

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 59.

Tytuł zadania: **Badania tolerancji odmian ziemniaka na stresy abiotyczne w świetle postępujących zmian klimatycznych.**

Kierownik zadania: *prof. dr hab. K. Rykaczewska*

Cel podzadania I: Ocena tolerancji wybranych genotypów ziemniaka na wysoką temperaturę w różnych stadiach wegetacji roślin w warunkach suszy i optymalnej wilgotności gleby.

Materiał i metody:

Przeprowadzono doświadczenie wazonowe w hali wegetacyjnej i komorach wegetacyjnych z sześcioma odmianami ziemniaka: Miłek (bardzo wczesne), Gwiazda, Hubal (wczesne), Tetyda, Oberon (średnio wczesne). W okresie wegetacji rośliny czterokrotnie poddano 2-tygodniowemu stresowi podwyższonej temperatury (38/25°C) w warunkach suszy i optymalnej wilgotności gleby: I - w drugiej połowie maja; II - w pierwszej połowie czerwca; III - w drugiej połowie czerwca; IV - w pierwszej połowie lipca. Przed każdym okresem stresu abiotycznego i po jego zakończeniu określano stan fizjologiczny roślin. Po zakończeniu wegetacji w Kontroli (bez stresu abiotycznego) we wszystkich kombinacjach określono: plon końcowy, strukturę plonu, defekty fizjologiczne bulw oraz długość okresu spoczynku. Dodatkowo przeprowadzono doświadczenie w aeroponie w celu określenia rozwoju systemu korzeniowego 17 odmian ziemniaka. W okresie tuberyzacji określono cechy morfologiczne i anatomiczne korzeni.

Wyniki i dyskusja:

Rozwój roślin badanych odmian w momencie poddawania ich kolejnym stresom abiotycznym był zróżnicowany: I termin przypadał na okres przed tuberyzacją, II termin - na okres tuberyzacji, III termin - na okres początkowego wzrostu bulw a IV termin - na okres intensywnego wzrostu bulw. Powierzchnia asymilacyjna roślin w wymienionych terminach wynosiła średnio dla badanych odmian kolejno: 2841 cm², 7167 cm², 10023 cm² i 11403 cm². Stwierdzono istotny wpływ badanych abiotycznych czynników stresowych na stan fizjologiczny roślin w okresie wegetacji tuż po zakończeniu ich działania ((wysokość roślin, RWC- Relative Water Content, PI oraz Fv/Fm (parametry fluorescencji chlorofilu *a* świadczące o wydajności fotosyntezy), LAI - Leaf Area Index) oraz na plon końcowy, liczbę bulw, wielkość bulw i strukturę plonu. Najwyższym plonem w kombinacji kontrolnej charakteryzowała się odmiana Lord (2352 g/roślinę), a najniższym odmiana Hubal (1792g/roślinę). Plon pozostałych odmian w Kontroli wynosił: Tetyda - 2120 g/roślinę, Gwiazda - 2080 g/roślinę, Oberon - 2053 g/roślinę, Miłek - 1827 g/roślinę.

W momencie zbioru, który zgodnie z przyjętą metodyką miał miejsce po dojrzałości w Kontroli, rośliny poddane wcześniej abiotycznym czynnikom stresowym - wysokiej temperaturze i suszy wykazały znaczny stopień regeneracji i nie zakończyły jeszcze wegetacji. Powierzchnia asymilacyjna tych roślin wynosiła średnio 3078 cm² i była największa u odmiany Hubal - 4179 cm² (LAI 1,67). Wskazywało to na wystąpienie zjawiska wtórnej wegetacji.

Pod wpływem stresu wysokiej temperatury plon bulw uległ obniżeniu średnio do 82%, a pod wpływem stresu wysokiej temperatury i suszy łącznie średnio do 57%. Reakcja odmian zależna była od okresu występowania czynników stresowych. Największe obniżenie plonu pod wpływem wysokiej temperatury wystąpiło, gdy stres oddziaływał w II okresie (pierwsza połowa czerwca). Zaznaczył się najsilniej u odmiany Oberon, u której plon obniżył się do 67%. Łączny wpływ czynników stresowych był najbardziej szkodliwy dla odmiany Miłek (spadek plonu do 16%) oraz odmiany Lord (spadek plonu do 42%). Liczba bulw > 3 cm w plonie zwiększyła się pod wpływem wysokiej temperatury do 118% i była najwyższa u odmian bardzo wczesnych (Lord -140%, Miłek - 135%). II i III okres stresu był najbardziej szkodliwy dla tuberyzacji i dalszego wzrostu bulw.

