

## SPRAWOZDANIE Z REALIZACJI BADAŃ NA RZECZ POSTĘPU BIOLOGICZNEGO W PRODUKCJI ROŚLINNEJ W ROKU 2017

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

#### **Dotacja MRiRW HOR.hn.802.19.2017**

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.

W obu tematach badawczych realizowanych w roku 2017 jako obiekt badań wykorzystano dziesięć linii DH jęczmienia ozimego, o zróżnicowanym poziomie odporności na mróz i suszę glebową, wyselekcjonowanych w drugim roku realizacji projektu (2015).

Uzyskane wyniki analizowano przy pomocy programu STATISTICA 10 (Stat Soft Inc., USA). Do oceny efektów zmiennych niezależnych wykorzystano analizę wariancji ANOVA dla układów czynnikowych. Istotność zróżnicowania pomiędzy obiektami określono za pomocą wielokrotnego testu Duncana ( $p \leq 0,05$ ).

#### ***Temat badawczy 1: Analiza endogennej zawartości kwasu salicylowego (SA) – zmiany indukowane pod wpływem hartowania oraz suszy glebowej***

*Celem tematu badawczego* było określenie roli kwasu salicylowego w procesach nabywania tolerancji na temperatury mrozowe oraz suszę glebową u jęczmienia ozimego.

*Materiał i metody:* Próbkę (liście o łącznej masie 0,3 g, 3 próby z 6 roślin każda) pobrano: z siewek w fazie 3-4 liści po 3 tygodniach hartowania w temperaturze 4/2°C (1) oraz z roślin w fazie kłoszenia po 3 tygodniach wzrostu w warunkach suszy glebowej (35% ppw, (2)). Kontrolę stanowiły liście pobierane siewek nie hartowanych (ad.1) oraz z roślin rosnących w warunkach optymalnego nawadniania (75% ppw, (ad.2)). Próbkę zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do momentu analiz.

Zawartość SA oznaczono metodą HPLC (Balcke i wsp. 2015). Pobrane próby zhomogenizowano, wyekstrahowano w metanolu i oczyszczono na kolumnach SPE Oasis MCX 1 cc/30 mg (Waters, Milford MA, USA), a następnie rozdzielono za pomocą aparatu Agilent Technologies 1260 wyposażonego w spektroskop masowy 6420 ze źródłem jonów ESI. Rozdziały wykonano metodą elucji gradientowej z mieszaniną wody i acetonitrylu z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego, przy użyciu kolumny HPLC Supelco Ascentis RP-Amide (7.5 cm × 4.6 mm, 2.7 μm). Analizowano dwa najbardziej obfite jony MRM. Stężenia SA obliczono na podstawie dziesięciopunktowej krzywej kalibracyjnej z wykorzystaniem standardów analitycznych produkcji Olchemim (Olomouc, Republika Czeska).

*Wyniki:* Zawartość SA w siewkach (faza 3-4 liści) badanych linii DH jęczmienia ozimego była istotnie uzależniona od genotypu rośliny i wynosiła od 0,68 do 3,83 ng g<sup>-1</sup> św.m. Wykazano, że średnia zawartość tego hormonu była istotnie wyższa dla linii DH o wyższym poziomie

tolerancji na mróz w stosunku do genotypów wrażliwych (test Duncana przy  $p \leq 0.05$ ). U większości badanych linii DH, proces hartowania (3 tyg. w  $4/2^{\circ}\text{C}$  (dzień/noc)) wywołał istotny, prawie 2-krotny spadek zawartości SA (z 1,76 do 0,80  $\text{ng g}^{-1}$  św.m.). Odmianą reakcję zaobserwowano jedynie w przypadku linii DH65. Nie wykazano związku pomiędzy zawartością SA w liściach siewek hartowanych a poziomem tolerancji na mróz.

W porównaniu do siewek, średnia zawartość SA w liściach roślin jęczmienia ozimego znajdujących się w generatywnej fazie rozwoju była istotnie, ponad 5,5-krotnie wyższa i w zależności od genotypu rośliny wynosiła od 1,9 do 24,9  $\text{ng g}^{-1}$  św.m.. Zawartość SA była najwyższa w liściach roślin linii DH o najwyższej tolerancji na suszę, nie wykazano jednak istotnego zróżnicowania w stosunku do linii DH wrażliwych na suszę. Statystycznie istotny wpływ suszy na zawartość SA zaobserwowano jedynie w przypadku linii DH o wysokim poziomie tolerancji na ten czynnik stresowy. Zastosowane traktowanie (3 tyg. w 35% ppw.) wywołało istotny spadek zawartości tego hormonu, średnio z 15,5 do 4,5  $\text{ng g}^{-1}$  św.m.

