Salaš, P. (ed): "Rostliny v suchých oblastech a klimatická změna". Lednice 23.- 24. 10. 2019 Zahradnictví: Vědecká příloha. Praha: Profi Press, 2019, XVIII(11), 200 - 211. ISSN 1213-7596

VLIV SUCHA NA PŠENICI – POROVNÁNÍ KOMPLEXNÍ REAKCE DVOU RŮZNĚ TOLERANTNÍCH ODRŮD

Effect of drought to wheat – comparison of complex reaction of two different tolerant varieties

Bláhová T[1, 2]., Vítámvás P.[1], Prášil T.I.[1], Renaut J.[3]

[1]Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Česká republika
[2] Vysoká škola chemicko-technologická, Česká republika
[3]Luxembourg Institute of Science and Technology, Luxembourg

Abstrakt
V České republice je sucho stále aktuálnějším zemědělským problémem, z tohoto důvodu byla na VÚRV-Ruzyně provedena rozsáhlá analýza vlivu sucha na pšenici. Byly studovány dvě odrůdy pšenice ozimé (Baletka – tolerantní, Tobak – senzitivní), přičemž byly provedeny analýzy fyziologických parametrů, proteomu listů a uzlů pomocí dvoudimenzionální diferenční gelové elektroforézy (2D-DIGE) a dále také analýza metabolomu. Díky takto navzájem se doplňujícím metodám jsme získali komplexní obraz rostlinné reakce na stres, a mohli poukázat na fakt, že toleranci pšenice k suchu pozitivně ovlivňuje nejen zvýšená, popř. rychlejší syntéza ochranných proteinů, resp. osmoprotektantů (např. dehydrinů, resp. prolinu), ale zejména celková regulace rostlinné odpovědi pomocí zvýšené syntézy specifických proteinů a metabolitů rostlinného metabolismu.
Klíčová slova: pšenice, proteomická komparativní analýza, 2D-DIGE, tolerance sucha

Abstract
In Czech republic, drought is becoming a still more current agricultural problem. Due to this reason, a complex analysis of influence of drought to wheat was at Crop Research Institute in Prague performed and two varieties of winter wheat (Baletka – drought tolerant, Tobak - drought sensitive) were studied. Partial analyses were focused to physiological parameters, leaf and crown proteoms using two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and metabolom analysis using GC-MS. Thanks these complementary methods we obtained really complex view of plant response to drought, and we can show that wheat drought tolerance is influenced not only by the increasing (or faster) biosynthesis of protective proteins, resp. osmoprotectans (like dehydrins, resp. prolin), but especially by controlled increased biosynthesis of specific proteins and metabolites of basic wheat metabolism.
Key words: wheat, proteomic comparative analysis, 2D-DIGE, drought tolerance

Úvod
Stres suchem je v kategorii abiotických stresů řazen svým mechanismem ke stresům chladem či vysokou salinitou, neboť i zde je hlavním stresem dehydratace. Lze tedy očekávat změny nejen v metabolismu osmoprotektantů a antioxidantů, ale i v proteinovém spektru (Kosová, et al., 2011). Late Embryogenesis Abundant proteiny (LEA) tvoří největší skupinu ochranných proteinů, které jsou indukovány dehydratací, přičemž jejich funkce není zatím plně vysvětlena. LEA proteiny jsou bohatě hydratovány, předpokládá se tedy, že vytváří v buňce ochranné vodní prostředí a mohou mít vliv i na stabilizaci membrán (Hara, 2010) (Wise &

Tunnacliffe, 2004). Většina dosud publikovaných prací zabývajících se suchem na plodinách se zabývala pouze jednou odrůdou, a většinou analyzovala pouze listy stresovaných rostlin (Wang, et al., 2015) (Cheng, et al., 2016), popř. bylo studováno pouze pár vybraných proteinů pomocí imunoblotu (Demirevska, et al., 2008) nebo byly nalezeny změny pouze v proteinech souvisejících s nespecifickou obranou proti abiotickému stresu (Ford, et al., 2011) (Chmielewska, et al., 2016). Tato studie má za cíl komplexně pozorovat změny způsobené suchem u tolerantní a senzitivní odrůdy pšenice (odrůda Baletka, resp. Tobak) v listech a v odnožovacích uzlech jednak z hlediska fyziologického stavu rostlin, dále také porovnat změny totálního proteomu a doplnit tuto komparativní analýzu sledováním změn nízkomolekulárních metabolitů. Celkově má tato studie přinést detailnější náhled na problematiku tolerance rostlin k suchu právě sledováním dynamiky rostlinného metabolismu v průběhu sucha u senzitivní a tolerantní odrůdy pšenice ve dvou orgánech.

