

Identyfikacja i zastosowanie fenotypowych i molekularnych markerów tolerancji na stres suszy u buraka cukrowego

Identification and application of phenotypic and molecular markers of drought stress tolerance in sugar beet

Anita Wiśniewska, Chrystian Chomontowski, Joanna Dąbrowska-Bronk, Sławomir Podlaski, Danuta Chołuj*

Katedra Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
✉ e-mail: anita_wisniewska@sggw.edu.pl

Słowa kluczowe w porządku alfabetycznym: *Beta vulgaris* L., burak cukrowy, markery fizjologiczne, polimorfizm DNA, ekspresja genów, susza

Cele prowadzonych badań

Susza jest jednym z głównych stresów ograniczających produktywność roślin uprawnych, w tym buraka cukrowego na całym świecie, ale także w warunkach klimatycznych Polski. Plony buraka cukrowego obniżają się w Europie w warunkach tego stresu od 15 do 30% (Pidgeon i in., 2001). Nawadnianie plantacji buraków jest nieekonomiczne z powodu zmniejszających się zasobów dostępnej wody. Podwyższenie plonowania buraków cukrowych w warunkach okresowych niedoborów wody można uzyskać poprzez wprowadzenie do uprawy odmian o podwyższonej tolerancji na ten stres. Uzyskanie takich odmian metodami tradycyjnej hodowli jest pracochłonne i długotrwałe poprzez fakt, że odpowiedź roślin na deficyt wody jest regulowana przez wiele genów, co wiąże się ze zmianami wielu cech biochemicznych czy fizjologicznych (Ober i Rajabi, 2010). Dlatego poznanie cech morfologiczno-fizjologicznych, które są powiązane z tolerancją buraka na niedobór wody może pozwolić na użycie ich jako kryteriów selekcji w programach hodowlanych. Dotychczas opisano różne mechanizmy tolerancji na suszę u kilku gatunków roślin uprawnych. Jednakże, w literaturze naukowej brak jest informacji dotyczących różnic pomiędzy genotypami bardziej i mniej tolerancyjnymi na suszę u buraka cukrowego na poziomie fizjologicznym i molekularnym.

Dlatego też celem zaplanowanych badań było wyselekcjonowanie genotypów buraka cukrowego skrajnie różniących się odpowiedzią na stres suszy, a następnie powiązanie reakcji

fizjologicznej z tłem genetycznym, oszacowanie polimorfizmu DNA i cech fenotypowych, a także wytypowanie genów ulegających zróżnicowanej ekspresji w wybranych genotypach buraka cukrowego. Wszystkie założone cele zadania na lata 2014–2016 zostały osiągnięte.

Materiały i metody

Badania prowadzono na 11 genotypach buraka cukrowego będących homozygotycznymi liniami męskopłodnych zapyłaczy (linie podwojonych haploidów – DH) oraz 1 męskopłodnej linii dopełniającej typu O będącej niepełną homozygotą. Nasiona 12 genotypów uzyskano dzięki uprzejmości Kutnowskiej Hodowli Buraka Cukrowego Sp. z o. o. w Straszku. Badania polowe przeprowadzono dwukrotnie dla wybranych genotypów.

Uprawę buraków cukrowych prowadzono pod osłonami (w odpowiednio przygotowanych namiotach foliowych) w warunkach polowych w KHBC w Straszku, z kontrolowanym, automatycznym nawadnianiem oraz w szklarni SGGW w wazonach Wagnera. W szklarni rośliny traktowane suszą podlewano do 30% KPW (kapilarnej pojemności wodnej), a kontrolne do 60% KPW. Pomiar cech morfologiczno-fizjologicznych wykonano dwukrotnie po 30 i 45 dniach od momentu traktowania roślin suszą. Rośliny traktowane suszą w warunkach polowych początkowo nawadniano tak samo jak rośliny kontrolne, a następnie po dwóch miesiącach od wschodów całkowicie wyłączano nawadnianie na okres trzech miesięcy. W czasie indukowanej



suszy glebowej trzykrotnie, co miesiąc, wykonano na roślinach obu kombinacji pomiary cech morfologicznych i fizjologicznych.

