

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2022 roku****A. INFORMACJE OGÓLNE**

Tytuł zadania: Wpływ stresu suszy na zmiany w transkryptomie, morfologii i składzie chemicznym roślin chmielu i tytoniu.
Numer zadania: (w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170 z późn. zm.)) 40
Planowany okres realizacji zadania: 2022 r.
Planowane nakłady w zł: 505 000

B. DANE WNIOSKODAWCY

Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, (tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax)
Wiesław Aleksander Oleszek, prof. dr hab. czł. koresp. PAN Dyrektor Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy ul. Czartoryskich 8 24-100 Puławy tel. 81 4786 700 fax: 81 4786 900

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Marcin Przybyś	dr	IUNG-PIB
wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Urszula Skomra	dr	IUNG-PIB
Anna Trojak-Goluch	dr hab.	IUNG-PIB

2. Kierownik zadania

Marcin Przybyś, dr
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 4786 930
tel. sekretariat: 81 4786 931
e-mail: mprzybys@iung.pulawy.pl

Kontakt w przypadku nieobecności kierownika zadania
Urszula Skomra, dr
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 4786 943

D. OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie ¹ /częściowo ¹)
	Określenie wpływu stresu suszy na pole powierzchni liścia i wysokość roślin oraz zawartość specyficznych alkaloidów i poziom cukrów redukujących.	tak
	Określenie specyficznych genów mających wpływ na tolerancję tytoniu na stres suszy.	tak

¹ Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny

2. Harmonogram realizacji zadania

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Analiza morfologiczna i chemiczna roślin poddanych stresowi suszy	styczeń – październik	102 000
2	Analiza bioinformatyczna transkryptomu roślin poddanych stresowi suszy	czerwiec - grudzień	403 000
Razem			505 000

3. Opis tematów badawczych

3. 1. Temat badawczy 1

Cel tematu badawczego 1:

Celem prowadzonych badań jest określenie wpływu stresu suszy na pole powierzchni liścia i wysokość badanych roślin oraz zawartość specyficznych alkaloidów i cukrów redukujących.

Cel tematu badawczego 1 został osiągnięty.

Materiały i metody

W badaniach zostały użyte 2 genotypy różniące się reakcją na stres suszy. Odmiana VPPG78 jako genotyp o dużym potencjale tolerancji na stres suszy oraz PH 168 jako genotyp wykazujący niską tolerancję.

Odmiany tytoniu zostały użyte do określenia wpływu stresu suszy na zmiany morfologiczne roślin, zmiany w składzie chemicznym oraz do uzyskania RNA niezbędnego w temacie badawczym nr 2.

Po 100 roślin każdej odmiany zostało wysadzonych do wysterylizowanego uniwersalnego podłoża warzywnego. Rośliny były utrzymywane w fitotronie w kontrolowanych warunkach temperatury 22°C/18°C i przy fotoperiodzie 16/8 godzin oraz wilgotności względnej powietrza 50%. W stadium 8 liści przeprowadzone zostały testy reakcji roślin na stres suszy. W tym celu w pierwszym dniu prowadzenia doświadczenia wszystkie rośliny zostały podlane wodą destylowaną do pełnego nasycenia podłoża wodą. Wilgotność względna podłoża była monitorowana przez cały okres prowadzenia doświadczenia. W przypadku roślin kontrolnych wilgotność względna podłoża była utrzymywana na stałym 85% poziomie zapewniającym prawidłowy wzrost. Rośliny poddawane stresowi suszy nie były podlewane. W 2, 6, 10 i 14 dniu doświadczenia określone zostały wysokość oraz pole powierzchni blaszki liściowej badanych roślin. Próbkę liści i korzeni 10 roślin stresowanych i 10 kontrolnych były pobierane w 2, 6, 10 i 14 dniu doświadczenia. Próbkę natychmiast po pobraniu były zamrażane w ciekłym azocie i przechowywane w -80°C.

Zamrożone próbki były wykorzystane do oceny zmian w składzie chemicznym tytoniu oraz w badaniach molekularnych zaplanowanych w temacie badawczym nr 2.

Analizy chemiczne

Oznaczenie zawartości alkaloidów

Próbki roślinne przeznaczone do analizy składu chemicznego zostały poddane liofilizacji, a następnie dzięki zastosowaniu młynka Cyclotec™ (Foss) zostały rozdrobnione na fragmenty poniżej 0,5 mm. Naważki $1 \pm 0,001$ g tytoniu zwilżano 7ml 2M NaOH przez 15 min, a następnie dodawano 50 ml roztworu ekstrakcyjnego składającego się z MTBE (eteru tert-metylobutyłowego) z dodatkiem 0,4 mg/ml chinoliny jako wzorca wewnętrznego. Próbki ekstrahowano przez 2 godziny na wytrząsarce orbitalnej przy 130 obr./min. Po wytrząsaniu ekstrakty pozostawiano na 15 min. do rozdzielenia faz, a następnie ekstrakt przenoszono do fiolki autosamplera. Oznaczenie zawartości specyficznych alkaloidów tytoniu: nikotyny, nornikotyny, anabazyny i anatabiny zostało przeprowadzone na chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas typu kwadrupol.

Warunki rozdziału chromatograficznego:

Kolumna chromatograficzna: DB-5ms – 30m x 0,25mm x 0,25 μ m (Agilent Techn.)

Gaz nośny: hel 6.0

Przepływ gazu: 1,7ml/min

Temperatura dozownika: 250°C

Tryb dozowania: split 40:1

Objętość dozowania: 1 μ l

Temperatura początkowa: 110°C

Początkowy czas przetrzymywania: 0 min.

Wzrost temperatury A: 10°C/min

Temperatura końcowa A: 185°C

Wzrost temperatury B: 6°C

Temperatura końcowa B: 245°C

Końcowy czas przetrzymywania B: 10 min.

Temperatura detektora 250°C

Detektor: spektrometr mas – kwadrupol

Jonizacja: elektronowa

Energia jonizacji: 70eV

Kalibracja chromatografu gazowego ze spektrometrem mas wykonano na podstawie 5-punktowej krzywej kalibracyjnej. Współczynnik korelacji R^2 dla krzywej kalibracyjnej był większy niż 0,99.

Oznaczenie zawartości cukrów redukujących

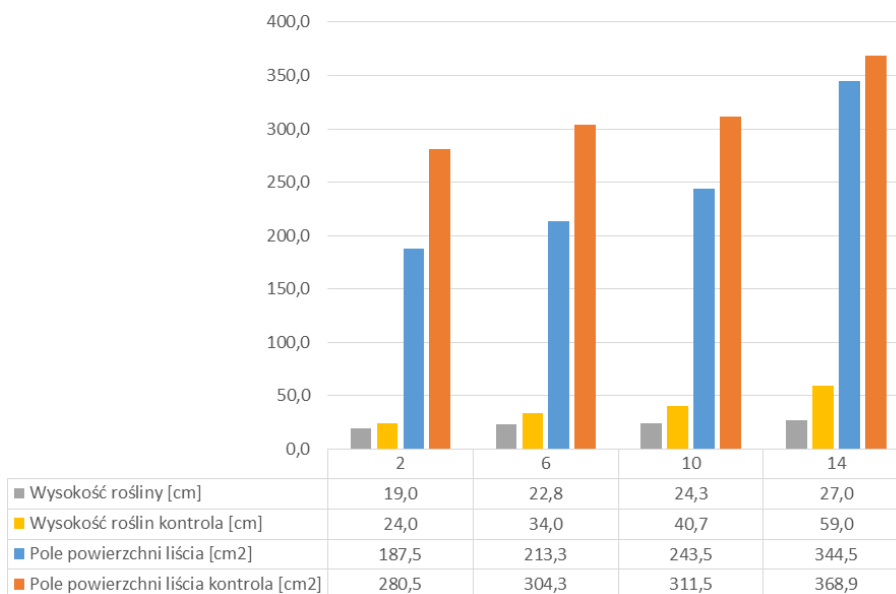
Naważki próbek tytoniu $5g \pm 0,001g$ zalewano 100 ml gorącej wody i ogrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 100°C przez 45 min. Studzono do temperatury pokojowej i dopełniano wodą do 250 ml. Po wymieszaniu sączono przez sączek fałdowany. Z przesączu pobierano 100 ml roztworu i dodawano do niego 6 ml zasadowego octanu ołowiawego i ponownie sączono. Z przesączu pobierano 53 ml roztworu dodawano 4 ml 10% (m/m) roztworu węglanu sodowego, mieszano i ponownie sączono. Pobierano 28,5 ml przesączu i dodawano 2,85 ml 25% (m/m) roztworu kwasu solnego i ogrzewano na łaźni wodnej przez 30 min. Po ostudzeniu roztwór zobojętniano 10% (m/m) roztworem wodorotlenku sodu i dodawano przygotowaną bezpośrednio przed użyciem mieszaninę odczynników: Fehlinga I + II (20 ml + 20 ml) i ogrzewano do wrzenia przez 3 min. Następnie dodawano 40 ml zimnej wody i dekantowano. Po dekantacji sączono przez lejek G-4 ze spiekami do

kolby ssawkowej. Osad przemywano gorącą wodą, a następnie lejek z osadem umieszczano na drugiej kolbie ssawkowej i osad zalewano 20 ml gorącego odczynnika Fehlinga III. Po rozpuszczeniu osadu lejek przemywano gorącą wodą. Przesącz miareczkowano nadmanganianem potasowym o stężeniu 0,1 mol/l do stałego słabioróżowego zabarwienia. Dopuszczalne różnice oznaczeń pomiędzy powtórzeniami analitycznymi nie mogły być większe niż 1% s.m. przy zawartości cukrów redukujących powyżej 15% i nie większe niż 0,5% s.m. przy zawartości 5-15%.

