

Zad. 29

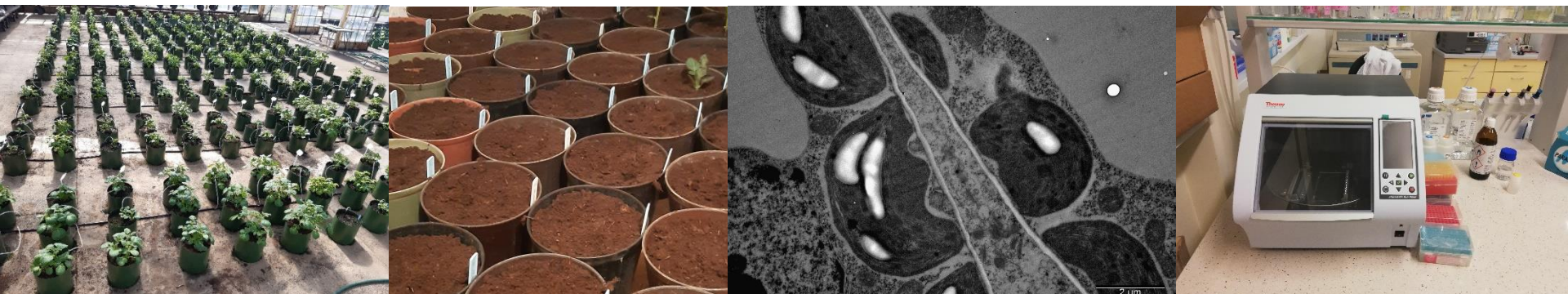
Poszukiwanie specyficznych reakcji warunkujących tolerancję genotypów ziemniaka na wysoką temperaturę i suszę

Wykonawcy:

Dominika Boguszevska-Mańkowska, Anna Bilska-Kos, Krzysztof Treder, Krystyna Zarzyńska, Cezary Trawczyński, Beata Wasilewska-Nascimento, Anna Pawłowska

okres realizacji zadania: 2021-2026

e-mail: d.boguszevska-mankowska@ihar.edu.pl



Cele projektu:

- Wytypowanie na podstawie wstępnych obserwacji genotypów, które wykazują cechy tolerancyjności na niekorzystne warunki środowiska t.j suszę i wysoką temperaturę
- Wytypowanie cech korzeni decydujących o większej odporności genotypów ziemniaka na suszę glebową
- Charakterystyka budowy anatomicznej liścia ziemniaka w celu zidentyfikowania zmian strukturalnych zachodzących pod wpływem suszy i wysokiej temperatury.
- Immunolokalizacja akwaporyn w liściach ziemniaka w warunkach suszy i wysokiej temperatury z zastosowaniem mikroskopu elektronowego
- Sprawdzenie czy wstępne traktowanie roślin ABA zwiększa odporność roślin ziemniaka na obydwa stresy
- Selekcja genów referencyjnych - takich, których poziom ekspresji nie zmieni się w liściach ziemniaka pod wpływem suszy i wysokiej temperatury.