*Podsumowanie i Wnioski:* Wykazano specyficzną dla linii DH jęczmienia ozimego o wysokim poziomie tolerancji na badane stresy zmianę zawartości SA indukowaną w roślinach w warunkach stresu suszy oraz pod wpływem hartowania na mróz. W obu przypadkach genotypy o najwyższym poziomie tolerancji charakteryzował wysoki poziom SA w roślinach kontrolnych rosnących w warunkach fizjologicznie optymalnych oraz istotny spadek zawartości tego hormonu pod wpływem stresu. Sugeruje to, iż tolerancja na badane czynniki stresowe ma charakter cechy konstytutywnej, determinowanej między innymi przez endogenne poziomy substancji hormonalnych (SA) akumulowanych w roślinach w warunkach fizjologicznie optymalnych.

V., Bergau N., Fichtner M., Henning A., Stellmach H., Tissier A., Hause B., Frolov A. 2012. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. *Plant Methods* 8: 47.

### ***Temat badawczy 2: Analiza aktywności enzymatycznego (SOD, CAT, PEX) i drobnocząsteczkowego systemu antyoksydacyjnego ozimego – zmiany indukowane pod wpływem suszy glebowej***

*Celem tematu badawczego* było określenie roli jaką odgrywa system antyoksydacyjny w tolerancji na suszę glebową u jęczmienia ozimego. Porównanie zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych i antyoksydantów drobnocząsteczkowych indukowanych pod wpływem deficytu wody u wyselekcjonowanych linii DH pozwoliło na stwierdzenie w jakim stopniu system antyoksydacyjny jest zaangażowany w indukcję reakcji obronnych determinujących poziom tolerancji na ten czynnik stresowy.

*Materiał i metody:* Próbkę (liście o łącznej masie 0,5 g, 3 próby biologiczne z 6 roślin każda) pobrano z roślin po 3 tygodniach wzrostu w warunkach suszy glebowej (35% ppw). Kontrolę stanowiły liście pobierane z roślin rosnących w warunkach optymalnego nawodnienia (75% ppw.). Próbkę zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do momentu analiz.

Próbki do analiz enzymatycznych zhomogenizowano w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,0) z dodatkiem 1  $\text{mmol dm}^{-3}$  EDTA w  $4^{\circ}\text{C}$ . Zawartość białka w ekstrakcie oznaczono metodą Bradford (1976).

Aktywność SOD zmierzono spektrofotometrycznie metodą Minami i Yoshikawa (1979). Mieszanina reakcyjna składała się z buforu 50 mM TRIS – sól sodowa kwasu kokodylowego, (pH 8,2), 0,1 mM EDTA, 1,4 % ( v / v) Triton X -100, 0,055 uM NBT i 16 pM pirogalolu. Aktywność enzymu zmierzono po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej ekstraktu roślinnego. Pomiar wykonano przy  $\lambda = 540$  nm na spektrofotometrze Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 20, przy użyciu oprogramowania UV KinLab. Jednostka aktywności (50 % hamowania) została określona wg. McCord i Fridovich (1969).

Aktywność CAT zmierzono poprzez pomiar szybkości rozkładu  $H_2O_2$  metodą Aebi (1984). Mieszanina reakcyjna składała się ze zbuforowanego  $H_2O_2$ , do którego dodano ekstrakt tkankowy. Aktywność enzymu zmierzono spektrofotometrycznie przy  $\lambda=240$  nm, przyjmując za jednostkę aktywności taką ilość enzymu, która rozkłada 1  $\mu$ M  $H_2O_2$ , co odpowiada spadkowi 0,0145 absorbancji w ciągu jednej minuty, w przeliczeniu na 1 mg białka.

Aktywność peroksydaz niespecyficznych oznaczono poprzez pomiar ilości produktów oksydacji p-fenylendiaminy w obecności  $H_2O_2$  wg. Bergmeyer (1965). Mieszanina reakcyjna składała się z buforu ekstrakcyjnego, 0,5% p-fenylendiaminy, ekstraktu tkankowego i zbuforowanego  $H_2O_2$ . Aktywność enzymu zmierzono spektrofotometrycznie przy  $\lambda=460$  nm i wyrażono jako spadek absorbancji w ciągu 1 minuty w przeliczeniu na 1 mg białka.