Analizowano cechy morfologiczne i fizjologiczne takie jak: stopień wędnięcia liści, względną zawartość wody w liściach (RWC), specyficzną masę liści, współczynnik „sukulentności”, względną zawartość chlorofilu i flawonoidów, wskaźnik długości powierzchni liści łanu, (LAI), stopień absorpcji światła z zakresu fotosyntetycznie aktywnej radiacji (PAR), parametry fluorescencji chlorofilu *a* w liściach adaptowanych w ciemności i zaadaptowanych do aktualnego natężenia napromieniowania z zastosowaniem testu JIP, pomiar potencjału osmotycznego liści. Na podstawie średnich ze wszystkich terminów pomiarów wyliczono wskaźnik tolerancji poszczególnych genotypów na suszę (DTI – ang. *drought tolerance index*) oddzielnie dla każdej z badanych cech stosując wzór: $DTI = (Y_s/Y_k)/(\text{średnia } X_s/\text{średnia } X_k)$; Y_s – średnia wartość cechy dla danego genotypu w warunkach suszy; Y_k – średnia wartość cechy dla danego genotypu w warunkach optymalnego nawadniania; średnia X_s oraz średnia X_k – średnia wartość cechy dla wszystkich genotypów w warunkach suszy (średnia X_s) lub optymalnego nawadniania (średnia X_k).

Analizę polimorfizmu DNA dla wybranych 5 genotypów buraka cukrowego różniących się skrajnie reakcją na suszę przeprowadzono przy użyciu techniki RAPD (za Chołuj i in. 2014). Produkty RAPD były analizowane w oparciu o ich obecność (1) lub brak (0) u poszczególnych genotypów. Do oszacowania dystansu genetycznego wykorzystano program POPGENE (Nei 1972, Nei 1978). Analizę transkryptomów dwóch podwojonych haploidów skrajnie różniących się tolerancją na suszę i rosnących w warunkach optymalnych lub z deficytem wody przeprowadzono metodą sekwencjonowania bibliotek cDNA – RNAseq (usługa obca).

Wyniki

U roślin traktowanych suszą wartości współczynników wędnięcia wskazywały na utratę turgoru liści najstarszych i części wyrosniętych. Współczynnik wędnięcia zmieniał się pod wpływem suszy w sposób zależny od rodzaju genotypów buraka cukrowego, a genotypy charakteryzujące się większą tolerancją na ten stres wolniej traciły turgor liści, gdyż wskaźnik ten był ujemnie skorelowany z suchą masą korzeni i całej rośliny oraz z plonem korzeni. Wraz ze znacznym podwyższeniem stopnia wędnięcia liści względna zawartość

wody w liściach wyrosniętych w mniejszym stopniu obniżała się pod wpływem suszy, ale wartości współczynników korelacji wyliczone dla RWC i suchej masy roślin lub plonu korzeni były istotne statystycznie. W obu doświadczeniach (szklarniowym i polowym) obserwowano znaczne obniżenie potencjału osmotycznego liści pod wpływem suszy. Stopień obniżenia potencjału osmotycznego w reakcji na niedobór wody był zróżnicowany genotypowo, ale gdy rośliny uprawiano pod namiotami foliowymi nie stwierdzono korelacji pomiędzy tą cechą a plonem korzeni. Stwierdzono również ujemną korelację pomiędzy SLW i współczynnikiem sukulentności a plonem korzeni. U roślin traktowanych suszą obserwowano wyraźne obniżenie akumulacji suchej masy, powierzchni blaszek liściowych i wskaźnika stopnia ulistnienia (LAI). Dodatkowo reakcja genotypów na niedobór wody w przypadku tych cech fizjologicznych była znacznie zróżnicowana. Stwierdzono również istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy powierzchnią aparatu fotosyntetycznego, a wzrostem roślin czy plonem korzeni. Rośliny optymalnie nawadniane charakteryzowały się średnimi wartościami LAI około 3, a rosnące w warunkach suszy w granicach 2, co negatywnie wpływało na absorpcję PAR przez aparat fotosyntetyczny. Maksymalna kwantowa wydajność PSII w bardzo niewielkim stopniu obniżała się pod wpływem niedoboru wody u roślin uprawianych w namiotach foliowych, ale wyraźne negatywne zmiany obserwowano, gdy suszą traktowano młodsze rośliny uprawiane w szklarni. Obserwowano również podwyższenie wartości fluorescencji minimalnej w wyniku oddziaływania suszy, obniżenie F_m , a także znaczne obniżenie wartości pola powierzchni nad krzywą fluorescencji oraz obniżenie wartości parametru F_v/F_0 .