Reakcja odmian zależna była od okresu występowania czynników stresowych. Stwierdzono zmniejszenie wielkości bulw w plonie średnio z 97 g w Kontroli do 67 g w kombinacji z podwyższoną temperaturą i do 57g w kombinacji z podwyższoną temperaturą i suszą łącznie. Największe różnice wystąpiły u odmian Miłek i Lord. Pod wpływem badanych czynników stresowych wystąpiło intensywne wiązanie bulw wielkości 1-3 cm. Było to dowodem na wtórną tuberyzację roślin badanych odmian ziemniaka.

Udział bulw z defektami fizjologicznymi w plonie był tym większy im wcześniej wystąpił stres abiotyczny. Reakcja odmian była zróżnicowana. Największy udział bulw zdeformowanych w plonie

wystąpił u odmiany Hubal – 40,0% w przypadku stresu wysokiej temperatury, a najmniejszy u odmiany Tetyda (średnio 3%). Najpoważniejszym defektem plonu była obecność bulw chronologicznie młodszych – niedojrzałych, z bardzo cienką skórką. Im wcześniej wystąpił stres abiotyczny, tym udział bulw chronologicznie młodszych w plonie był większy.

Spoczynek bulw badanych odmian w Kontroli kończył się między 5 września a 25 października. Stres wysokiej temperatury i suszy oddziałujący na rośliny w I i II okresie powodował wydłużenie spoczynku dochodzące do 54 dni (Tetyda), ale stres ten działający na rośliny w III i IV okresie spowodował znaczne skrócenie spoczynku bulw dochodzące do 46 dni (Miłek).

Rozwój systemu korzeniowego badanych odmian ziemniaka roślin rosnących w urządzeniu do aeroponicznej produkcji bulw był wysoce istotnie zróżnicowany. Długość korzeni 17 badanych odmian ziemniaka w czasie tuberyzacji (11 lipca) wynosiła średnio 82,6 cm i wahała się od 109,3 cm u odmiany Hubal do 44,0 cm u odmiany Miłek. Uszeregowanie odmian pod względem długości korzeni jest następujące: Hubal, Michalina, Kuba, Gandawa, Stasia, Denar, Etiuda, Justa, Aruba, Tetyda, Lord, Gwiazda, Etola, Oberon, Bila Finezja, Miłek. Nie stwierdzono istotnej korelacji między długością a masą korzeni badanych odmian (współczynnik korelacji 0,32). Prowadzone badania anatomiczne korzeni wskazują na istotne zróżnicowanie ilości wytworzonego ksylemu wtórnego.

Wyniki niniejszych badań są potwierdzeniem ogólnej tezy przedstawionej przez Wahid'a i współautorów pracy "Heat tolerance in plants: An overview", *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 61, 2007, iż przejściowe lub stale wysokie temperatury mogą powodować szereg morfo-anatomicznych, fizjologicznych i biochemicznych zmian w roślinach, które mają wpływ nie tylko na ich wzrost i rozwój, ale również mogą doprowadzić do drastycznego spadku plonu i jego jakości. Negatywne skutki stresu cieplnego mogą być złagodzone przez wprowadzenie do uprawy roślin odmian o ulepszonej termoregulacji. Z tego powodu dokładne zrozumienie fizjologicznych mechanizmów reakcji roślin na wysoką temperaturę jest koniecznością.