Wszystkie cele zostały osiągnięte, mierniki zrealizowane



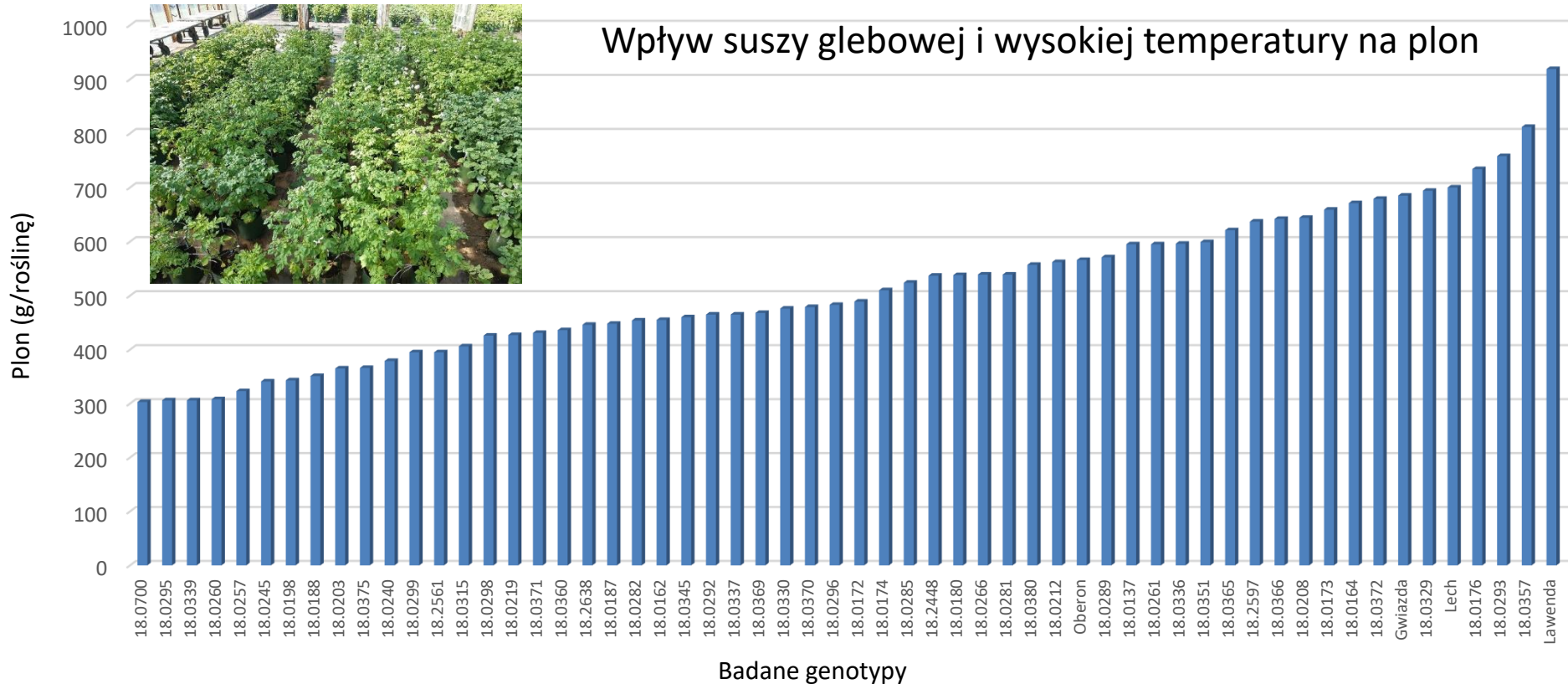
Materiał i metody:

- uprawa roślin ziemniaka w rękawach - wazonach wegetacyjnych, doniczkach
- ocena wskaźników morfologiczno-fizjologicznych roślin: masa liści, masa łodyg, powierzchnia asymilacyjna RWC, SPAD, ocena fluorescencji chlorofilu, wielkości i jakości plonu roślin; ocena parametrów systemu korzeniowego: świeża i sucha masa, stosunek root/sprout w początkowym okresie rozwoju roślin
- w celu przygotowania preparatów do mikroskopii świetlnej została zastosowana technika mrozeniowa oraz kriostat, testowano: czas inkubacji materiału w mieszaninie utrwalającej i rodzaj medium, w którym materiał był zamrażany w kriostacie oraz grubość skrawków
- w ramach optymalizacji metody przygotowania preparatów do mikroskopii elektronowej testowano: czas utrwalania materiału, skład mieszaniny utrwalającej oraz czas przesycania materiału z żywicą.
- Indukowana susza przez zastosowanie PEG 6000 w hodowli roślin ziemniaka *in vitro*, ilościowe oznaczanie aktywności ABA, analiza proteomu
- badano poziom ekspresji dziesięciu genów HKG kodujących mRNA