U roślin traktowanych suszą plon korzeni był obniżony o około 40% w porównaniu do kontroli. Ponadto stwierdzono bardzo duże zróżnicowanie genotypowe plonu korzeni w reakcji na suszę. Zawartość sacharozy w korzeniach spichrzowych była tylko nieznacznie podwyższona w reakcji na niedobór wody, a zawartość sodu i potasu zbliżona u roślin traktowanych suszą i optymalnie nawadnianych. Pod wpływem suszy obserwowano natomiast znaczne podwyższenie zawartości azotu α -aminowego. Cecha ta charakteryzowała się dużym zróżnicowaniem genotypowym oraz była ujemnie skorelowana z plonem korzeni.

Analiza różnic pomiędzy maksymalną i minimalną wartością współczynników tolerancji na suszę (DTI) wskazuje, że największe zróżnicowanie genotypowe w reakcji na suszę obserwowano

dla LAI, absorpcji PAR, potencjału osmotycznego, NBI (współczynnik metabolizmu azotu), ETR (szybkość transportu elektronów), czasu pomiędzy F_0 i F_m , współczynnika wydajności PSII, plonu korzeni oraz zawartości sodu i azotu α -aminowego w korzeniach (tab. 1). Analiza wartości współczynników tolerancji na suszę wyliczonych dla wszystkich cech morfologicznych i fizjologicznych wskazała, że potencjalnie najwyższą tolerancją na suszę charakteryzują się genotypy 9 i 10, a niższą genotypy 11 i 12.

Do wstępnego oszacowania polimorfizmu na poziomie DNA pomiędzy 5 genotypami (różniącymi się skrajnie reakcją na suszę oraz linią O) wykorzystano technikę RAPD (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA). Spośród 158 użytych starterów, pomimo że były wybrane na podstawie wcześniejszych badań z innymi genotypami buraka, tylko 55 generowało produkty polimorficzne, 7 – produkty monomorficzne, 7 nie dało żadnych produktów oraz 89 dało produkty niestabilne lub nieostre. W reakcjach ze starterami generującymi produkty polimorficzne pomiędzy genotypami uzyskiwano od 1 do 11 produktów. Długość amplifikowanych produktów wynosiła od ok. 400 do 3000 pz. Ogółem przy użyciu 55 starterów generujących fragmenty DNA polimorficzne zidentyfikowano dla 5 genotypów 274 *loci* (łącznie 948 produktów PCR), z których 196 stanowi *loci* polimorficzne (71,53%). Na podstawie uzyskanych danych obliczono wartość genetycznego dystansu, która wahała się od 31,98 do 51,33%. Podobieństwo genetyczne dla dwóch skrajnie różniących się reakcją na suszę genotypów 9 i 12 wyniosło 65%. Wartość dystansu genetycznego pomiędzy badanymi formami buraka zawiera się w przedziale wartości uzyskiwanych wcześniej w innych badaniach (Chołuj i in., 2014).

Łącznie w trakcie trzy letnich badań przeanalizowano produkty PCR generowane przez 311 starterów RAPD. Spośród nich udało się wyselekcjonować 30 starterów, które generowały produkty jednocześnie u obu form tolerancyjnych albo u obu form wrażliwych (wybranych we wcześniejszych badaniach na podstawie cech fizjologicznych i morfologicznych). Głównym kryterium wyboru 30 starterów z 311 było pojawienie się produktu polimorficznego jednocześnie i tylko u obu form tolerancyjnych, natomiast u obu form wrażliwych nie lub odwrotnie. Wśród 30 analizowanych starterów 26 zachowało swoje cechy tj generowało produkty PCR w sposób powtarzalny. Wśród 26 starterów generujących produkty polimorficzne możemy wyróżnić 2 grupy: GRUPA

1 – startery, które generują produkty PCR u form tolerancyjnych a u wrażliwych nie lub odwrotnie (układ 1/0), GRUPA 2 – startery, które generują produkty PCR u wszystkich genotypów, ale różniące się ilością danego produktu PCR pomiędzy formami tolerancyjnymi i wrażliwymi. W sumie 26 starterów wygenerowało 31 różnic pomiędzy badanymi formami.