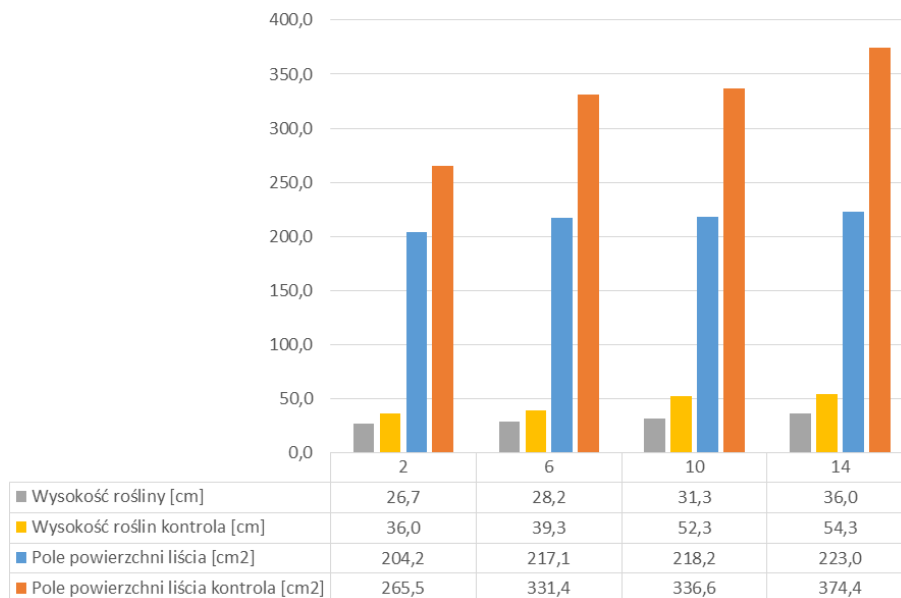
Wyniki

W wyniku prowadzonych badań obserwowano zróżnicowaną reakcję odmian PH 168 i VPPG 78 na stres suszy. Na rys. 1 i 2 przedstawiono zmiany zachodzące w wysokości roślin i polu powierzchni liści. Wysokość roślin poddawanych stresowi suszy wahała się od 19 cm (odm. PH 168) do 26,7 cm (odm. VPPG 78) w drugim dniu doświadczenia i od 27 cm (odm. PH 168) do 36 cm (odm. VPPG 78) w 14 dniu. W żadnej odmianie nie obserwowano całkowitego zahamowania wzrostu w 14 dniu doświadczenia. Przyrosty między 10 i 14 dniem doświadczenia wynosiły odpowiednio: 2,7 cm i 4,7 cm.

Pole powierzchni 7 liścia roślin badanych wahało się od 187,5 cm² (odm. PH 168) i 204,2 cm² (odm. VPPG 78) w drugim dniu doświadczenia do 223,5 cm² i 344 cm² w 14 dniu doświadczenia. Odmiana VPPG 78 wykazywała niewielkie wzrosty pola powierzchni liścia już od 6 dnia doświadczenia. Na tym tle wyróżniała się odmiana PH 168, która zachowała zdolność wzrostu nawet w warunkach silnego stresu suszy. W efekcie odmiana PH 168 wykazywała mniejsze różnice pola powierzchni w 14 dniu doświadczenia niż odmiana VPPG 78 w stosunku do roślin kontrolnych – odpowiednio: 24,4 cm² i 151,4 cm².



Rys. 1. Wpływ stresu suszy na zmiany w morfologii odmiany PH 168, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 2. Wpływ stresu suszy na zmiany w morfologii odmiany VPPG 78, w zależności od długości trwania stresu suszy.

W dalszych badaniach określono zmiany zachodzące w zawartości alkaloidów tytoniowych: nikotyny, nornikotyny, anabazyny i anatabiny w liściach odmiany PH 168 w zależności od długości trwania stresu suszy (rys. 3-6).

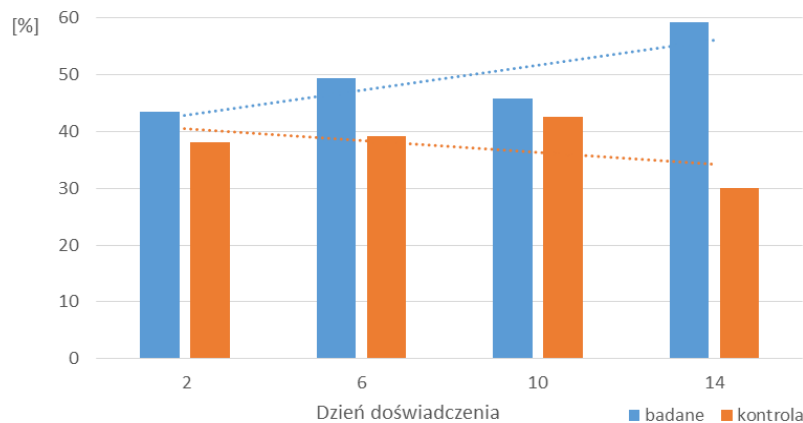
Zawartość procentowa nikotyny w suchej masie w 2 dniu suszy wynosiła średnio 43,46% i wzrastała do 59,27% w 14 dniu doświadczenia. Odwrotny trend zaobserwowano w przypadku roślin kontrolnych gdzie w 2 dniu stresowania zawartość nikotyny wynosiła 38,04%, w następnych dniach nieznacznie rosła i w 14 dniu uległa znacznemu obniżeniu do 30%.

Zawartość nornikotyny z każdym dniem doświadczenia rosła od 5,38% w 2 dniu, do 5,93% w 14 dniu. W przypadku roślin kontrolnych trend był odwrotny i zawartość nornikotyny zmniejszała się od 6,35% w 2 dniu doświadczenia i osiągała wartość 5,38% w 14 dniu.

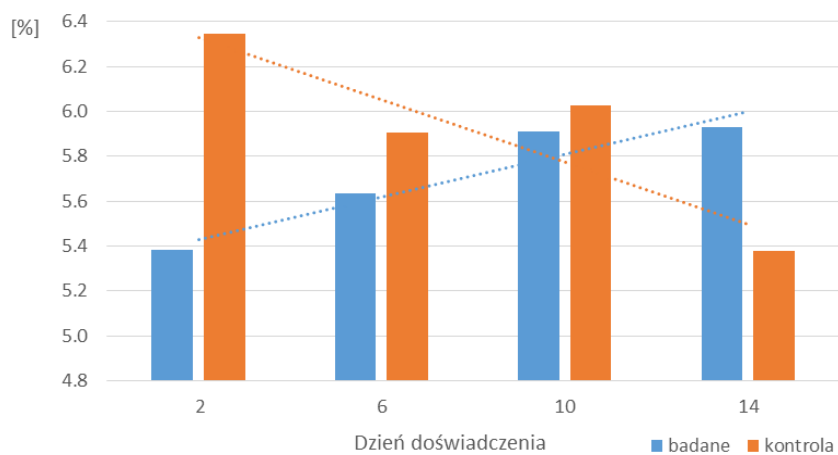
W prowadzonych badaniach określono również zawartość pomniejszych alkaloidów tytoniowych: anabazyny i anatabiny, które występują w znacznie mniejszych ilościach.

Zawartość procentowa anabazyny w suchej masie w 2 dniu suszy wynosiła średnio 0,79% i taka wartość utrzymywała się jeszcze w 6 dniu, po czym wzrastała do 0,85% w 10 i 14 dniu doświadczenia. Odwrotny trend zaobserwowano w przypadku roślin kontrolnych gdzie w 2 dniu stresowania zawartość anabazyny wynosiła 0,92%, w 6 dniu spadała do 0,81% i w 14 dniu ulegała dalszemu obniżeniu do 0,76%.