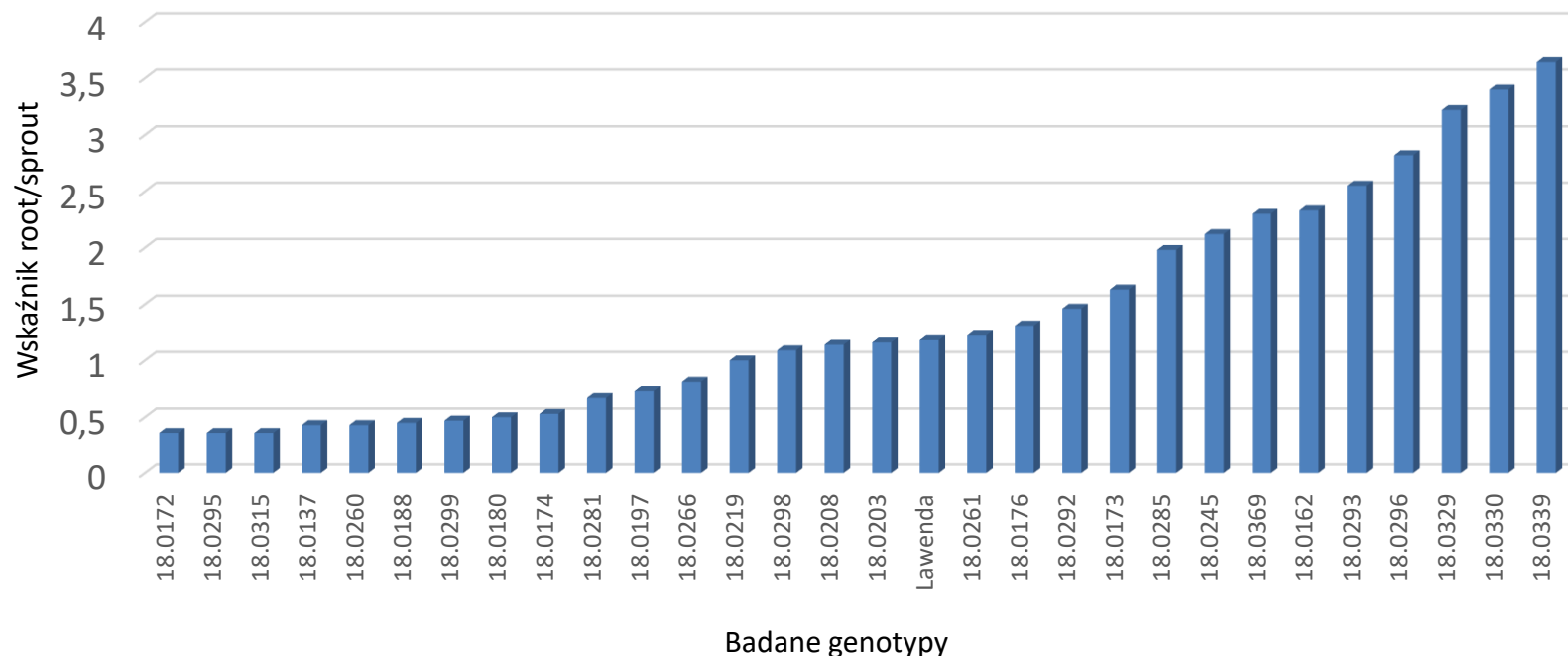
Zad. 1. Wybór nowych genotypów ziemniaka o podwyższonej tolerancyjności na stropy abiotyczne, analiza cech morfologiczno-fizjologicznych oraz ocena wielkości i jakości plonu.

Wpływ suszy glebowej i wysokiej temperatury na plon



Najniższy plon w warunkach stresu suszy i wysokiej temperatury obserwowano u genotypów: 18.0700; 18.0339; 18.0295; 18.0260; 18.0257; 18.0245; 18.0198; 18.0188; Najwyższy w warunkach stresów odnotowano dla następujących genotypów: 18.0357; 18.0293; 18.0176; 18.0329, 18.0372, 18.0164; 18.0173; 18.0208; 18.0366; 18.2597

Zad. 2. Badania zależności między częścią nadziemną a systemem korzeniowym roślin ziemniaka w warunkach suszy glebowej i wysokiej temperatury.

