg białka), jednak charakterystyczną cechą różnicującą linie o istotnie różnej wrażliwości na mróz była wyraźna wyższa stabilność tego enzymu u tolerancyjnych linii DH.

Zakres zmienności konstytutywnej sumarycznej aktywności antyoksydantów niskocząsteczkowych w siewkach badanych linii DH wyniósł od 7,9 do 16,3 $\mu\text{mol Trolox/g s.m}$ i był istotnie uzależniony od czynników genotypowych. Nie wykazano natomiast istotnego wpływu niskiej temperatury. Dla większości badanych linii obserwowane zmiany były genotypowo specyficzne i statystycznie nieistotne.

Analiza uzyskanych wyników wykazała, iż aktywność enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego ma istotne znaczenie dla poziomu tolerancji na mróz jęczmienia ozimego, uzyskiwanego po hartowaniu w temperaturach chłodowych. Natomiast, aktywność antyoksydantów niskocząsteczkowych wydaje się być czynnikiem genotypowo-specyficznym, o mniejszym znaczeniu dla uruchamianych reakcji obronnych.