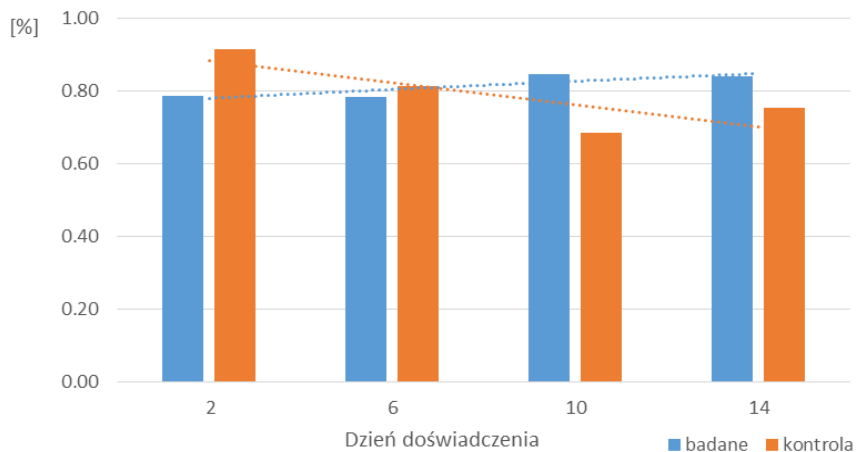
Zawartość anatabiny z każdym dniem doświadczenia rosła u roślin badanych od 4,64% w 2 dniu, do 5,40% w 10 dniu. W przypadku roślin kontrolnych zawartość anatabiny zmniejszała się od 5,55% w 2 dniu doświadczenia do wartości 3,99% w 14 dniu.



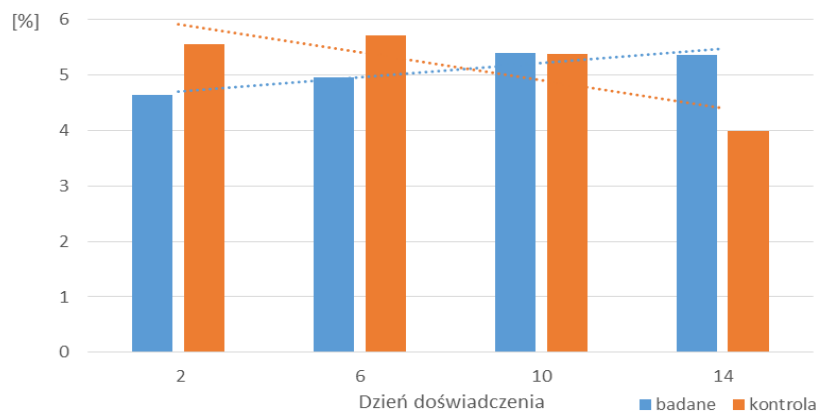
Rys. 3. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości nikotyny w liściach odmiany PH 168, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 4. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości normikotyny w liściach odmiany PH 168, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 5. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości anabazyny w liściach odmiany PH 168, w zależności od długości trwania stresu suszy.



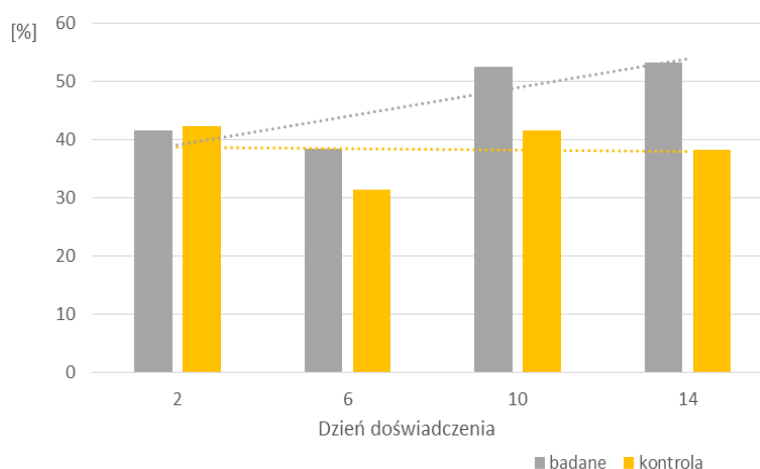
Rys. 6. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości anatabiny w liściach odmiany PH 168, w zależności od długości trwania stresu suszy.

Zawartość alkaloidów tytoniowych określono również w korzeniach badanych roślin, czyli w organie odpowiedzialnym za syntezę tych metabolitów (rys. 7-10). Zawartość procentowa nikotyny w 2 dniu suszy wynosiła średnio 41,59% i wzrastała do 53,32% w 14 dniu doświadczenia. W przypadku roślin kontrolnych w 2 dniu stresowania zawartość nikotyny wynosiła 42,32%, w następnych dniach spadała i w 14 dniu ulegała obniżeniu do 38,24%.

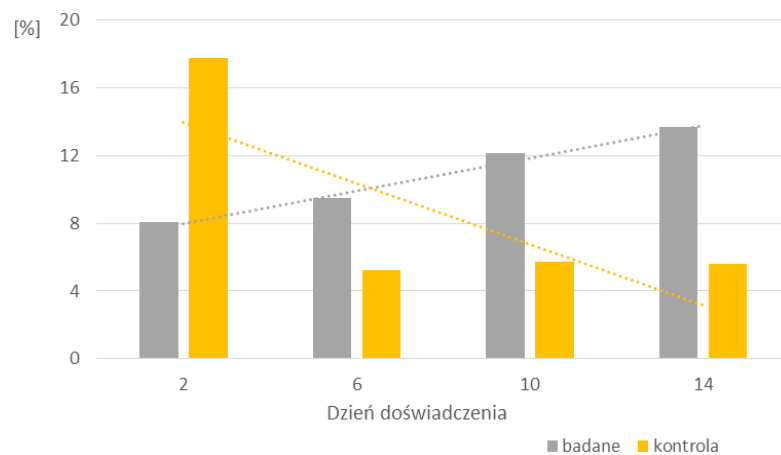
Zawartość normikotyny z każdym dniem doświadczenia rosła od 8,1% w 2 dniu, do 13,68% w 14 dniu. W przypadku roślin kontrolnych trend był odwrotny i zawartość normikotyny zmniejszała się od 17,75% w 2 dniu doświadczenia i osiągała wartość 5,61% w 14 dniu.

W odniesieniu do zawartości pomniejszych alkaloidów tytoniowych: anabazyny i anatabiny, które występują w znacznie mniejszych ilościach, zawartość procentowa anabazyny w 2 dniu suszy wynosiła średnio 1,6% i nieznacznie wzrastała do 1,72% w 14 dniu doświadczenia. Odwrotny trend zaobserwowano w przypadku roślin kontrolnych gdzie w 2 dniu stresowania zawartość anabazyny wynosiła 2,72%, a w 14 dniu ulegała obniżeniu do 0,76%.

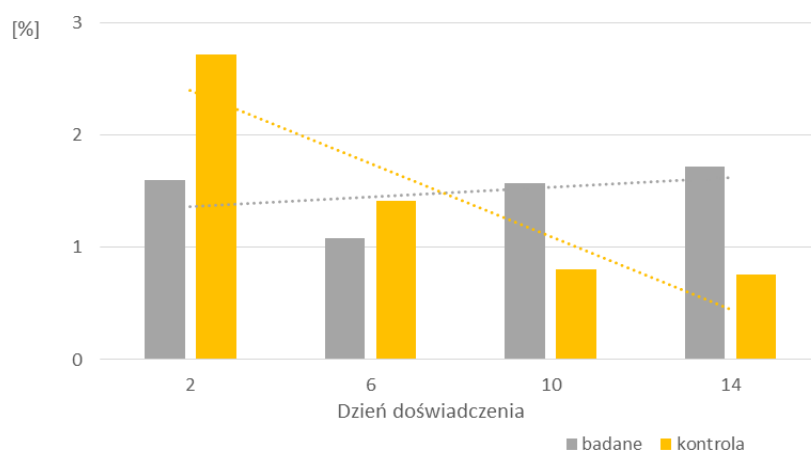
Zawartość anatabiny u roślin badanych utrzymywała się na zbliżonych poziomach przez cały okres doświadczenia i wynosiła ok. 12%, podczas gdy w przypadku roślin kontrolnych zawartość anatabiny zmniejszała się od 16,23% w 2 dniu doświadczenia do wartości 6,51% w 14 dniu.