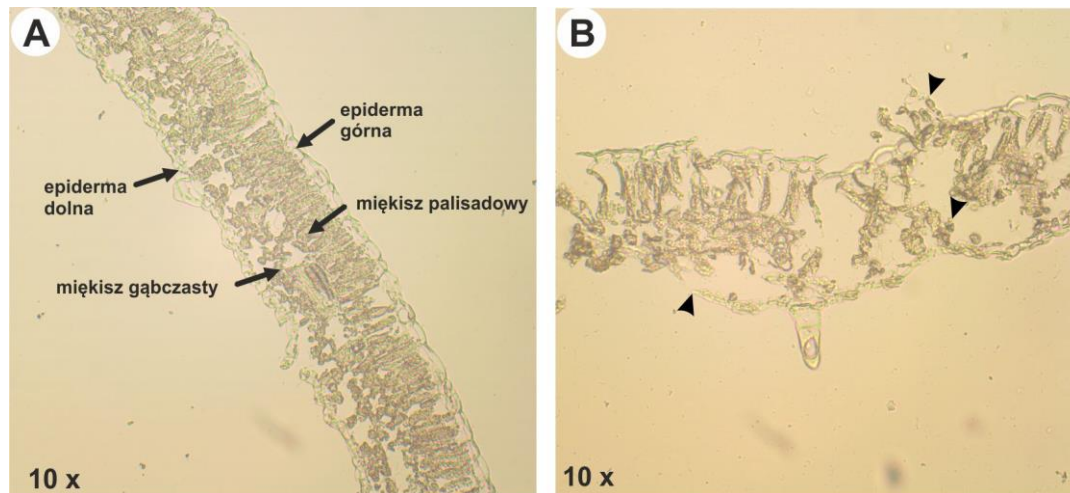


Przyjmując wielkość wskaźnika „root/sprout„ - stosunek masy korzeni do masy części nadziemnej, jako miernik tolerancyjności roślin na stresy abiotyczne, po pierwszym roku badań można wytypować jako najbardziej tolerancyjne następujące genotypy: 18.0339, 18.0330, 18.0329, 18.0296, 18.0293 i 18.0162

Zad. 3. Analiza budowy anatomicznej liści ziemniaka w warunkach suszy i wysokiej temperatury z zastosowaniem mikroskopu świetlnego oraz mikroskopu elektronowego.

W ramach optymalizacji metody przygotowania preparatów do mikroskopii świetlnej wybrano wariant, w którym zastosowano: 4-godzinny czas utrwalania materiału, medium Cryomatrix Clear do zamrażania w kriostacie oraz 10- μm grubość skrawków.

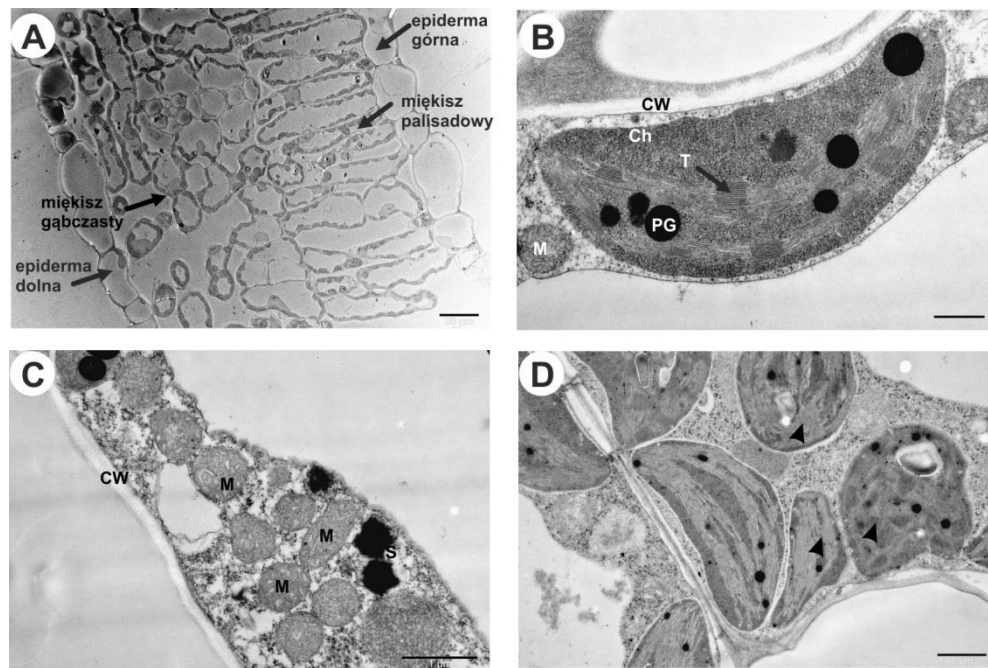
W tym wariantcie uzyskano najlepsze obrazy mikroskopowe, z zachowaniem „ciągłości” warstwy komórek górnej i dolnej epidermy oraz prawidłowym ułożeniem komórek miększu palisadowego i gąbczastego, bez występowania zaburzeń w budowie strukturalnej.



Przykładowe obrazy z mikroskopu świetlnego przedstawiające przekroje poprzeczne przez liście ziemniaka, odmiany Oberon. Groty wskazują na uszkodzenia tkanki w wariantach otrzymanych podczas pierwszych etapów optymalizacji procedury przygotowania materiału do mikroskopii świetlnej (B)

Zad. 4. Immunolokalizacja akwaporyn w liściach ziemniaka w warunkach suszy i wysokiej temperatury z zastosowaniem mikroskopu elektronowego.

W ramach optymalizacji metody przygotowania preparatów do mikroskopii elektronowej wybrano wariant, w którym materiał utrwalano przez 4 godziny w mieszaninie aldehydów (2 % paraformaldehyd i 0,5% aldehyd glutarowy), przesyconego w każdym stężeniu żywicy przez minimum 12 godz.



