

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

Nr decyzji HOR hn-801-PB-13/15

Miejsce realizacji: Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego, PAN w Krakowie

Kierownik tematu: dr hab. Iwona Żur, prof. nadzw. IFR PAN

Temat badawczy 1: Ocena stopnia odporności na mróz i suszę oraz selekcja form skrajnie zróżnicowanych w obrębie wyprowadzonej populacji linii podwojonych haploidów jęczmienia ozimego

Identyfikacja czynników determinujących tolerancję na suszę i mróz oraz opracowanie wiarygodnych procedur selekcji roślin o zwiększonej tolerancji na te czynniki stresowe mogą w znaczący sposób ograniczyć straty plonowania oraz zwiększyć areal uprawy jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.). Pierwszym etapem badań prowadzącym do tego celu było wyprowadzenie populacji podwojonych haploidów (DH) i selekcja materiałów, skrajnie zróżnicowanych pod względem odporności na suszę i mróz, które stanowiące będą obiekt badań w kolejnych tematach badawczych projektu. Celem tematu badawczego 1, w roku 2015 była końcowa selekcja linii DH, którą wykonano w oparciu o ocenę odporności roślin na suszę glebową występującą w fazie kłoszenia. Test przeprowadzono na 30 liniach DH jęczmienia ozimego, wyselekcjonowanych wstępnie na podstawie wyników uzyskanych w pierwszym roku realizacji projektu.

Doświadczenie wazonowe przeprowadzono w kontrolowanych warunkach komory szklarniowej. Przez okres 3 tygodni, rośliny rosły w warunkach suszy glebowej na poziomie 35% ppw, podczas gdy rośliny kontrolne rosły w glebie o wilgotności 75% ppw. Po zakończeniu okresu suszy wykonano pomiary potencjału osmotycznego soku komórkowego, zawartości wody w liściach, oraz pomiary szybkiej kinetyki indukcji fluorescencji chlorofilu. Na podstawie pomiarów fluorescencyjnych wykonano analizę OJIP wyliczając szereg parametrów charakteryzujących funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego.

Przeprowadzone analizy wykazały istotny spadek zawartości wody w liściach i towarzyszący mu wzrost potencjału osmotycznego soku komórkowego w reakcji na suszę glebową. Te parametry w połączeniu z wynikami uzyskanymi w trakcie pierwszego roku realizacji projektu stanowiły kryterium końcowej selekcji 8 linii DH o istotnym zróżnicowaniu odporności na suszę i mróz. Analiza statystyczna parametrów opisujących stosunki wodne oraz funkcjonowanie aparatu fotosyntetycznego przeprowadzona dla wyselekcjonowanych 8 linii DH nie wykazała istotnego zróżnicowania wśród roślin rosnących w warunkach optymalnych (kontrola). Stres suszy uwidoczniał istotne zróżnicowanie badanych genotypów pod względem większości analizowanych parametrów. Linie DH zidentyfikowane jako wrażliwe na stres suszy charakteryzowały się istotnie niższą zawartością wody w liściach, mniejszą liczbą aktywnych centrów reakcji (RC/CS_m) oraz istotnie niższą wydajnością energetyczną procesu fotosyntezy (mniejszą ilością energii wiązanej (TR_o/CS_m) i wykorzystywanej do transportu elektronów (ET_o/CS_m) oraz większą ilością energii rozpraszanej (DI_o/CS_m)). W efekcie linie te charakteryzowała istotnie niższa maksymalna wydajność fotochemiczna (F_v/F_m) i wskaźnik funkcjonowania (PI) fotosystemu II.

Temat badawczy 2: *Analizy proteomiczne linii DH jęczmienia ozimego skrajnie zróżnicowanych pod względem odporności na suszę i mróz - zmiany indukowane pod wpływem hartowania*

Jedną z kluczowych odpowiedzi roślin na niekorzystne czynniki środowiskowe jest zmiana profilu ekspresji genów i ich produktów białkowych. W warunkach stresu tempo biosyntezy większości białek spada, wyjątek stanowią tzw. białka stresowe, umożliwiające komórkom roślinnym przetrwanie niekorzystnych warunków i zapobiegających powstawaniu nieodwracalnych uszkodzeń. Celem tematu badawczego 2 była identyfikacja białek różnicujących wyselekcjonowane linie DH o różnym poziomie odporności na suszę i mróz, w roślinach rosnących w warunkach fizjologicznie optymalnych (kontrola) oraz w warunkach indukujących nabywanie odporności na temperatury mrozowe (hartowanie).

Materiał roślinny stanowiło osiem linii DH jęczmienia ozimego (DH65, DH158, DH363, DH534, DH561, DH575, DH584, DH602) wyselekcjonowanych z wyprowadzonej populacji na podstawie testów mrozoodporności i odporności na suszę w fazie kłoszenia.

Próbki (liście o łącznej masie 0,5 g) do analiz proteomicznych zostały pobrane po 3 tygodniach hartowania w temperaturze 4/2°C, przy fotoperiodzie 9/15h (dzień/noc). Analizy wykonano metodą elektroforezy dwuwymiarowej (2D-PAGE). Kontrolę stanowiły liście pobierane z roślin niehartowanych. Jako białka (plamki), których obecność związana jest z odpornością na temperatury mrozowe, wybrano te, których średnia gęstość optyczna (stężenie) wzrastała przynajmniej dwukrotnie, lub też te, które nie miały odpowiedników w żelach, w których rozdzielano białka z roślin rosnących w warunkach kontrolnych.

Przeprowadzone analizy porównujące profile białkowe roślin kontrolnych i hartowanych poszczególnych linii DH nie wykazały zmian jakościowych w wyselekcjonowanych genotypach. Wystąpiły natomiast znaczne różnice ilościowe białek indukowane w reakcji na proces hartowania, indukujący odporność na mróz. Linia o najwyższym poziomie odporności na mróz (DH65) charakteryzowała się największą ilością białek o podwyższonym poziomie ekspresji (21 plamek). Wykazano również istnienie zróżnicowania pomiędzy badanymi liniami DH, zarówno w roślinach kontrolnych jak i hartowanych, co sugeruje iż jednym z elementów różnicujących poziom odporności na badane czynniki stresowe może być zróżnicowany poziom ekspresji i aktywności białek komórkowych.