Materiál a metody

Biologický materiál
Rostliny pšenice ozimé (*Triticum aestivum*) odrůd Baletka a Tobak byly pěstovány v klimaboxu při 19 °C, 16 h světla a se 70% vodním nasycením půdy (Soil Water Content - SWC). Od fáze plně vyvinutého druhého listu stresované rostliny vysychaly 7 dní na 30% SWC (odběr 1), kde byly udržovány 10 dnů (odběr 2) s následnou rehydratací na 70% SWC (odběr 3 - 12 hodin po zalití) po další 3 dny (odběr 4). Kontrolní rostliny byly udržovány na 70% SWC po celou dobu experimentu. Pro analýzy listů byl odebírán pouze poslední plně vyvinutý list a všechny analýzy byly provedeny ve 2 biologických a 2 technických opakování, přičemž každý vzorek obsahoval 10-11 rostlin. Z časových důvodů byly provedeny pouze dvě časové opakování experimentu, jedno pro proteomickou a druhé pro metabolomickou část, přičemž parametry a správnost průběhu experimentů byly ověřovány měřením osmolality a relativního obsahu vody v listech v průběhu obou experimentů. Hodnoty těchto fyziologických parametrů u různě časovaných experimentů nebyly odlišeny na hladině významnosti 0,01.

Analýza fyziologických parametrů
Z fyziologických parametrů byl měřen relativní obsah vody v listech (Relative water content, RWC) a osmotický potenciál, resp. osmolalita. Pro stanovení RWC se čerstvě odebrané listy saturovaly vodou po dobu min. 5 hodin při laboratorní teplotě do plného nasycení a následně byly vysušeny přes noc při 65 °C. Osmolalita byla stanovena na přístroji VAPRO 5600 (Wescor) přesně podle pokynů výrobce.

Proteomická analýza pomocí 2D-DIGE
Vzorky pro analýzu totálního proteomu byly extrahovány pomocí směsi kyselina trichloroctová/aceton/fenol (Vítámvás, et al., 2015) a pro následující analýzy byla použita 2 biologická a 2 technická opakování. Extrakty byly obarveny fluorescentními barvivy CyDye podle pokynů výrobce (GE Healthcare) a isoelektrická fokusace byla provedena za použití IPG stripů (24 cm, pI = 3-10, GE Healthcare) s max. napětím 10 000 V, 75 000 Vh; následována SDS-PAGE (2D HPETM Large Gel NF-12,5%, SERVA). Výsledné gely byly analyzovány v softwaru Samespot (TotalLab Ltd) a vybrané proteinové spoty byly identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (SciexTOF/TOF^{TM} 5800, SCIEX) a serveru MASCOT (NCBI-*Triticeae* nebo JGI-*Triticum aestivum* databáze) a na základě homologních sekvencí pomocí programu BLAST.

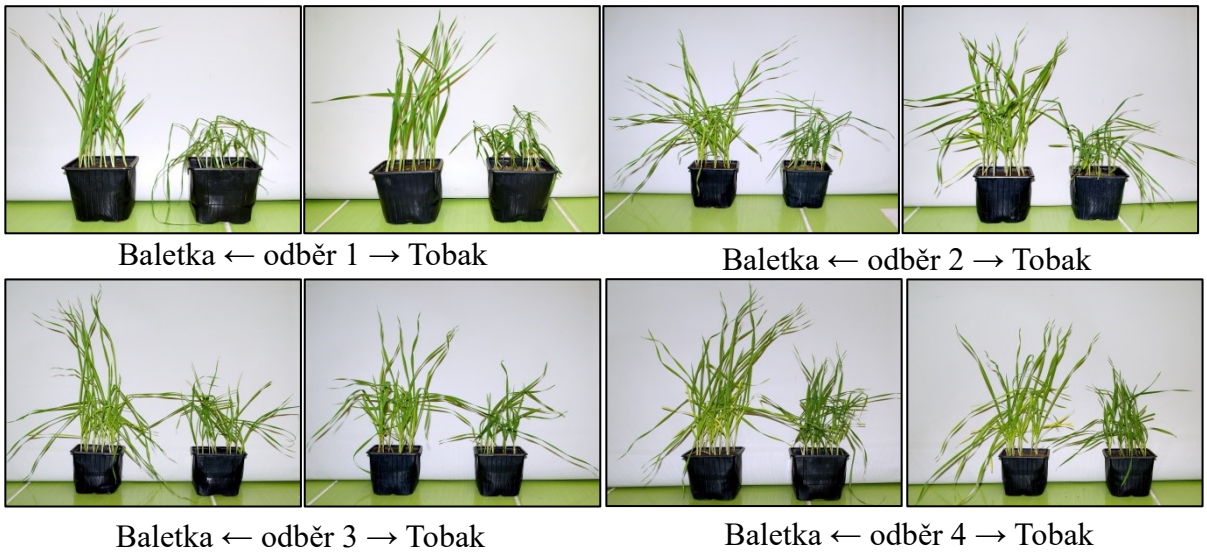
Necílová analýza metabolitů pomocí GC-MS/MS

Vzorky pro analýzu metabolom byly extrahovány podle protokolu od Lisec, et al., 2006, a pro následující analýzy byla použita 3 biologická opakování. Ve zkratce byly vzorky homogenizovány v tekutém dusíku, 18 mg lyofilizátu bylo použito pro methanol-chloroformovou extrakci metabolitů a po odpaření extrakčního rozpouštědla byly vzorky derivatizovány methoxyaminem a MSTFA. Následující analýza pomocí GC-MS probíhala na přístroji 7000C Triple Quadrupole GC/MS (Agilent) za parametrů: nástřik 1 µl vzorku ve splitless módu, průtok He 2 ml/min, 30m MDN-35 kolona, teplotní program: 2 min při 80 °C, následně 60-ti minutový gradient do 330 °C a 6 min při 330°C. Hmotnostní detekce byla provedena v rozmezí 70 – 600 m/z v rozsahu 20 scanů za sekundu (Lisec, et al., 2006).