Ziemniak jest typową rośliną klimatu umiarkowanego. Optymalna temperatura dla części nadziemnej to 20-25°C, a dla tuberyzacji i rozwoju bulw 15-20°C. Temperatura wyższa od optymalnej powoduje ograniczenie lub całkowite zahamowanie tuberyzacji oraz intensyfikację wzrostu części nadziemnej roślin. Badania nad wpływem wysokiej temperatury na rozwój i plon ziemniaka były już wcześniej prowadzone w warunkach naturalnych, głównie w Izraelu (np. D. Levy "Tuber yield and tuber quality of several potato cultivars as affected by seasonal high temperature and by water deficit in a semi-arid environment", *Potato Research*, Vol. 29, 1986) oraz w fitotronach w Holandii (np. J. Van Dam, P. L. Kooman, P. C. Struik, "Effects of temperature and photoperiod on early growth and final number of tubers in potato (*Solanum tuberosum* L)", *Potato Research*, Vol. 39, 1996), a także w Polsce (Rykaczewska 1993, 2004a, 2004b, 2004c, 2013b). Brak było jednak danych na temat wpływu wysokiej temperatury w różnych okresach rozwoju roślin, w warunkach suszy i optymalnej wilgotności gleby, na rozwój i plon ziemniaka. Przeprowadzone badania pozwoliły na uzupełnienie informacji w tym zakresie.

W wyniku przeprowadzonych badań własnych stwierdzono, że wysoka temperatura i susza oddziałująca na rośliny badanych odmian ziemniaka w I i II okresie wegetacji spowodowała częściową zmianę kierunku transportu asymilatów z bulw do części nadziemnej. Świadczy o tym bardzo wysoki stopień regeneracji masy nadziemnej roślin. Skutkiem tego było znaczne obniżenie plonu bulw i pogorszenie jego struktury oraz wtórna tuberyzacja. Było to jednak zależne od odmiany, rodzaju stresu abiotycznego i okresu jego występowania. Uzyskane wyniki wymagają potwierdzenia w kolejnym roku badań.

Wnioski:

1. Stopień ujemnego wpływu wysokiej temperatury i suszy na rośliny ziemniaka w czasie wegetacji był zależny od stanu rozwoju roślin w okresie działania stresu abiotycznego.
2. Wysoka temperatura i susza oddziałująca na rośliny badanych odmian ziemniaka spowodowała częściową zmianę kierunku transportu asymilatów z bulw do części nadziemnej. Skutkiem tego było znaczne obniżenie plonu bulw i pogorszenie jego struktury oraz wtórna tuberyzacja. Było to jednak zależne od odmiany, rodzaju stresu abiotycznego i okresu jego występowania.
3. Odmianą najbardziej tolerancyjną na działanie stresu wysokiej temperatury i suszy była Tetyda.
4. Rozwój systemu korzeniowego badanych odmian ziemniaka roślin rosnących w urządzeniu do aeroponicznej produkcji bulw był wysoce istotnie zróżnicowany. Długość korzeni w okresie tuberyzacji sięgała 109 cm u odmiany Hubal. Nie stwierdzono istotnej korelacji między długością

a masą korzeni. Prowadzone badania anatomiczne korzeni wskazują na istotne zróżnicowanie ilości wytworzonego ksylemu wtórnego.

5. Uzyskane wyniki wymagają potwierdzenia w kolejnym roku badań.

Cel podzadania II: Wyróżnienie wskaźników tolerancyjności genotypów ziemniaka na niekorzystne warunki środowiska.

Materiał i metody:

Przeprowadzono doświadczenie wazonowe dla sześciu genotypów ziemniaka, w którym zastosowano dwutygodniową suszę glebową, trzy tygodnie po rozpoczęciu tuberyzacji. Głównym kryterium rolniczym odporności na suszę był spadek plonu w warunkach niedoboru wody. Oceniono również wielkości plonu w warunkach kontrolnych i suszy glebowej, indeks odporności na suszę glebową oraz porównano wybrane parametry fizjologiczne takie jak: RWC metodą Barra i Weatherley'a (1962), wielkości powierzchni asymilacyjnej przy pomocy aparatu LI-3000A (LI-COR, USA), proces więdnienia i regeneracji, fluorescencji chlorofilu przy użyciu fluorymetru jak również względną zawartość chlorofilu w liściach za pomocą chlorofilomierza 502 SPAD. Badano następujące odmiany: Bogatka, Cekin, Gawin, Gwiazda, Oberon, Satina. Dla tych samych odmian prowadzono badania systemu korzeniowego w specjalnie skonstruowanych tubach o wysokości 1m umożliwiającym prawidłowy rozwój systemu korzeniowego. Dokonano następujących pomiarów systemu korzeniowego: zasięg, rozkład w poszczególnych warstwach, świeża i sucha masa całego systemu, świeża i sucha masa i w poszczególnych warstwach. Wyniki pomiarów systemu korzeniowego otrzymanych w pierwszym doświadczeniu przedstawiano wg stopnia odporności na suszę mierzonego spadkiem plonu.