Przykładowe obrazy z mikroskopu elektronowego przedstawiające przekroje poprzeczne przez liście ziemniaka, odmiany Oberon (A, D) i Gwiazda (B, C). W wariacie wybranym w ramach optymalizacji otrzymano obrazy z dobrze zachowaną ścianą i błoną komórkową, ultrastrukturą komórek epidermy, mięszysz palisadowego oraz gąbczastego oraz ultrastruktury chloroplastów i mitochondriów. Groty wskazują na nieprawidłową ultrastrukturę chloroplastów (D).

Zad. 5. Synteza i dystrybucja ABA w roślinach ziemniaka w odpowiedzi na stres suszy i wysokiej temperatury.

W ramach optymalizacji metody przeprowadzenia doświadczenia z indukowaną suszą wybrano wariant pożywki: 1/2MS, agar 0,4%, sacharoza 3%. Czterdziestodniowe rośliny następnie przeniesiono do pożywki płynnej na 72h, stres indukowano przez zastosowanie PEG 6000. Analizowano następujące kombinacje: Kontrola: pożywka płynna 1/2MS, susza: 1/2MS, 10% PEG 6000, susza I: 1/2MS, 10% PEG 6000, 50uM ABA, kontrola 2: 1/2MS, 50uM ABA. Doświadczenie prowadzono dla dwóch odmian ziemniaka: Gwiazda i Oberon

Gwiazda



K ABA PEG PEG+ABA

Oberon



K ABA PEG PEG+ABA

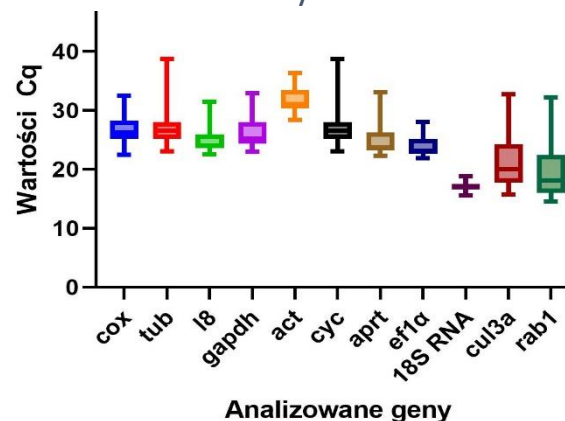
Po 72h największą różnicę wizualną obserwowano u odmiany Gwiazda w kombinacji zawierającej PEG i ABA.

Zad. 6. Analiza metabolitów, enzymów oraz poziomu ekspresji wybranych genów jako markerów tolerancji roślin ziemniaka na suszę glebową i wysoką temperaturę.

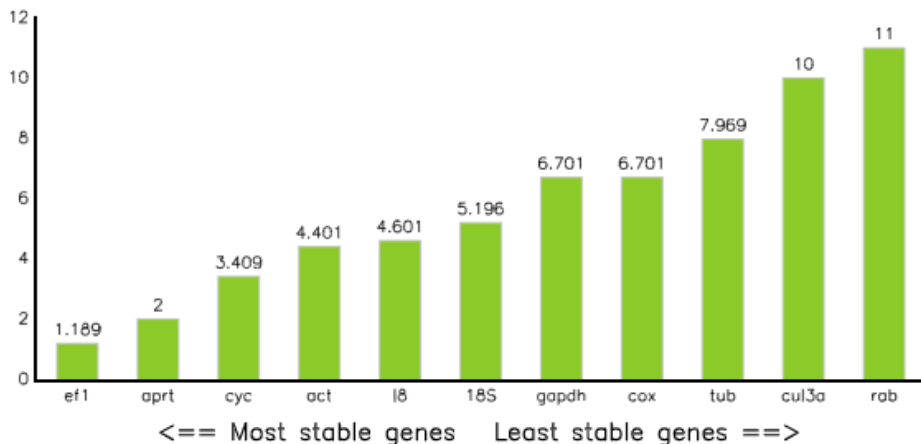
Badane geny:

1. Czynn timer elongacji 1 α (*ef1 α*),
2. aktyna (*act*),
3. tubulina (*tub*),
4. dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (*gapdh*),
5. fosforybozylotransferaza adenylową (*aprt*),
6. 60S białko rybosomalne L8 (*l8*),
7. Cullina 3A (*cul3*),
8. oksydaza cytochromową 1 (*cox*)
9. cyklofilina (*cyc*).
10. 18S RNA

Rys 1. Zakres zmian wartości Cq badanych genów. Prostokąty oznaczają zakres w którym mieści się 95% wartości Cq dla danego genu, a słupki błędów wyznaczają wartości minimalne i maksymalne.