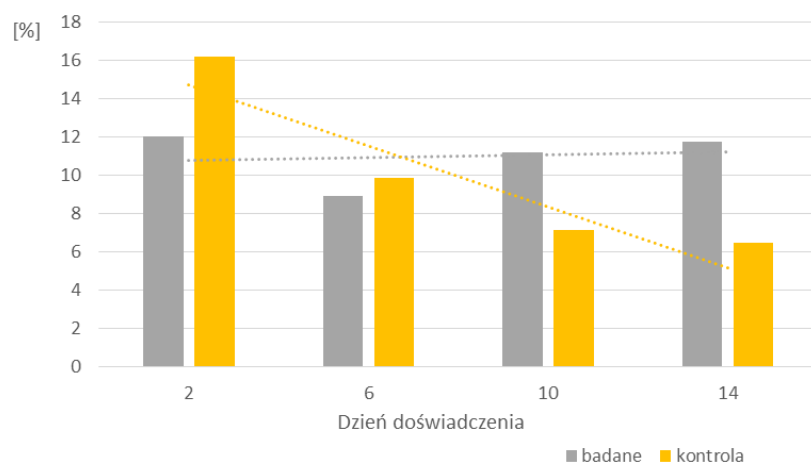
Rys. 7. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości nikotyny w korzeniach odmiany PH 168, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 8. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości nornikotyiny w korzeniach odmiany PH 168, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 9. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości anabazyiny w korzeniach odmiany PH 168, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 10. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości anatabiny w korzeniach odmiany PH 168, w zależności od długości trwania stresu suszy.

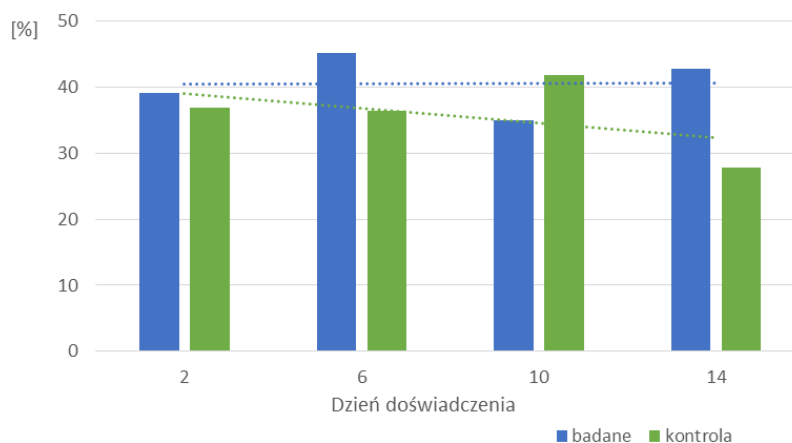
Zawartość alkaloidów tytoniowych określono również w liściach odmiany VPPG 78 (rys. 11-14). Zawartość procentowa nikotyiny w suchej masie w 2 dniu suszy wynosiła średnio 39,17% i nieznacznie wzrastała do 42,82% w 14 dniu doświadczenia. Odwrotny trend zaobserwowano w przypadku roślin kontrolnych

gdzie w 2 dniu stresowania zawartość nikotyny wynosiła 36,87%, w 10 dniu wzrastała do 41,8% i w 14 dniu ulegała znacznemu obniżeniu do 27,76%.

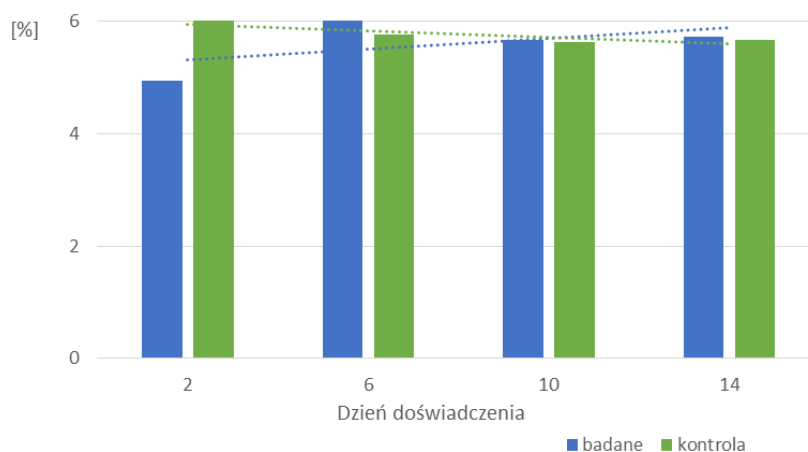
Zawartość nornikotyny rosła od 4,96% w 2 dniu, do 5,73% w 14 dniu. W przypadku roślin kontrolnych trend był odwrotny i zawartość nornikotyny zmniejszała się od 6,02% w 2 dniu doświadczenia i osiągała wartość 5,68% w 14 dniu.

Zawartość procentowa anabazyny w suchej masie w 2 dniu suszy wynosiła średnio 0,72% i wzrastała do 0,82% w 10 i 14 dniu doświadczenia. Podobny trend zaobserwowano również w przypadku roślin kontrolnych gdzie w 2 dniu stresowania zawartość anabazyny wynosiła 0,48%, a w 14 dniu 0,52%.

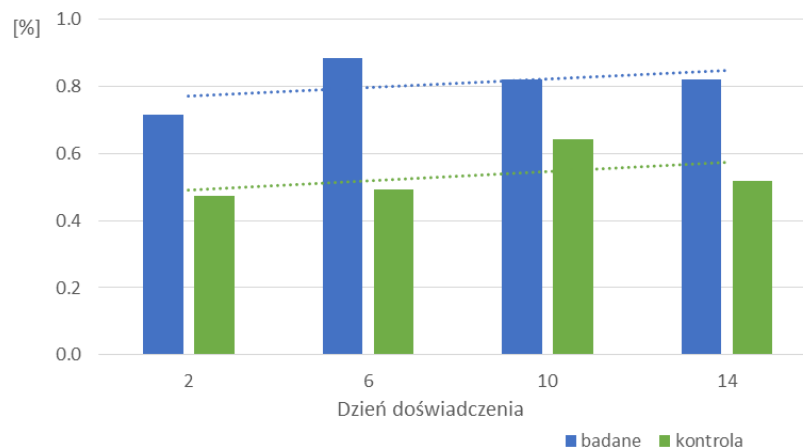
Zawartość anatabiny z każdym dniem doświadczenia spadała u roślin badanych od 7,23% w 2 dniu, do 5,89% w 10 dniu, a w przypadku roślin kontrolnych od 7,66% w 2 dniu doświadczenia do wartości 5,4% w 14 dniu.



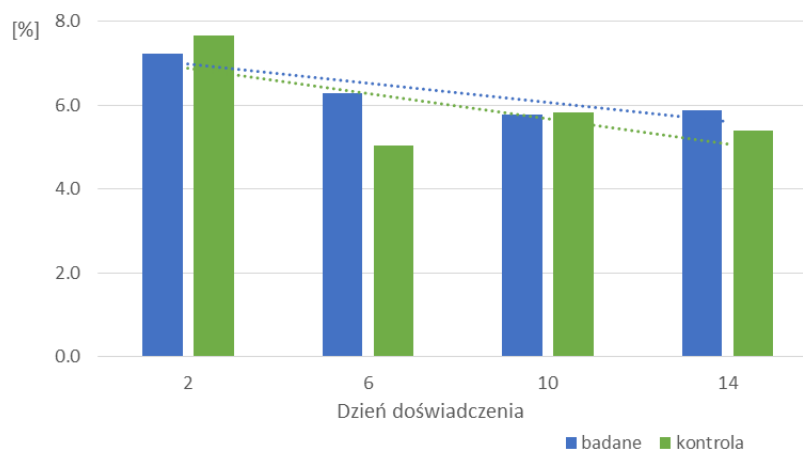
Rys. 11. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości nikotyny w liściach odmiany VPPG 78, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 12. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości nornikotyny w liściach odmiany VPPG 78, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 13. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości anabazyny w liściach odmiany VPPG 78, w zależności od długości trwania stresu suszy.



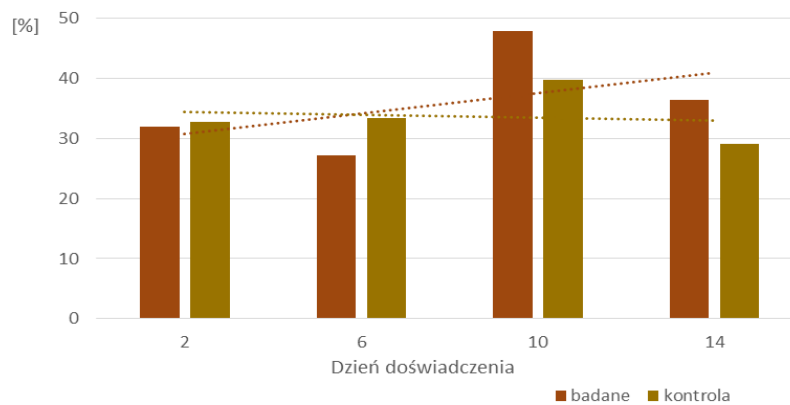
Rys. 14. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości anatabiny w liściach odmiany VPPG 78, w zależności od długości trwania stresu suszy.