Opracowano również metodę ekstrakcji korzeni do uzyskania obrazów elektroforezy dwukierunkowej pozwalających na wytypowanie markerów białkowych różnicujących warunki kontrolne i suszy glebowej oraz szybką kolorymetryczną metodę wykrywania reduktazy azotanowej w formacie mikropłytkowym.

Wyniki i dyskusja:

Badane odmiany uszeregowano pod względem spadku plonu pod wpływem suszy. Spadek plonu kształtował się od 10% u odmiany Gwiazda do 46% u odmiany Oberon. Zasięg systemu korzeniowego był duży i sięgał u wszystkich odmian do 100 cm, z tym że podstawowa masa korzeni zalegała na głębokość do 40-50 cm. W pozostałych warstwach masa korzeni była niewielka. Stwierdzono bardzo duże zróżnicowanie odmian pod względem wielkości systemu korzeniowego jak i jego rozkładu w poszczególnych warstwach gleby. Największym systemem korzeniowym charakteryzowała się odmiana Gawin, najmniejszym zaś odmiana Bogatka. Średnia wartość wskaźnika RWC mierzonego po 2-tygodniowej suszy dla kombinacji kontrolnej zawiera się w przedziale 84-91%, u roślin poddanych suszy waha się w granicach 37-54%. Największą zdolność do unikania odwodnienia wykazały odmiany Gwiazda, Satina i Gawin. Powierzchnia asymilacyjna roślin w warunkach suszy była najniższa u odmian Bogatka i Cekin, a najwyższa u odmian Gawin i Gwiazda. Proces więdnienia najszybciej nastąpił u odmiany Cekin, najwolniej u odmian Gwiazda, Bogatka i Gawin. Wartość indeksu zieloności liścia mierzonego chlorofilometrem SPAD wynosiła średnio 38,8 dla roślin optymalnie zaopatrywanych w wodę (kontrola) a 48,5 dla roślin poddanych suszy. Wartość SPAD wzrosła u wszystkich badanych odmian. W warunkach suszy maksymalna wydajność fotoukładu II oraz wskaźnik funkcjonowania fotoukładu II zmniejszył się u wszystkich badanych genotypów. Wskaźnik funkcjonowania fotoukładu II w warunkach kontrolnych średnio wynosił 4,22 i 2,98 dla roślin poddanych suszy.

W pracy przedstawiono wyniki elektroforegramów elektroforezy dwukierunkowej korzeni ziemniaka ekstrahowanych metodą lizy komórkowej oraz metodą fenolową. Wyraźniejsze spoty białkowe i większą ich liczbę uzyskano przy ekstrakcji metodą fenolową dlatego wybrano tę metodę do dalszych badań.

W metodzie mikropłytkowego oznaczania aktywności reduktazy azotanowej ustalano optymalną masę żywej tkanki liści ziemniaka w mieszaninie reakcyjnej. Oceniano również wpływ genotypu ziemniaka na aktywność reduktazy azotanowej. W stosowanych warunkach oznaczania, badane odmiany nie różniły się wielkością aktywności właściwej reduktazy azotanowej.

O istnieniu różnic odmianowych w budowie systemu korzeniowego ziemniaka donosiło wielu autorów (Vos i Groenwold 1986, Głuska 1996, Iwama 1998, 2008). Nasze badania również potwierdziły obserwowane wcześniej zróżnicowanie. Odnotowano również różnice w parametrach

systemu korzeniowego, co potwierdzają doniesienia dotyczące zróżnicowania tej cechy wśród genotypów *Solanum tuberosum*. W pracach Iwamy (2008) zasięg korzeni mierzony w naturalnym profilu glebowym wynosił 50-120 cm. Zróżnicowanie naszych odmian było mniejsze, ale zakres zbliżony. Podobne zgodności dotyczyły świeżej i suchej masy korzeni. W doświadczeniach badaczy japońskich przeprowadzonych na wielu odmianach stwierdzono generalnie dodatnią korelację między wielkością systemu korzeniowego a masą nadziemną roślin i plonem bulw. Taka zależność nie zawsze jest prosta, co potwierdzają nasze badania.