Statistická analýza
Statistické analýzy probíhaly v programu R, verze 3.5.3, kde byly vzorky porovnávány na základě t-testů s minimální hladinou významnosti 0,01, a vizualizace statisticky zpracovaných dat probíhala v programu Biovinci, verze 1.1.5.

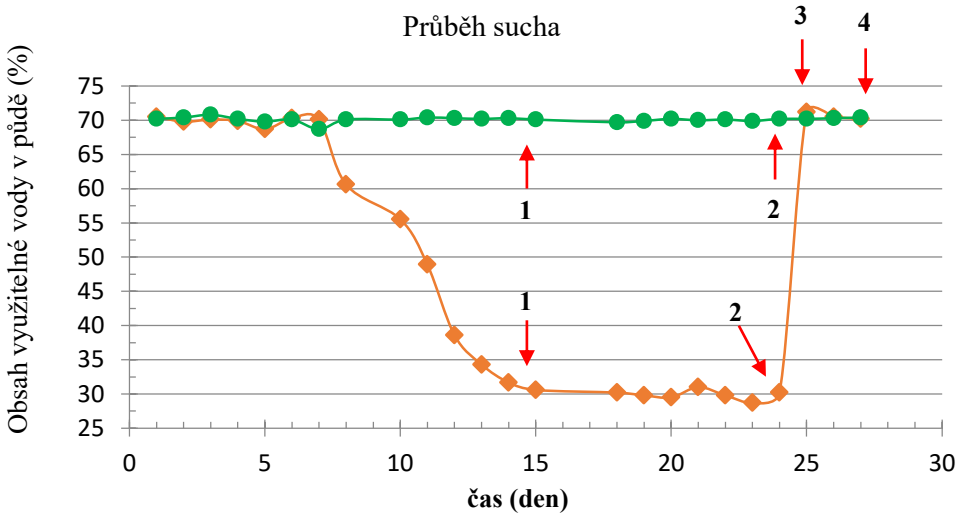
Výsledky

Fyziologické parametry



Obr 2: Stav rostlin během sucha (vlevo vždy kontrolní rostlina, vpravo stresovaná; 1, 2, 3, 4 - odběry)

Průběh sucha v tomto experimentu lze rozdělit do dvou hlavních fází – první fáze vysýchání na 30% SWC, která trvala 7 dní (odběr 1) a druhá udržování stresovaných rostlin na 30% hladině SWC (odběr 2) po dobu dalších 10 dnů. Po uplynutí této doby byly rostliny zality opět na kontrolních 70 % SWC (odběr 3), přičemž na této hladině byly udržovány další 3 dny (odběr 4, Obr. 1). Z obr. 2, který dokumentuje stav rostlin v dobách odběru, je patrno, že v prvním odběrů obě odrůdy výrazně reagují na stres suchem, tolerantní odrůda dokonce vykazuje větší svěšení listů, avšak podle analýz RWC a osmolality disponuje vyšším obsahem vody v listech a analogicky k tomu nižší osmolalitou (Obr. 3 a 4). Při dalších odběrech vizuální změny mezi odrůdami již nejsou na první pohled patrné a při analýzách RWC a osmolality byly patrné pouze rozdíly u vzorků za působení sucha, nikoli mezi kontrolami. Fyziologické parametry, resp. RWC a osmolalita, ukázaly u obou odrůd výraznou reakci na stres suchem již v jeho první fázi – při vysušení na 30% SWC, kdy hladina RWC klesla u stresovaných rostlin až k 60 % oproti kontrolám, které se držely okolo 90 %. Po 10 dnech držení 30% SWC se hladiny RWC mírně zvedají, a s těmito daty korelují také výsledky osmolality listů, neboť ta na začátku sucha dosahovala hodnot okolo 500 mmol/kg, a po 10

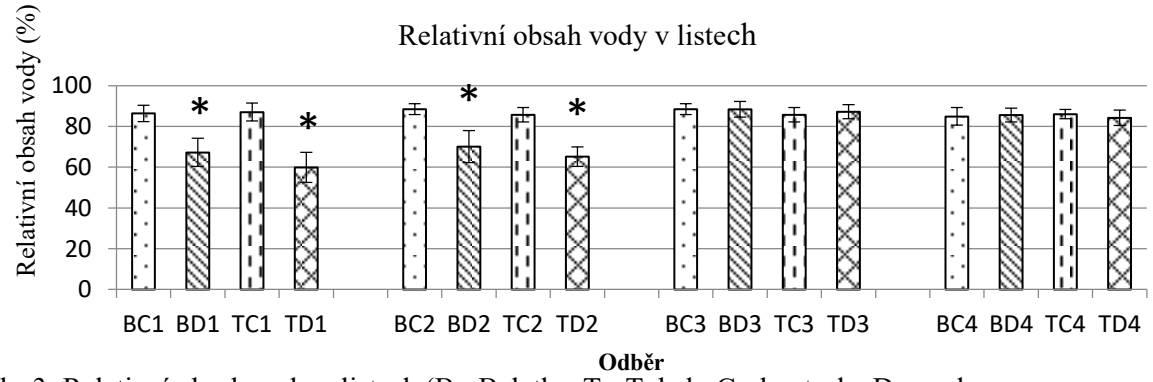


Obr 1: Průběh sucha (zelená linie - kontrolní rostliny; oranžová linie - stresované rostliny; 1, 2, 3, 4 - odběry)