Na rys. 15-18 przedstawiono zawartość alkaloidów tytoniowych w korzeniach odmiany VPPG 78. Zawartość procentowa nikotyny w 2 dniu suszy wynosiła średnio 31,9% i wzrastała do 47,86% w 6 dniu, a następnie obniżała się do 36,37% w 14 dniu doświadczenia. W przypadku roślin kontrolnych w 2 dniu stresowania zawartość nikotyny wynosiła 32,71%, by w 14 dniu ulec obniżeniu do 29,08%.

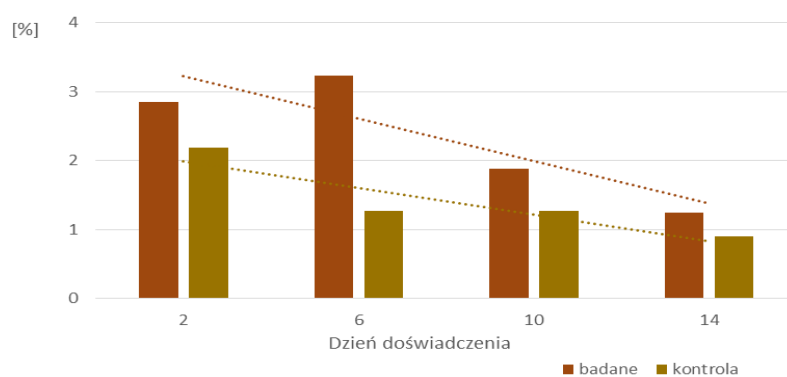
Zawartość normikotyny z każdym dniem doświadczenia spadała od 2,85% w 2 dniu, do 1,25% w 14 dniu. W przypadku roślin kontrolnych trend był podobny i zawartość normikotyny zmniejszała się od 2,19% w 2 dniu doświadczenia i osiągała wartość 0,90% w 14 dniu.

Zawartość procentowa anabazyny w 2 dniu suszy wynosiła średnio 13,79% i z każdym kolejnym dniem spadała do 8,24% w 14 dniu doświadczenia. Podobny trend zaobserwowano w przypadku roślin kontrolnych gdzie w 2 dniu stresowania zawartość anabazyny wynosiła 6,92%, a w 14 dniu ulegała obniżeniu do 5,81%.

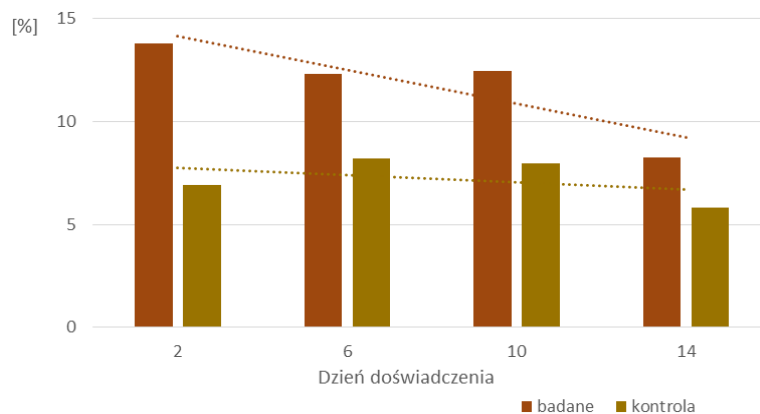
Zawartość anatabiny u roślin badanych wynosiła 17,84% w 2 dniu i obniżała się do 8,31% w 14 dniu doświadczenia. W przypadku roślin kontrolnych zawartość anatabiny zmniejszała się od 14,36% w 2 dniu doświadczenia do wartości 6,72% w 14 dniu.



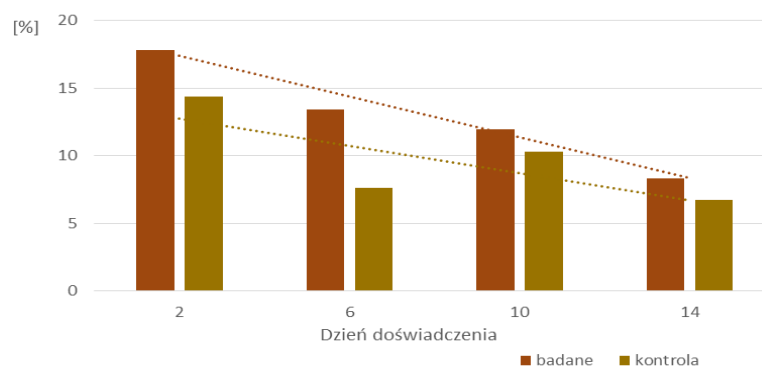
Rys. 15. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości nikotyny w korzeniach odmiany VPPG 78, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 16. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości normikotyny w korzeniach odmiany VPPG 78, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 17. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości anabazyny w korzeniach odmiany VPPG 78, w zależności od długości trwania stresu suszy.



Rys. 18. Wpływ stresu suszy na zmiany w średniej zawartości anatabiny w korzeniach odmiany VPPG 78, w zależności od długości trwania stresu suszy.

W dalszym etapie realizacji tematu badawczego 1 określono wpływ stresu suszy na zawartość cukrów redukujących w próbkach tytoniu (tab. 1). Łącznie wykonano 96 analiz (2 genotypy x 4 punkty czasowe x 2 (kontrola + badane) x 3 powtórzenia biologiczne x 3 powtórzenia analityczne). Wykazano, że dla genotypu PH168 zawartość cukrów redukujących dla roślin badanych wynosi w 2 dniu doświadczenia 14,5% po czym w 10 dniu spadła do 14,1% i utrzymała tę wartość w 14 dniu stresu suszy. Dla porównania rośliny kontrolne w 2 dniu doświadczenia miały znacząco niższą zawartość cukrów redukujących wynoszącą średnio 10,8%, która w kolejnych dniach wzrastała do 14,3% w 6 dniu doświadczenia i osiągała 14,6% w 10 dniu doświadczenia i taka wartość utrzymywała się do 14 dnia.

Dla genotypu VPPG 78 charakterystyczne jest niższe początkowe stężenie cukrów redukujących wynoszące 11,3%, które w kolejnych dniach doświadczenia wzrastało. W 6 dniu wynosiło 14% i w 10 dniu ustabilizowało się na poziomie 14,1%. Również w przypadku roślin kontrolnych obserwowano powolny wzrost zawartości cukrów redukujących od 12,9 w 2 dniu doświadczenia do 13,7% w 10 i 14 dniu.

Tabela. 1. Wpływ stresu suszy na średnią zawartość cukrów redukujących.

Genotyp	Dzień			
	2	6	10	14
PH 168 badane	14.5	13.7	14.1	14.1
PH 168 kontrola	10.8	14.3	14.6	14.6
VPPG 78 badane	11.3	14.0	14.1	14.1
VPPG 78 kontrola	12.9	13.8	13.7	13.7

Dyskusja

Podstawowym źródłem zaopatrzenia roślin w wodę są opady atmosferyczne, jednak ich ilość często jest niewystarczająca, a nierównomierne rozłożenie w sezonie wegetacyjnym powoduje okresowe niedobory wody. Niedostateczne zaopatrzenie roślin wodę wywołuje reakcję stresową, której rezultatem są zmiany fizjologiczne, biochemiczne i molekularne. Z punktu widzenia rolniczego najważniejszą konsekwencją tych zmian jest obniżenie wielkości i jakości plonu.

W procesie ewolucji rośliny wykształciły szereg mechanizmów pozwalających na zminimalizowanie skutków działania niedoboru wody. Jednym z nich jest aktywacja genów warunkujących tolerancję na suszę (Zhou i in. 2017). Badania prowadzone na *Arabidopsis* wykazały, że podczas niedoboru wody aktywowane są dwie grupy genów (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki 2007). Pierwsza to geny kodujące białka regulatorowe zaangażowane w odbieranie sygnału stresu między innymi AREB1, DREB2, NAC1 i WRKY aktywujące ekspresję innych genów (Munns 2002). Druga grupa genów biorących udział w odpowiedzi roślin na stres niedoboru wody to geny odpowiedzialne za produkcję białek warunkujących redukcję bądź naprawę szkodliwych zmian. Wśród nich można wyróżnić: dehidryny (DHN) i białka opiekuńcze tzw. chaperony (Dziadczyk 2002, Rabbani i in. 2003). Tytoń jest gatunkiem o dość dużych wymaganiach wodnych w porównaniu z innymi uprawami przemysłowymi. Jest szczególnie wrażliwy na niedobór wody w fazie wydłużania łodygi i intensywnego wzrostu liści (Cakir 2011; Peng i in. 2015). Ograniczony dostęp do wody wpływa negatywnie na przebieg wielu procesów fizjologicznych. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że istnieje zróżnicowanie odmianowe pod względem wrażliwości na stres suszy. Obserwowane w prowadzonych w ramach zadania nr 40 badaniach zahamowanie wzrostu oraz ograniczenia w rozwoju powierzchni liści

potwierdzają badania prowadzone przez Shtereva i in. 2017. Wykazano w nich że silny stres suszy spowodował 5-6 krotną redukcję świeżej masy roślin, 3 krotnie mniejszą długość i szerokość liści jak również wydatne ograniczenie wysokości roślin, w porównaniu do warunków optymalnego nawodnienia. Deficyt wody w glebie wywołał także 41-52,5% spadek względnej zawartości wody (RWC) w liściach tytoniu oraz przedwczesne starzenie się liści. Obserwuje się także spadek efektywności procesu fotosyntezy co przyczynia się do zahamowania wzrostu roślin, a w konsekwencji obniżenia potencjału plonotwórczego (Vankova i in. 2011).