Stabilność ekspresji genów oceniona na podstawie analizy wartości Cq za pomocą narzędzia RefFinder



Method	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Delta CT	ef1a	aprt	cyc	l8	act	gapdh	cox	tub	18S	cul3a	rab
BestKeeper	18S	ef1a	act	aprt	cyc	cox	l8	gapdh	tub	cul3a	rab
Normfinder	ef1a	aprt	cyc	l8	act	cox	gapdh	tub	18S	cul3a	rab
Genorm	aprt ef1a		cyc	l8	act	gapdh	tub	cox	18S	cul3a	rab
Recommend	ef1a	aprt	cyc	act	l8	18S	gapdh	cox	tub	cul3a	rab

Poziom ekspresji mRNA genu *rab18* w roślinach ziemniaka odmiany tolerującej (Gwiazda) i podatnej (Oberon) uprawianych w temperaturze pokojowej (21°C) i w warunkach stresu termicznego (38°C).

Rysunek 2 i tabela 1. Wartości podane na osi Y i w kolumnie Ekspresja oznaczają ile razy więcej mRNA genu *rab18* było w roślinach nie podlewanych (susza) w porównaniu do roślin podlewanych (kontrolnych).

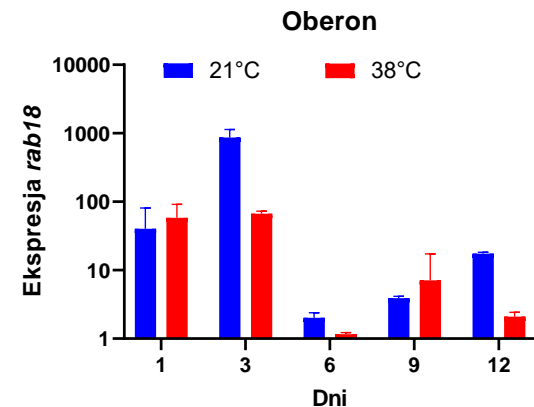
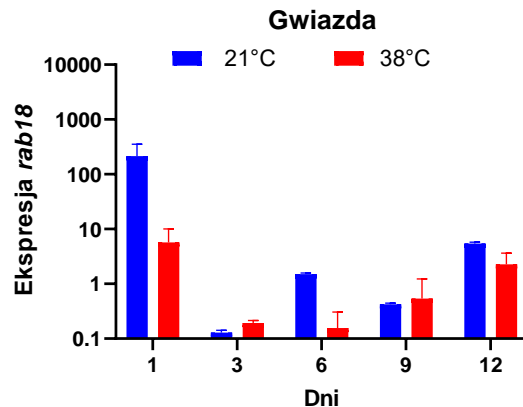


Tabela 2. Ekspresja mRNA *rab18* w roślinach odmiany Oberon w stosunku do ekspresji tego genu w odmianie Oberon.

dni	21°C	38°C
1	0,2	10,3
3	6706,2	346,4
6	1,3	7,4
9	9,1	13,2
12	3,2	0,9

Dni	Gwiazda				Oberon			
	21°C		38°C		21°C		38°C	
	Expresja	SD (+/-)	Expresja	SD (+/-)	Expresja	SD (+/-)	Expresja	SD (+/-)
1	215,37	136,71	5,70	4,36	40,25	40,79	58,40	33,46
3	0,13	0,01	0,19	0,02	865,03	266,94	66,80	5,78
6	1,50	0,07	0,16	0,15	2,01	0,38	1,17	0,06
9	0,43	0,02	0,54	0,69	3,89	0,26	7,10	10,26
12	5,45	0,28	2,28	1,35	17,49	0,79	2,09	0,34

- Optymalnymi genami referencyjnymi do normalizowania poziomu ekspresji genów indukowanych przez stresy suszy i wysokiej temperatury są geny *eF1α* oraz *APRT*.
- Stres suszy indukuje ekspresję genu *RAB18* w wyższym stopniu niż stres termiczny
- Poziom ekspresji genu *RAB19* jest generalnie wyższy u odmiany Oberon, ale jej szczyt występuje później niż u odmiany Gwiazda.