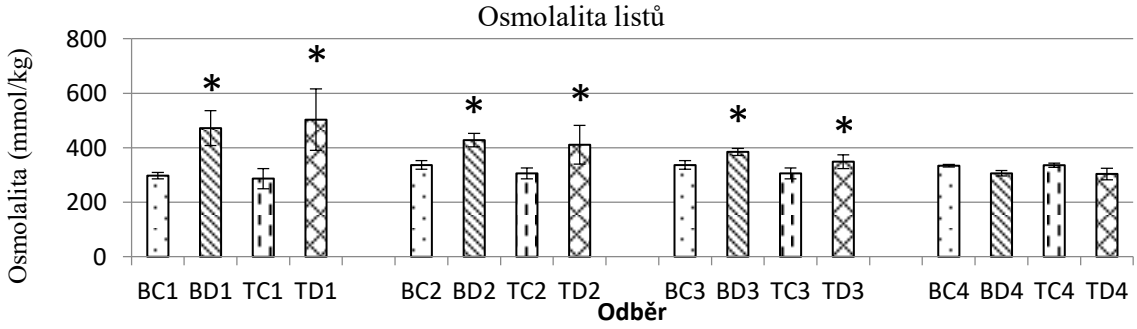
dnech držení sucha okolo 400 mmol/kg (kontrolní rostliny udržovaly osmolalitu listů okolo 300 mmol/kg). Po opětovném zalití se obě odrůdy do 3 dnů vrací na kontrolní hladiny RWC i osmolality.

Proteomická analýza

Proteomická analýza byla provedena na dvou rostlinných orgánech – listech a odnožovacích uzlech. Pomocí 2D – DIGE bylo detekováno u odnožovacích uzlů více než 2000 proteinových spotů, u listů více než 1000, přičemž mnoho z nich mělo signifikantně změněnou koncentraci proteinů (na hladině významnosti p = 0,01) mezi odrůdami či mezi kontrolami a stresovanými vzorky (Obr. 5). Při porovnání změn proteinového spektra obou orgánů lze pozorovat, že uzly vykazují cca 2x více změněných spotů. U listů je patrná menší dynamika koncentrace proteinů, je ovšem otázka, do jaké míry je to ovlivněno kontaminací mnoha spotů proteinem RUBISCO, neboť tento nejabundantnější protein se nepovedlo nijak spolehlivě odseparovat a je tedy možné, že jeho signál potlačil signály ostatních, méně zastoupených proteinů.