Nikotyna i cukry redukujące mogą wpływać na smak dymu papierosowego i są ważnymi parametrami wpływającymi na jakość liści tytoniu. W warunkach dobrego nawodnienia nie zaobserwowano istotnych różnic w czasie, w zawartości nikotyny u dwóch badanych odmian. Po stresie suszy zawartość nikotyny wykazywała wyraźny wzrost w odmianie PH 168, podczas gdy w odmianie VPPG 78 pozostawała na niemal nie zmienionym poziomie, zarówno w liściach jak i korzeniach. Zawartość nikotyny w odmianie VPPG 78 była niższa niż w PH 168. Dodatkowo zaobserwowano niższą zawartość nikotyny w korzeniach odmiany VPPG 78 w stosunku do liści tej odmiany. W badaniach Su i in. 2017 uzyskał odmienne wyniki. W jego badaniach wykorzystane odmiany LJ851 i JX6007 w czasie stresu suszy obydwie zwiększały zawartość nikotyny. Co więcej odmiana JX6007 wykazywała znacznie wyższą zawartość nikotyny niż LJ851 po 10 i 14 dniach suszy.

Zmiany zawartości cukrów redukujących zachodziły w niewielkim stopniu. Warto jednak zauważyć, że w przypadku odmiany PH 168 z każdym dniem zawartość cukrów malała, a w roślinach kontrolnych nieznacznie rosła podczas gdy w przypadku odmiany VPPG 78 zarówno w roślinach kontrolnych i badanych zawartość cukrów redukujących rosła do 6 dnia doświadczenia, po czym się stabilizowała.

W badaniach Su i in., 2017 zawartość cukrów redukujących wykazywała duży spadek w warunkach suszy w dwóch odmianach. Dodatkowo odmianę LJ851 cechowała większa zawartość cukrów redukujących niż w JX6007 po 10 i 14 dniach warunków stresowych. Wszystkie 4 odmiany badane przez Su i in. 2017 wykazywało większą zawartość cukrów redukujących niż badane w zad. 40 odmiany PH 168 i VPPG 78.

Wnioski

- W wyniku stresu suszy następuje ograniczenie wysokości i pola powierzchni liści roślin badanych w stosunku do roślin kontrolnych
- W przypadku odmiany PH 168 w wyniku stresu suszy zwiększeniu ulega zawartość nikotyny, nornikotyny, anabazyny i anatabiny w liściach, nikotyny i nornikotyny w korzeniach i na zbliżonym poziomie utrzymuje się zawartość anabazyny i anatabiny w korzeniach
- U odmiany VPPG 78 w warunkach stresu suszy zawartość nikotyny w liściach utrzymuje się na zbliżonym poziomie, nornikotyny i anabazyny rośnie, zaś anatabiny maleje; w korzeniach zawartość nikotyny rośnie, a pozostałych alkaloidów maleje
- U odmiany PH 168 z każdym dniem stresu suszy zawartość cukrów redukujących malała, podczas gdy u odmiany VPPG 78 rosła do 6 dnia doświadczenia, po czym się stabilizowała

Mierniki dla tematu badawczego 1:

Lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba testowanych genotypów tytoniu wykorzystanych w badaniu zmian morfologicznych	2	2

2	Liczba próbek tytoniu poddanych analizie chemicznej (2 genotypy x 4 punkty czasowe x 2 (kontrola + badane) x 3 powtórzenia	48	48
---	--	----	----

3.2 Temat badawczy 2

Cel tematu badawczego 2:

Celem prowadzonych badań było przygotowanie i uzyskanie bibliotek DNA do sekwencjonowania NGS transkryptomu tytoniu, uzyskanie sekwencji nukleotydowych oraz identyfikacja genów zaangażowanych w odpowiedź rośliny na stres suszy i określenie różnic w ich ekspresji

Cel tematu badawczego 2 został osiągnięty.

Materiały i metody

Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania

Próbki roślinne zgromadzone w 4 punktach czasowych w temacie badawczym nr 1 pochodzące od 2 genotypów różniących się reakcją na stres suszy zostały poddane homogenizacji, a następnie były poddane izolacji RNA z wykorzystaniem zestawu do izolacji RNA – Qiagen RNeasy Plant Mini Kit. Do przygotowania wysokiej jakości bibliotek do sekwencjonowania została wykorzystana technologia QuantSeq 3'mRNA-Seq (Lexogen). W pierwszym etapie uzyskano cDNA. W tym celu 100 ng wyizolowanego RNA zawieszono w 5 µl wody zmieszano z 5 µl First Strand cDNA Synthesis Mix 1 (FS1). Przepipetowano, zwirowano i mieszaninę denaturowano w 85°C przez 3 min., a następnie schłodzono do 42°C. W międzyczasie przygotowano drugą mieszaninę zawierającą 9,5µl First Strand Sythesis Mix 2 (FS2) i 0,5µl Enzyme Mix (E1), którą przepipetowano, zwirowano i inkubowano w temperaturze 42°C przez 3 min. Do pierwszej mieszaniny dodano 10 µl mieszaniny FS2/E1 i inkubowano w 42°C przez kolejne 15 min. Po zsyntetyzowaniu cDNA usuwano RNA poprzez dodanie do mieszaniny 5µl RNA Removal Solution (RS), inkubację w 95°C przez 10 min i końcowe schłodzenie do 25°C. W kolejnym kroku konwertowano bibliotekę do dwuniciowej formy (dsDNA). Synteza drugiej nici DNA była inicjowana przez zastosowanie randomowych starterów zawierających na swoich 5'-końcach sekwencję adaptorową kompatybilną z technologią Illumina. W tym celu do wystudzonej mieszaniny dodawano 10µl Second Strand Mix 1 (SS1), inkubowano w 98°C przez 1 min., powoli schładzano do 25°C z szybkością 0,5°C/sek. i inkubowano w 25°C przez 30 min. Po inkubacji dodawano 5µl mieszaniny złożonej z 4 µl Second Strand Synthesis Mix 2 (SS2) i 1 µl Enzyme Mix 2 (E2) i ponownie inkubowano w 25°C przez 15 min. Po przygotowaniu dwuniciowej biblioteki, w celu usunięcia zbędnych składników reakcji poddawano ją oczyszczaniu z wykorzystaniem kulek magnetycznych. W tym celu do biblioteki dodawano 16µl kulek Purification Beads (PB) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 min. Następnie próbki umieszczano w statywie magnetycznym na 5 min., supernatant odrzucano, dodawano 40 µl Elution Buffer (EB), próbki wyjmowano ze statywu, przepipetowano do całkowitego rozpuszczenia kulek i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 min. Dodawano 56 µl Purification Solution (PS) i inkubowano 5 min. w temperaturze pokojowej. Próbki ponownie umieszczano w statywie magnetycznym i inkubowano przez 5 min. Supernatant odrzucano, dodawano 120 µl 80% etanolu i inkubowano przez 30 sek. Supernatant odrzucano, a płukanie etanolem powtarzano łącznie 2-krotnie. Po płukaniu kulki suszono przez 10 min. po czym dodawano 20 µl Elution Buffer (EB), próbki wyjmowano ze statywu i inkubowano przez 2 min. w temperaturze pokojowej. Ponownie próbki umieszczano w statywie

magnetycznym i inkubowano 5 min. 17 μ l czystego supernatantu przenoszono do nowej probówki. Tak uzyskaną oczyszczoną bibliotekę DNA poddawano indeksowaniu indeksami i7. W tym celu dodawano do niej 8 μ l mieszaniny złożonej z 7 μ l PCR Mix (PCR) i 1 μ l Enzyme Mix (E3) oraz dodawano 5 μ l indexów i7. Mieszaninę poddawano 15 cyklom reakcji PCR:

Denaturacja wstępna: 98°C, 30 sek

Denaturacja: 98°C, 10 sek.

Przyłączanie starterów: 65°C, 20 sek.

Elongacja: 72°C, 30 sek ----- 15 cykli

Elongacja końcowa: 72°C, 1 min.