Do analizy sekwencjonowania transkryptomów (RNAseq) wybrano dwa genotypy 9 i 12 buraka cukrowego spośród badanych form na podstawie ich reakcji w warunkach suszy w uprawie polowej. Wybrano genotypy najbardziej i najmniej tolerancyjne na suszę. Geny, których \log_2 krotności zmiany (ang. \log_2 fold change) poziomu ekspresji pomiędzy dwoma genotypami w danych warunkach wynosił co najmniej 1,5 a współczynnik FDR (ang. False Discovery Rate) był poniżej 0,05 (FDR < 0,05) zostały uznane za ulegające istotnej różnicowej ekspresji. Najwięcej genów ulegało zróżnicowanej ekspresji w genotypie wrażliwym (12) pomiędzy warunkami kontrolnymi i suszy (1905+1206), najmniej genów (981+232) o zróżnicowanej ekspresji stwierdzono porównując warunki kontrolne i suszy dla genotypu tolerancyjnego (9). Zidentyfikowano geny, które charakteryzowały się największym podwyższonym poziomem ekspresji tylko w liściach buraków tolerancyjnych rosnących w warunkach suszy. Geny te potencjalnie mogą być związane z podwyższoną tolerancją genotypu 9 na suszę. Wśród tych genów specyficznych dla genotypu 9 znalazły się między innymi geny o nieznannej funkcji (4), gen związany z przekazywaniem sygnału etylenowego, gen związany z transportem hormonów, w tym ABA oraz gen związany z katabolizmem ABA. Kwas abscysynowy jest hormonem indukowanym między innymi podczas stresu suszy i jego czasowe podwyższone stężenie pozytywnie wpływa na obronę rośliny przed tym stresem.

Zidentyfikowano również geny o obniżonym poziomie ekspresji tylko w genotypie tolerancyjnym w warunkach suszy względem genotypu wrażliwego. Geny te potencjalnie mogą być związane z podwyższoną tolerancją genotypu 9 na suszę. Wśród tych genów znalazły się między innymi geny kodujące ekspansyny lub białka podobne do ekspansyn, a także kodujące inne enzymy związane z reorganizacją ścian komórkowych. Inną grupę genów stanowią geny kodujące czynniki transkrypcyjne. Czynniki transkrypcyjne to białka mające zdolność wiązania się do obszarów regulatorowych genów i w ten sposób mogące wpływać na zmianę ekspresji innych genów, hamować ją lub

aktywować. Wśród tej grupy genów zidentyfikowano również gen kodujący S-transferazę glutationu (GST), która jest enzymem związanym z utrzymaniem homeostazy redoks i chroni komórki przed stresem oksydacyjnym.

Szczegółowa funkcja wymienionych genów jak i pozostałych zidentyfikowanych (znanych i nieznanych) dzięki sekwencjonowaniu transkryptomów dwóch form buraka cukrowego powinna być potwierdzona/poznana w odpowiedzi buraka cukrowego na stres suszy.

Wnioski

1. Najlepszymi wskaźnikami fenotypowymi tolerancji buraka cukrowego na suszę wydają się być przede wszystkim stopień obniżenia LAI, absorpcji PAR oraz plon korzeni. Tendencje zmian cech morfologicznych i fizjologicznych w reakcji na suszę były w doświadczeniach polowym i szklarniowym zbliżone, choć stopień obniżenia czy podwyższenia danej cechy był zróżnicowany.
2. Aparat fotosyntetyczny buraka cukrowego jest stosunkowo odporny na samą dehydratację, dopiero gdy dodatkowo jest narażony na oddziaływanie wysokiego natężenia napromieniowania i temperatury dochodzi do jego fotoinhibicji, dlatego maksymalna wydajność kwantowa PSII nie jest użytecznym parametrem oceny jego tolerancji na suszę.
3. Wartość podobieństwa genetycznego pomiędzy skrajnie różniącymi się reakcją na suszę formami wyniosła 65% i jest to wysokie pokrewieństwo w obrębie genotypów buraka cukrowego, ale typowe w odniesieniu do danych literaturowych.
4. Geny zidentyfikowane jako te, które ulegają specyficznemu zmiennej ekspresji charakterystycznej dla genotypu tolerancyjnego w warunkach suszy stanowią swoisty wzór mogący ułatwić selekcjonowanie genotypów tolerancyjnych buraka cukrowego na suszę, jednakże dalsze szczegółowe badania są niezbędne w tym zakresie.

Osiągnięcia projektu

1. Na podstawie trzyletnich badań dotyczących wpływu suszy na kształtowanie się

cech morfologiczno-fizjologicznych buraków cukrowych wytypowano dwa genotypy rodzicielskie (podwojone haploidy) o podwyższonej tolerancji na suszę (nr 9 i 10) oraz dwa charakteryzujące się (nr 11 i 12) większą podatnością na ten stres. Genotypy o podwyższonej tolerancji buraka cukrowego mogą być włączone do programów hodowlanych przez KHBC, natomiast wszystkie wskazane genotypy są cennym materiałem do badań nad tolerancją na suszę.