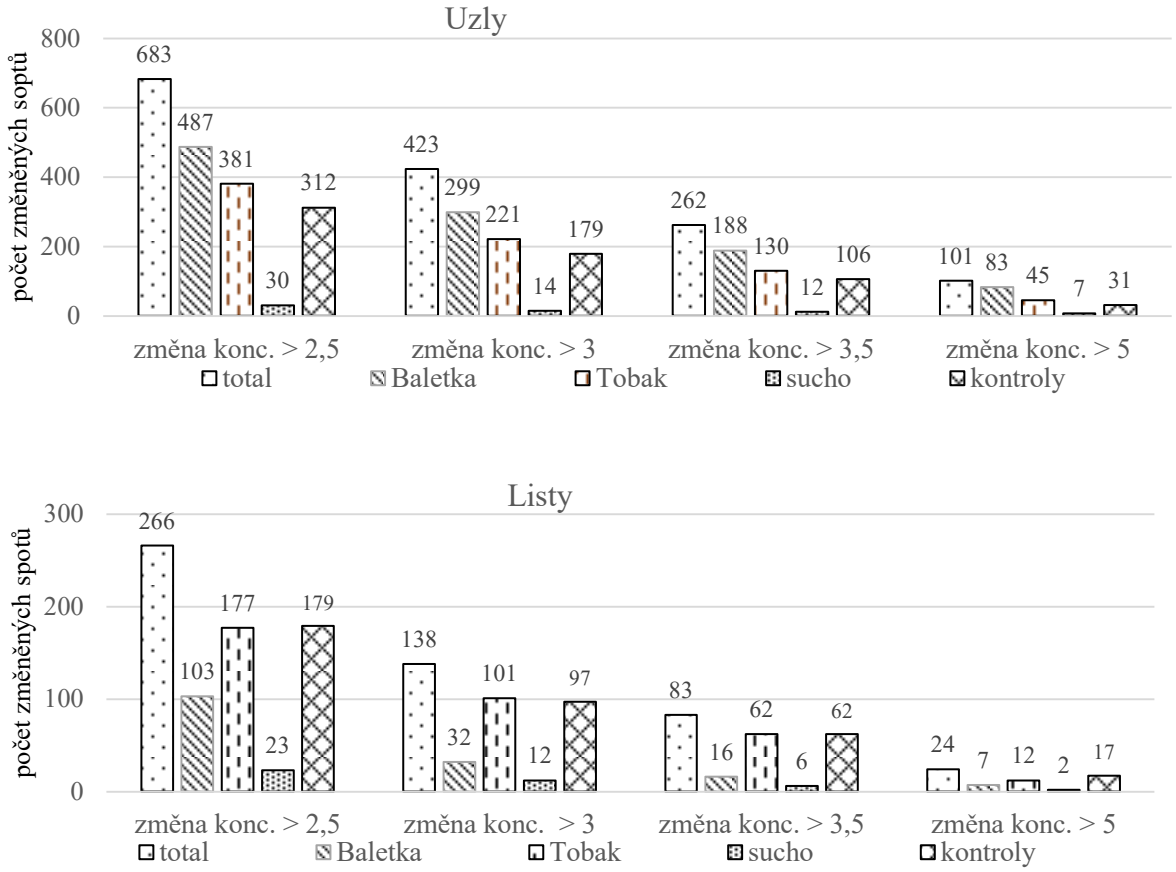


Obr 3: Relativní obsah vody v listech (B - Baletka, T - Tobak; C - kontrola, D - sucho; 1,2,3,4 - odběry, * - signifikantně změněno oproti kontrolám (p = 0,01))



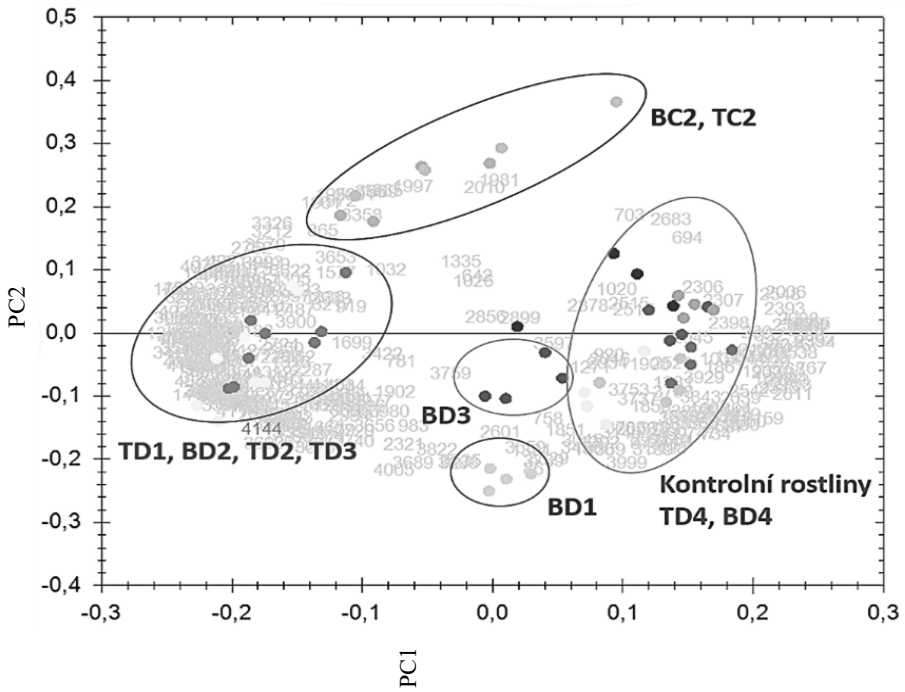
Obr 4: Osmolalita listů (B - Baletka, T - Tobak; C - kontrola, D - sucho; 1,2,3,4 – odběry; * - signifikantně změněno oproti kontrolám (p = 0,01))

Analýza hlavních komponent úspěšně rozdělila u vzorků odnožovacích uzlů stresované rostliny od kontrolních, a to i v rámci jednotlivých odběrů. Zároveň také ukázala, že již po 12 hodinách po opětovném zalití na kontrolní vlhkost půdy (70 %) se hladina proteinů u tolerantní odrůdy rychle vrací zpátky ke kontrolním hladinám a po 3 dnech již nelze stresované rostliny od kontrolních rozlišit. U Baletky se navíc již první týden po rychlém vysušení objevuje unikátní proteinový profil, kterým se Tobak nevyznačuje (Obr. 6).