Chłodzenie: 10°C

Końcowym etapem przygotowania biblioteki było jej oczyszczenie ze składników reakcji PCR, które mogłyby utrudniać dokładne określenie stężenia biblioteki. Do mieszaniny poreakcyjnej dodawano 30 μ l kulek magnetycznych Purification Beads (PB) i inkubowano 5 min. w temperaturze pokojowej. Próbki umieszczano w statywie magnetycznym, inkubowano 5 min. supernatant odrzucano, dodawano 30 μ l Elution Buffer (EB), próbki wyjmowano ze statywu i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 min. Następnie dodawano 30 μ l Purification Solution (PS) i inkubowano 5 min. Próbki umieszczano w statywie magnetycznym na 5 min, supernatant odrzucano, dodawano 120 μ l 80% etanolu i inkubowano przez 30 sek. Supernatant odrzucano, a płukanie etanolem powtarzano łącznie 2-krotnie. Po płukaniu kulki suszono przez 10 min. po czym dodawano 20 μ l Elution Buffer (EB), próbki wyjmowano ze statywu i inkubowano przez 2 min. w temperaturze pokojowej. Ponownie próbki umieszczano w statywie magnetycznym i inkubowano 5 min. 17 μ l czystego supernatantu przenoszono do nowej probówki.

Kontrola jakości uzyskanych bibliotek

Kontrolę jakości uzyskanych bibliotek przeprowadzano metodą elektroforezy kapilarnej na aparacie Bioanalyzer 2100 (agilent Technologies) z wykorzystaniem chipów High Sensitivity DNA.

Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie DNA przeprowadzono na aparacie MiSeq (Illumina) w trybie single-end z wykorzystaniem odczynników v2 i długością odczytu 150-bp. Metodą fluorymetryczną wyznaczono stężenie bibliotek, po czym ich stężenia zostały znormalizowane, a następnie poddane denaturacji za pomocą roztworu 0,2N NaOH. Tak przygotowane biblioteki rozcieńczono do końcowego stężenia 6 pM i wzbogacono w 5% kontrolę wewnętrzną PhiX.

Analiza bioinformatyczna

Uzyskane pliki FASTQ poddano ocenie jakości uzyskanych sekwencji w programie FastQC, po czym za pomocą programu Trimmomatic usunięto sekwencje adaptorów, poly(A)/poly(T) i sekwencje niskiej jakości lub bardzo krótkie < 20 nukleotydów.

Przefiltrowane i przycięte sekwencje mapowano na genomie referencyjnym przy pomocy programu Bowtie2Mapper oraz Star. Różnicowa analiza ekspresji genów została przeprowadzona przez określenie liczby odczytów jednoznacznie zmapowanych do konkretnego genu i całkowitą liczbę jednoznacznie zmapowanych odczytów w próbce.

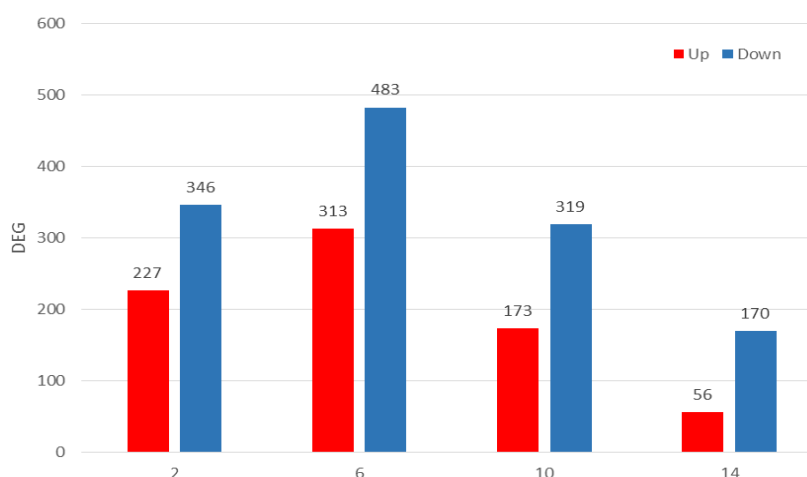
Różnicowa analiza ekspresji genów została wykonana przy użyciu metody RPKM (Reads Per Kb per Million reads).

Aby porównać geny o zróżnicowanej ekspresji (DEG) między kontrolą i próbkami poddanymi działaniu stresu suszy, obliczono prawdopodobieństwo, że jeden gen G w dwóch próbkach ma jednakową ekspresję, które można wyrazić wartością p . Próg wartości p dla testów wielokrotnych został określony przez FDR (False Discovery Rate).

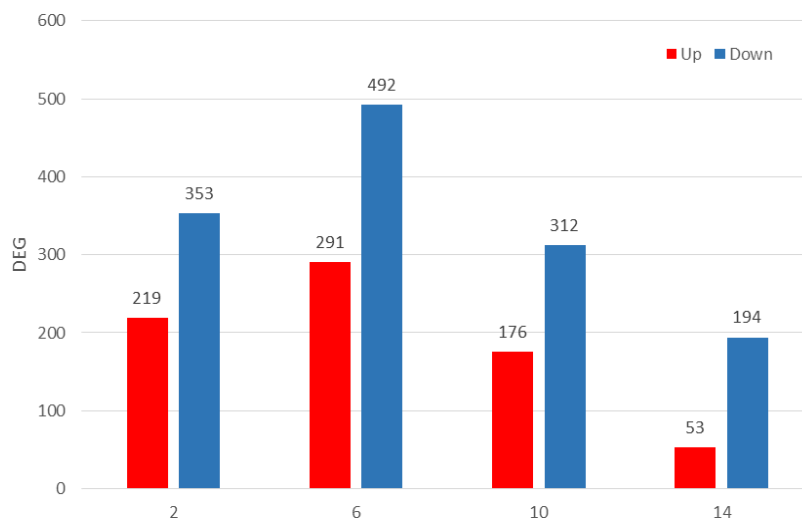
Jako danych wejściowych do oprogramowania DEseq służącego do identyfikacji genów o różnej ekspresji użyliśmy zliczeń sekwencji zmapowanych genów z anotacjami. Oprogramowanie to wykorzystuje ujemny model rozkładu dwumianowego do testowania zróżnicowanej ekspresji genów. Do detekcji DEG przyjęto parametry $FDR < 0,05$ i $\log_2\text{-fold-change} > 2$.

Wyniki

Aby zidentyfikować geny, których ekspresja ulega zmianie pod wpływem stresu suszy, wykorzystano oprogramowanie DEseq. Zidentyfikowano odpowiednio 573, 796, 492 i 226 DEG między porównaniami rośliny badane – rośliny kontrolne dla 4 punktów czasowych w obrębie genotypu VPPG 78 (rys. 19) oraz 572, 783, 488 i 247 DEG między porównaniami rośliny badane – rośliny kontrolne dla 4 punktów czasowych w obrębie genotypu PH 168 (rys. 20).

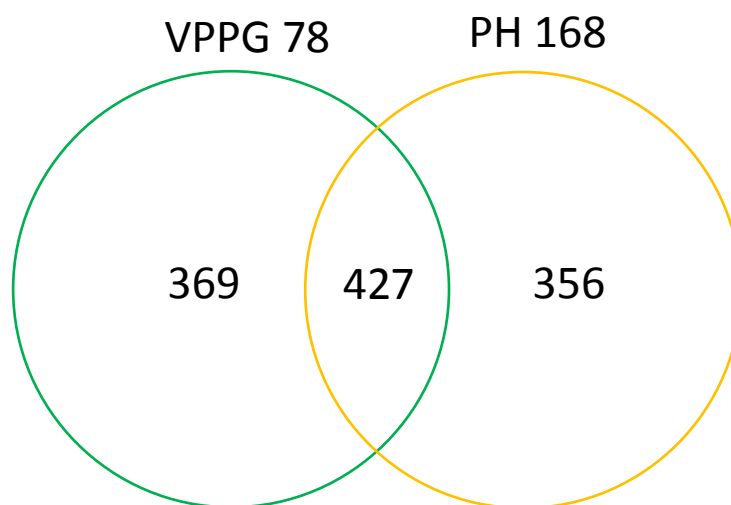


Rys.19. Analiza zmian w ekspresji genów roślin badanych i kontrolnych w genotypie VPPG 78. DEG o zwiększonej ekspresji (up-regulated) oznaczono kolorem czerwonym, a o zmniejszonej ekspresji kolorem niebieskim (down-regulated).



Rys.20. Analiza zmian w ekspresji genów roślin badanych i kontrolnych w genotypie PH 168. DEG o zwiększonej ekspresji (up-regulated) oznaczono kolorem czerwonym, a o zmniejszonej ekspresji kolorem niebieskim (down-regulated).

W przypadku obydwu genotypów największą liczbę DEG obserwowano w 6 dniu doświadczenia. Nakładające się DEG między dwoma genotypami z 6 dnia doświadczenia pokazano na diagramie Venna (rys. 21). 427 DEG ulegało ekspresji wspólnie w obydwu genotypach podczas gdy 369 i 356 odpowiednio w VPPG 78 i PH 168.