Poszukiwaniem prostych wskaźników odporności roślin na suszę glebową zajmuje się wielu badaczy (Monneveux i in. 2013). Z fizjologicznego punktu widzenia takim wskaźnikiem może być względny spadek zawartości wody w warunkach suszy. Z agronomicznego punktu widzenia o odporności genotypu decyduje zdolność do utrzymania wysokiego plonu o dobrej jakości. W naszych badaniach nie znaleziono prostej zależności pomiędzy RWC a spadkiem plonu. Znaczenie wyższej zawartości chlorofilu (bardziej zielone liście) w utrzymywaniu wyższego plonowania w warunkach suszy jest ciągle dyskutowane (Blum, 1988). Badania przeprowadzone na dwóch odmianach ziemniaka różniących się poziomem odporności przedstawiają istotny wzrost wartości SPAD wraz ze spadkiem RWC, co było obserwowane wcześniej (Haverkort i MacKerron, 2000). Nasze badania potwierdzają te zależności. Może być to związane ze wzrostem SLA.

Proteomika, pomimo swoich ograniczeń i wyzwań, pomaga zrozumieć zależności pomiędzy genotypem a fenotypem. Sposób analizy proteomu różni się znacząco od klasycznych technik biochemicznych, za pomocą których staramy się identyfikować pojedyncze białka i szczegółowo opisywać ich właściwości oraz funkcje. Proteomika natomiast łączy szereg technik (2-DE lub 2-DIGE, LC, MS) służących do równoczesnej analizy setek lub tysięcy białek. A o jakości wyników w badaniach proteomicznych decyduje właściwe przygotowanie próbki. Dlatego bardzo ważny jest wybór odpowiedniego sposobu przygotowania ekstraktów białkowych do analizy proteomicznej.

Reduktaza azotanowa jest enzymem umożliwiającym roślinie asymilację azotu poprzez redukcję azotanu (NO_3^-) do azotynu (NO_2^-). Aktywność reduktazy azotanowej podlega wielopoziomowej kontroli metabolicznej i genetycznej. Dlatego może stanowić dobry marker odpowiedzi roślin na stres. Aby możliwe było prowadzenie badań pod tym kątem, potrzebny jest prosty i szybki test oznaczania aktywności reduktazy azotanowej, umożliwiający jednoczesny monitoring wielu roślin. Taki test opracowano w niniejszym podzadaniu adaptując i optymalizując powszechnie stosowaną metodę oznaczania aktywności reduktazy azotanowej *in vivo* (Jaworski, 1971).

Wnioski:

1. Zasięg głębokościowy korzeni roślin ziemniaka był duży i wynosił do 100 cm. Głębokość taką osiągały tylko pojedyncze korzenie, podczas gdy zasadnicza część systemu korzeniowego ulokowana była w warstwie do 50 cm.
2. Badane odmiany były zróżnicowane pod względem parametrów systemu korzeniowego, głównie jego masy i rozkładu w poszczególnych warstwach.
3. Udział systemu korzeniowego w całej biomasie rośliny był bardzo zróżnicowany u odmian i wynosił od 14 do 32 %.
4. Na podstawie jednorocznych badań zarysowuje się zależność pomiędzy wielkością systemu korzeniowego a wielkością masy nadziemnej rośliny i plonem bulw, ale nie u wszystkich odmian jest to zależność prostoliniowa.
5. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy spadkiem plonu a zdolnością unikania odwodnienia mierzoną jako RWC oraz wielkością powierzchni asymilacyjnej w warunkach suszy.
6. Parametry wydajności fotoukładu II (Fv/Fm, PI) zmniejszały się pod wpływem suszy u wszystkich odmian.
7. Względna zawartość chlorofilu mierzona jako SPAD wzrastała w warunkach niedoboru wody.
8. Fenolowa metoda ekstrakcji pozwala na detekcję większej liczby białek korzeni ziemniaka w pełnym zakresie pH 3-7 i masy cząsteczkowej.
9. Opracowano mikropłytkową metodę oznaczania aktywności reduktazy azotanowej *in vivo*. Optymalna masa żywej tkanki w próbie wynosi ok. 5 mg.
10. Badane odmiany posiadają podobny poziom aktywności reduktazy azotanowej w optymalnych warunkach oświetlenia, wilgotności i temperatury.