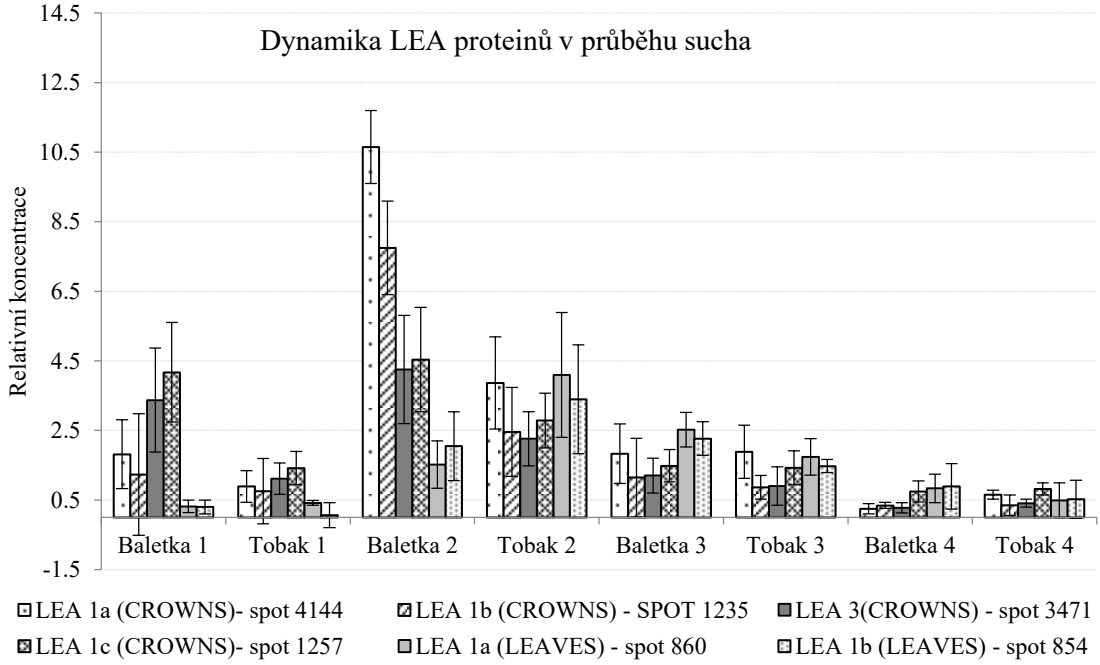
Obr 5: Změna koncentrace jednotlivých proteinových spotů

Zaměřením pouze na protektivní proteiny ze skupiny LEA byly v odnožovacích uzlech nalezeny 4 proteiny - LEA 3, dvě isoformy proteinu LEA 1 a LEA 2 protein, zvaný dehydrin, a v listech pouze dvě isoformy LEA 1 (Obr. 7). Dynamika těchto proteinů v průběhu sucha v uzlech u tolerantní odrůdy (Baletka) ukazuje rychlejší, popř. zvýšenou syntézu LEA proteinů okamžitě po začátku sucha, na rozdíl od odrůdy Tobak (senzitivní), jež netvoří



Obr 6: Analýza hlavních komponent proteinových spotů odnožovacích uzlů (B - Baletka; T - Tobak; C - kontroly; D - stresované rostliny; 1-4 - číslo odběru)

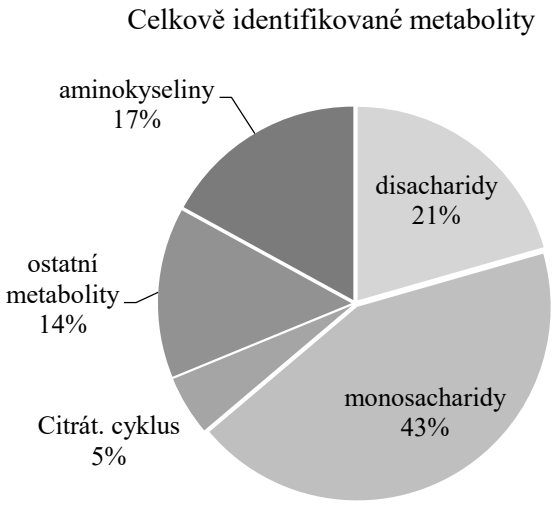
tyto proteiny v takové míře, popř. reaguje pomaleji. Opačný jev byl ovšem pozorován u LEA 1 proteinů nalezených v listech, ve kterých se u Tobaku tyto proteiny nacházely až ve 2-násobně větší koncentraci než u Baletky. Po rehydrataci na 70% SWC (odběr 3) byla v listech Baletky pozorována nezměněná hladina LEA proteinů, kdežto v uzlech obou odrůd a listech Tobaku došlo k výraznému poklesu jejich koncentračních hladin (Obr. 7).



Obr 7: Dynamika vybraných proteinů v průběhu sucha (B: Baletka; T:Tobak; 1-4: číslo odběru stresovaných rostlin)