Całkowitą aktywność antyoksydantów drobnocząsteczkowych zmierzono metodą DPPH (Brand-Williams i wsp. 1995). Materiał roślinny zliofilizowano, rozdrobniono w młynku kulowym MM400 (Retsch) i po dodaniu 1 ml sterylnej wody redestylowanej wytrząsano przez 24h w 4°C, a następnie odwirowano (20 min, 18000  $\times$  g). Jako mieszaninę reakcyjną zastosowano roztwór 0,5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, SIGMA) w metanolu. Absorbancję zmierzono czytnikiem płytek mikrotitracyjnych (Bio-Rad Laboratories, Inc.) przy  $\lambda=515$  nm, po 30 min reakcji, w 37°C.

*Wyniki:* W obrębie badanej populacji linii DH jęczmienia ozimego wykazano istotne różnicowanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz nie-enzymatycznych antyoksydantów drobnocząsteczkowych mierzonych w liściach kłoszących się roślin. Istotne różnice obserwowano zarówno w roślinach rosnących w warunkach optymalnego nawodnienia (kontrola) jak i w warunkach suszy glebowej. Aktywność systemu antyoksydacyjnego uzależniona była od genotypu rośliny, warunków środowiskowych i interakcji pomiędzy tymi czynnikami.

W warunkach kontrolnych, aktywność SOD wynosiła od 67.1 do 77.8 U ml<sup>-1</sup> i nie wykazywała związku z poziomem tolerancji na suszę. Efekt oddziaływania suszy glebowej (3 tyg., 35% ppw) uzależniony był od czynników genotypowych. Jednakże, podczas gdy dla linii DH o niskim poziomie tolerancji na suszę aktywność enzymu uległa drastycznemu spadkowi, dla linii DH o najwyższym poziomie tolerancji aktywność SOD wzrosła lub nie uległa zmianie.

W roślinach kontrolnych wszystkich badanych linii DH jęczmienia ozimego wykazano podobną aktywność CAT (1.32-1.47 mmol  $H_2O_2$  min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>), nie związaną z poziomem tolerancji na suszę. Istotnym różnicowaniem aktywności CAT charakteryzowały się natomiast liście roślin rosnących w warunkach stresu suszy. Tylko w przypadku trzech linii DH (DH534, DH561, DH61), w tym dwóch o najwyższym poziomie tolerancji na suszę, deficyt wody w podłożu nie wywołał spadku aktywności CAT. Istotne znaczenie wydaje się również posiadać amplituda obserwowanych zmian: największa, w przypadku linii DH wrażliwych na suszę.

Suboptymalne uwodnienie gleby spowodowało wzrost aktywności POX w liściach większości badanych linii DH jęczmienia ozimego, średnio z 1.26 do 1.82 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>. Efekt ten uzależniony był od genotypu rośliny, ale wydaje się również być związany z poziomem tolerancji na suszę. Startując od bardzo zbliżonego poziomu aktywności POX w roślinach kontrolnych rosnących w warunkach optymalnego nawodnienia, aktywność POX po 3-tygodniowym okresie deficytu wody była istotnie wyższa u linii DH wrażliwych na suszę.

W warunkach optymalnego nawodnienia, badane linie DH jęczmienia ozimego wykazywały istotne zróżnicowanie aktywności antyoksydantów drobnocząsteczkowych, przy czym istotnie wyższą aktywnością antyoksydacyjną charakteryzowały się linie DH wrażliwe na stres suszy. W reakcji na suszę aktywność antyoksydacyjna u większości analizowanych linii DH istotnie spadła, do zbliżonych wartości (6.0-6.4 μmol Trolox g<sup>-1</sup> s.m), nie wykazując istotnego związku z poziomem tolerancji na stres suszy.

*Podsumowanie i Wnioski:* Najbardziej istotnym elementem tolerancji na suszę wydaje się być zdolność od podtrzymania relatywnie wysokiej aktywności enzymów antyoksydacyjnych SOD i CAT, usuwających RFT i chroniących rośliny przed skutkami stresu oksydacyjnego. Rola POX i drobnocząsteczkowych antyoksydantów wydaje się mniej istotna.

Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Metz. Enzymol.* 105: 121-12.

Bergmeyer HU (1965) *Methods of enzymatic analysis.* Verlag Chemie GMBH Weinheim/Bergstr., Academic Press, New York and London.

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995) Use of a Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Food Sci. Technol.-Lebensm.-Wiss. Technol.* 28: 25-30.

McCord JM, Fiodovich I (1969) Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuperein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.

Minami M, Yoshikawa H (1979) A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clinica Chimica Acta* 92: 337-342.