Rys.21. Diagram Venna nakładających się DEG między genotypami VPPG 78 i PH 168 w 6 dniu stresu suszy.

Analiza anotacji ontologii genów (GO) wykazała, że zarówno geny regulowane w górę, jak i regulowane w dół można podzielić na ponad 40 kategorii. Kategorie te były oparte na dominującej funkcji, takiej jak kataliza, przekazywanie sygnałów, regulacja transkrypcji, regulacja enzymatyczna itp.

Geny o największych różnicach w ekspresji zarówno w górę jak i w dół przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Geny wykazujące największe zmiany w ekspresji genów pod wpływem stresu suszy.

Gene ID	Log2-fold (badane/kontrola)	p-value	Regulacja (badane/kontrola)	Annotacja
gene_26451	8,56	8,61E-05	Up	Białko szoku termicznego 90.1
gene_36213	9,47	5,04E-06	Up	Białko szoku termicznego 70B
gene_14328	8,16	5,44E-04	Up	Białko jak chaperonoowe HSP20
gene_23143	-9,66	2,64E-03	Down	Przyłączanie chlorofilu
gene_17595	-7,4	1,45E-03	Down	Rodzina białek utrzymujących minichromosom (MCM2/3/5)
gene_33741	-5,8	1,01E03	Down	Cyklina B2

Dyskusja

W procesie ewolucji rośliny wykształciły szereg mechanizmów pozwalających na zminimalizowanie skutków działania niedoboru wody. Su i in. 2017 wykorzystując reakcję Real-Time qPCR wykazali, że u odmian uprawnych tytoniu ekspresja genów psb A, psb B, psb C, psb D, RBCL i ClpP1 kodujących struktury białkowe fotosystemu II jest silnie i szybko aktywowana 10-dniowym stresem suszy. Dowiedli również, że w warunkach deficytu wody odmiana LJ851 wykazywała większą intensywność procesu fotosyntezy w porównaniu do odmiany JX6007 co było wynikiem zwiększonej ekspresji genów psbA, psbD oraz RBCL. Również w badaniach prowadzonych w 2021 r. w ramach realizacji zadania nr 40 obserwowano wzrost aktywności genów AREB1, DREB2, NAC1 i WRKY. Już po dwóch dniach doświadczenia stwierdzono wzrost ekspresji badanych genów odpowiedzialnych za odpowiedź na stres suszy. Ponadto w 2022 r. przeprowadzono analizę bioinformatyczną transkryptomu tytoniu. Wykazano, że w odpowiedzi roślin tytoniu na stres suszy zaangażowanych jest kilkaset różnych genów należących do ponad 40 kategorii funkcjonalnych. Wśród tych genów istnieją zarówno takie, które zwiększają swoją ekspresję np. gen cykliny B2, jak i takie które zmniejszają swoją ekspresję. Podobne prace prowadzili Khan i in. 2019, którzy zidentyfikowali 798 genów, z czego 443 w przypadku stresu suszy było regulowanych do góry lub w dół, a po ustaniu suszy zachowywało się przeciwnie. Analiza anotacji funkcjonalnych tych genów wykazała znaczną regulację ekspresji w górę genów, u których odnotowano, że biorą udział w odpowiedziach na bodźce i stres (np. białka szoku cieplnego), obronę antyoksydacyjną (np. peroksydazy i S-transferazy glutationu), regulację w dół geny związane ze szlakiem cyklu komórkowego i procesami fotosyntezy. Wśród tych genów duża część pokrywała się z genami badanymi w ramach zadania nr 40. Spośród DEG badanych przez Yin i in. 2015a, znaleziono również 82 czynniki transkrypcyjnych (TF), m. in. NAC1, czy WRKY, które były badane w zadaniu nr 40. W innych badaniach nad odpowiedzią roślin tytoniu na stres suszy zidentyfikowano 1476 regulowanych w górę i 1574 regulowanych w dół genów, które pogrupowano w 43 kategorie funkcjonalne zaangażowane w siedem znaczących szlaków metabolicznych, głównie zaangażowanych w metabolizm, transdukcję sygnału i transport komórkowy (Yin i in., 2015b)

Wnioski

- W odpowiedzi roślin tytoniu na stres suszy na poziomie molekularnym zaangażowanych jest kilkaset genów
- Geny biorące udział w odpowiedzi na stres suszy mogą być regulowane zarówno w górę jak i w dół

Mierniki dla tematu badawczego 2:

Lp.	miernik ²	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
2.1	Liczba zanalizowanych bibliotek (2 genotypy x 4 punkty czasowe = 8 bibliotek)	8 bibliotek	8 bibliotek

3.4 Literatura

- Cakir R., 2011. Effect of water stress during different developmental stages on some growth indices of flue-cured Virginia tobacco. *Research on crops* 12(2): 482-488.
- Dziadczyk P., 2002. Genetyczne uwarunkowanie tolerancji na stropy abiotyczne roślin. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych* 481: 49-60.
- Khan R., Zhou P., Ma X., Zhou L., Wu Y., Ullah Z., 2019. Wang S. Transcriptome profiling, biochemical and physiological analyses provide new insights towards drought tolerance in *Nicotiana taacum* L. *Genes* 10, 1041.
- Munns R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25: 239-250.
- Peng S.Z., Gao X.l., Yang S.H., Yang J., Zhang H.X., 2015. Water requirement pattern for tobacco and its response to water deficit in Guizhou Province. *Water Science and Engineering*, 8(2): 96-101.
- Rabbani M.A., Maruyama K., Abe H., Khan M.A., Katsura K., Ito Y., Yoshiwara K., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2003. Monitoring expression profiles of rice (*Oryza sativa* L.) genes under cold, drought and high-salinity stresses, and ABA application using both cDNA microarray and RNA gel blot analyses. *Plant Physiology* 133: 1755-1767.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58(2): 221-227.
- Shtereva L., Stimenova E., Drumeva-Yoncheva M., Michailova B., Kartzeva T., Vassilevska-Ivanova R., 2017. Response of Virginia (flue-cured) tobacco gnotypes to waterdeficit stress. *Archives of Biological Science*, 69(1): 119-127.
- Su X., Wei F., Huo Y., Xia Z., 2017. Comparative physiological and molecular analyses of two tobacco contrasting flue-cured tobacco genotypes under progressive drought stress. *Frontiers in Plant Science* 8(article 827):1-13.
- Vankova R., Dobra J., Storchova H., 2011. Recovery from drought stress in tobacco. *Plant Signaling and Behavior*, 7(1): 19-21.
- Yin F., Liu M., Gao J., Zhang W., Qin C., Yang A., Luo, C., Liu H., Shen Y., Lin H., Zhang Z., Pan G, 2015a. Analysis of global gene expression profiles in tobacco roots under drought stress. *Open Life Sci.* 10:339-353.
- Yin F., Qin C., Gao J., Liu M., Luo X., Zhang W., Liu H., Liao X., Shen Y., Mao L., Zhang Z., Lin H., Lubberstedt T., Pan G., 2015b. Genome-wide identification and analysis of drought –responsive genes and microRNAs in tobacco. *Int. J. Mol. Sci.* 16:5714-5740.
- Zhou R., Yu X., Ottosen C.O., Roseqvist E., Zhao L., Wang Y., Yu W., Ahao T., Wu Z., 2017. Drought stress had a predominant effect over heat stress on three tomato cultivars subjected to combined stress. *BMC Plant Biology* 17(24): 1-13. DOI 10.1186/s12870-017-0974-x

4. Prezentacja wyników badań

Wykład na Międzynarodowym Kongresie Naukowym CORESTA Centre de Coopération pour les Recherches Scientifiques Relatives au Tabac, 10-28.10.2022

Wykład w formie prezentacji pdf stanowi załącznik do sprawozdania

5. Adres, pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:

<http://chmiel.iung.pl/transhoptab/wyniki.html>

6. Miernik zadania - stopień realizacji

Lp.	miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji miernika
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1.1	Liczba testowanych genotypów tytoniu wykorzystanych w badaniu zmian morfologicznych	2	2	100%
1.2	Liczba próbek tytoniu poddanych analizie chemicznej (2 genotypy x 4 punkty czasowe x 2 (kontrola + badane) x 3 powtórzenia	48	48	100%
temat badawczy 2				
2.1	Liczba zanalizowanych bibliotek (2 genotypy x 4 punkty czasowe = 8 bibliotek)	8 bibliotek	8 bibliotek	100%
			Średnia	100%
			% realizacji zadania	100%

Sporządzono:

Pieczczę jednostki

Instytut Uprawy Nawożenia
i Gleboznawstwa
Państwowy Instytut
Badawczy
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy

Osoba reprezentująca jednostkę

prof. dr hab. Wiesław Aleksander Oleszek

Kierownik zadania

dr Marcin Przybyś

06.12.2022 r.

data

podpis i pieczęć

podpis