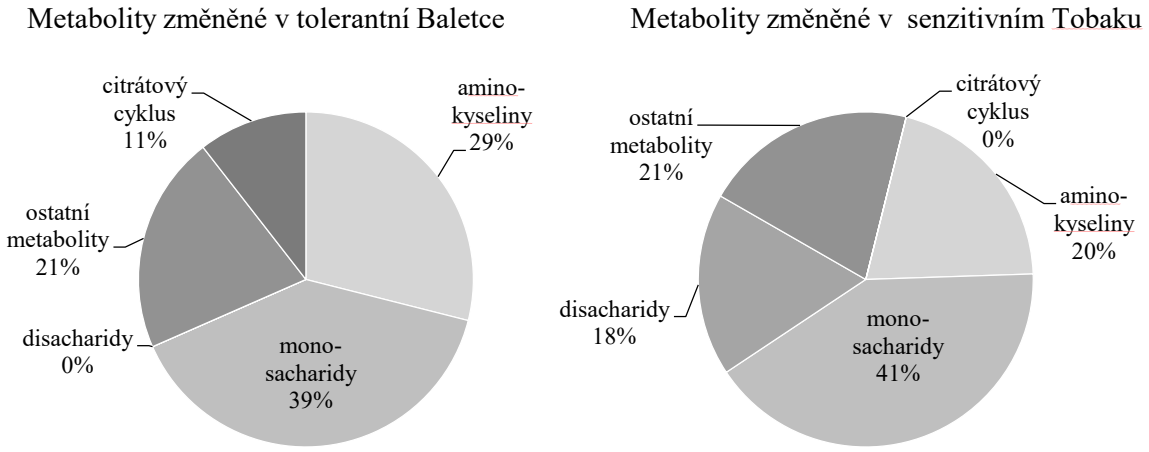
Změna metabolomického profilu za působení sucha

Analýzou metabolitů vzorků pšenice vystavené suchým podmínkám bylo nalezeno celkově cca 140 metabolitů, z nichž největší podíl, 43 %, tvořily monosacharidy jako je glukosa, fruktosa, mannosa, či jejich alkoholy a kyseliny. Dalšími nejvíce zastoupenými metabolity byly disacharidy (maltosa, melibiosa či turanosa) s 21% a aminokyseliny s 17% (Obr. 8).



Obr 8: Celkově identifikované metabolity

Při detailním pohledu na složení metabolitů v jednotlivých odrůdách během působení sucha (Obr. 9), lze pozorovat, že stresované rostliny se mezi sebou lišily nejvíce ve složení jednoduchých cukrů a jejich alkoholů, které mohou hrát roli osmoprotektantů, a aminokyselin, přičemž se překvapivě nelišily v koncentraci prolinu, který je taktéž známý osmoprotektant, ale valinu a alaninu. Zajímavější koncentrační změny byly ovšem pozorovány u ostatních metabolitů, které zahrnují např. pyridin a piperidin, quinon a askorbát. První tři zmiňované látky se vyznačovaly vyšší hodnotou u tolerantní Baletky, kdežto askorbát, který funguje jako antioxidant, byl zvýšen za působení sucha více u senzitivního Tobaku.
Překvapivé změny byly nalezeny u energetického metabolismu, kde množství monosacharidů zůstalo sice nezměněno, ale u Baletky byly signifikantně zvýšeny metabolity citrátového



Obr 9: Metabolity změněné v jednotlivých odrůdách za suchých podmínek

cyklu, kdežto u Tobaku bylo zvýšeno množství disacharidů. Tyto změny mohou signalizovat rychlejší reakci Baletky na stres suchem a rychlejší tvorbu energeticky bohatého ATP ze zásobního sacharidového poolu, na rozdíl od Tobaku, kde zvýšené množství disacharidů a nulové množství produktů citrátového cyklu mohou značit opožděnou hydrolýzu zásobních sacharidů za účelem tvorby energie.

Diskuze

Z hlediska fyziologických parametrů nebyly prokázány signifikantní rozdíly mezi kontrolními rostlinami obou odrůd; nepatrné rozdíly by prokázány pouze u vzorků za působení sucha. Tolerantní odrůda Baletka během sucha vykazovala vyšší hodnoty RWC, resp. nižší osmolalitu než Tobak, a to již od začátku působení sucha. Obě odrůdy navíc vykazovaly stejný trend, kdy při druhém odběru (dlouhodobé vysušení) byl jejich RWC vyšší a osmolalita nižší než u prvního odběru, kdy byly rostliny vystaveny rychlému vysušení na 30% vlhkost půdy. Lze tedy tvrdit, že po 10 dnech udržování sucha se již u obou odrůd nastartovala aklimatizační fáze a po skončení sucha se obě odrůdy do tří dnů dokázaly v rámci fyziologických parametrů dostat zpátky na kontrolní hodnoty. Podle fyziologických parametrů tak lze velmi dobře odlišit kontrolní a stresované rostliny, nicméně na detailní rozlišení míry tolerance jednotlivých odrůd bylo nutno použít metody proteomiky a metabolomiky.

Zaměřením se na studium totálního proteomu bylo zjištěno, že v odnožovacích uzlech bylo za sucha změněno cca 2x více změněných spotů než v listech. Analýza hlavních komponent proteinových spotů uzlů ukázala na zcela unikátní proteinový profil u tolerantní odrůdy Baletky již po prvním týdnu stresu suchem, a také úspěšně rozdělila stresované rostliny od kontrolních, a to i v rámci jednotlivých odběrů. Zároveň také ukázala, že již po 12 hodinách po opětovném zalití na kontrolní vlhkost půdy (70 %) se hladina proteinů u tolerantní odrůdy rychle vrací zpátky ke kontrolním hladinám. Senzitivní odrůda Tobak oproti tomu na stres suchem reaguje pomaleji a její proteinový profil se v jednotlivých odběrech za působení sucha i 12 hodin po zalití zásadně neliší. Toto chování tolerantní odrůdy je způsobeno jednak včasnější biosyntézou ochranných proteinů, či biosyntézou jiných unikátních proteinů jako odpověď na stres suchem, nebo daleko rychlejší reakcí na hladinu dostupné vody v půdě. S posledně uvedenou hypotézou korespondují i výsledky z porovnání koncentračních hladin jednotlivých nalezených proteinů.