2. Wytypowano cechy fenotypowe, za pomocą których można selekcjonować genotypy buraka cukrowego o podwyższonej tolerancji na suszę.
3. Wytypowano 26 starterów RAPD, które mogą posłużyć w przyszłości do selekcji genotypów buraka cukrowego tolerancyjnych na suszę.

Wykaz publikacji wyników

- Wiśniewska A, Andryka-Dudek P, Czerwiński M, Chołuj D (2019) Fodder beet is a reservoir of drought tolerance alleles for sugar beet breeding, *Plant Physiology and Biochemistry* 145: 120–131, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.031>; (IF= 3,404; 70 pkt)
- Chołuj D, Wiśniewska A, Chomontowski Ch, Wagner D, Podlaski S. The morphological and physiological responses of sugar beet to drought. 10th International Conference “Plant Functioning Under Environmental Stress”. 16-19 September 16-19, 2015, Cracow, Poland

Literatura

- Chołuj, D. Wiśniewska, A. Szafranski, K.M. Cebula, J. Gozdowski, D. Podlaski, S. (2014). Assessment of the physiological responses to drought in different sugar beet genotypes in connection with their genetic distance. *Journal of Plant Physiology*, 171, 1221-1230.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between population. *American Naturalist*, 106, 283-292.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Ober, E.S. Rajabi, A. (2010). Abiotic Stress in Sugar Beet. *Sugar Tech*, 12, 294-298.
- Pidgeon, J.D. Werker, A.R, Jaggard, K.W. Richter, G.M. Lister, D.H. Jones, P.D. (2001). Climatic impact on the productivity of sugar beet in Europe, 1961-1995. *Agricultural and Forest Meteorology*, 109 (1), 27–37.

Tabela 1.

Wybrane wskaźniki tolerancji na suszę (DTI) wyliczone dla badanych cech morfologiczno-fizjologicznych, parametrów fluorescencji na podstawie średnich dla poszczególnych genotypów z 2 terminów pomiarów oraz parametrów plonu na podstawie średnich z 4 powtórzeń.

| Genotyp | LAI | PAR | Pot. osm | NBI | ETR | Czas do F_m | PI | Plon korzeni | Zawartość Na | Zawartość N |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|--------------|--------------|-------------|
| 1 | 0,92 | 0,88 | 0,95 | 1,06 | 1,07 | 1,07 | 1,14 | 1,00 | 1,95 | 1,49 |
| 2 | 0,79 | 0,82 | 0,93 | 1,1 | 1,07 | 0,99 | 1,09 | 1,09 | 2,46 | 0,92 |
| 3 | 0,72 | 0,79 | 0,97 | 1,05 | 1,12 | 1,19 | 0,84 | 0,52 | 0,70 | 1,14 |
| 4 | 1,03 | 0,98 | 0,97 | 1,26 | 1,31 | 0,95 | 0,94 | 0,92 | 0,50 | 0,83 |
| 5 | 0,88 | 1,03 | 0,91 | 0,87 | 1,16 | 1,18 | 0,78 | 0,93 | 1,23 | 0,93 |
| 6 | 0,84 | 1,02 | 0,91 | 0,83 | 1,00 | 1,00 | 1,41 | 0,92 | 1,06 | 1,01 |
| 7 | 1,09 | 1,09 | 1,10 | 0,94 | 1,13 | 1,13 | 0,97 | 1,19 | 0,96 | 1,12 |
| 8 | 1,18 | 1,18 | 1,17 | 0,85 | 1,19 | 1,26 | 0,94 | 0,89 | 1,01 | 1,17 |
| 9 | 1,37 | 1,23 | 1,31 | 1,17 | 1,08 | 0,73 | 1,01 | 1,73 | 0,54 | 0,80 |
| 10 | 1,53 | 1,24 | 1,18 | 1,14 | 0,99 | 1,00 | 1,35 | 1,36 | 0,52 | 0,47 |
| 11 | 0,72 | 0,75 | 0,83 | 0,83 | 0,49 | 1,00 | 0,96 | 0,83 | 1,20 | 1,14 |
| 12 | 0,85 | 0,91 | 0,83 | 1,07 | 0,82 | 0,81 | 0,81 | 0,67 | 0,91 | 1,36 |
| Max-min | 0,81 | 0,49 | 0,48 | 0,43 | 0,82 | 0,53 | 0,63 | 1,21 | 1,96 | 1,02 |