Při přímém porovnání změněných proteinů mezi stresovanými rostlinami byly hlavní rozdíly pozorovány zejména v rychlosti biosyntézy LEA proteinů za působení sucha, kdy tolerantní odrůda Baletka tyto proteiny syntetizovala rychleji a ve větší míře. Při porovnání koncentrace LEA proteinů v listech a uzlech u obou odrůd je patrno, že Baletka soustředí protektivní proteiny spíše do uzlů, a po zalití nedochází v listech k jejich degradaci na rozdíl od Tobaku, u kterého hladina LEA proteinů po zalití klesá v obou orgánech. Baletka tedy preferuje ochranu uzlů, jakžto regenerativního orgánu, a i po nárazovém zalití udržuje v listech LEA proteiny na potřebné koncentrační úrovni. Tobak oproti tomu nemá orgánově specifickou reakci na stres, a distribuuje protektivní proteiny po celé rostlině rovnoměrně.

Doplněním této proteomické komparativní analýzy o poznatky z analýzy metabolomu je zřejmé, že za tolerancí pšenice k suchu nestojí pouze tvorba klasických osmoprotektantů jako je prolin, ale i jiných aminokyselin a cukerných alkoholů, popř. zvýšení antioxidantů, ale zejména včasná úprava energetického metabolismu směrem k větší produkci ATP, a jiných metabolických drah, jejichž role v rostlinné toleranci k suchu bude předmětem dalších vědeckých experimentů.

Závěr

Tato studie, zahrnující analýzy jak fyziologických parametrů, tak proteomické porovnání hladin proteinů změněných za sucha ve dvou rostlinných tkání a doplňující celkový pohled analýzou metabolitů, ukázala, že tolerantní odrůda Baletka reaguje na stres suchem rychleji a taktéž její reakce je daleko specifičtější oproti reakci senzitivního Tobaku.

Pokud byly tyto odrůdy posuzovány podle hodnot RWC a osmolality, nebyly rozdíly mezi nimi výrazné, neboť odě odrůdy v době sucha vykazovaly velmi podobné hodnoty. Díky proteomické analýze pomocí 2D-DIGE byly ovšem u tolerantní Baletky nalezeny jednak více exprimované ochranné proteiny ze skupiny LEA, a to zejména v odnožovacích uzlech, důležitých regenerativních orgánů rostlin. Metabolomická analýza rovněž ukazuje na rychlejší uzpůsobení zejména energetického metabolismu Baletky na sucho.

Všechny tyto změny signalizují celkové uzpůsobení metabolismu Baletky na sucho, jež zahrnuje např. reorganizaci buněčných struktur, přítomnost citlivějších markerů sucha či již výše zmíněnou větší ochranu regenerativních orgánů – odnožovacích uzlů. Dostáváme tak komplexnější a detailnější pohled na reakci pšenice k suchu a možnost snáze odlišit různě odolné odrůdy.

Z hlediska využití ve šlechtění vidíme především možnost nalezení více proteinů, které mohou sloužit jako markery tolerance, zejména ze skupiny LEA proteinů. Jak ovšem tato studie ukázala, je třeba se zaměřit i na detailnější analýzu orgánové odpovědi na sucho, např. provádět šlechtitelské screeny nejenom genomu, ale také transktiptomu či proteomu odnožovacích uzlů, neboť toleratní odrůda soustředila protektivní proteiny v průběhu sucha právě do těchto orgánů. Stejně tak je nedostatečné pozorovat pouze hladinu prolinu jako hlavního osmoprotektantu, ale je nutné rozšířit tato stanovení o další aminokyseliny a antioxidanty, zejména quinonu a askorbátu.

Dedikace

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT, project č. 16_02110008503 - 01, MZE č. RO08 a QK1710302.

Použitá literatura

Demirevska, K. a další, 2008. Drought-induced leaf protein alterations in sensitive and tolerant wheat varieties. *Gen. Appl. Plant Physiology*, Issue 34 (1-2), pp. 79-102.

Ford, K. L., Cassin, A. & Bacic, A., 2011. Qunatitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, Issue 2:44, p. 11.

Hara, M., 2010. The multifunctionality of dehydrins: An overview. *Plant Signaling and Behavior*, Issue 5, pp. 503-508.

Cheng, L. a další, 2016. Comparative proteomics illustrates the complexity of drought resistance mechanisms in two wheat (Triticum aestivum L.) cultivars under dehydration and rehydration. *BMC Plant Biology*, Issue 16:188, p. 23.

Chmielewska, K. a další, 2016. Analysis od drought-induced proteomic and metabolomic changes in barley (Hordeum vulgare L.) leaves and roots unravels some aspects of biochemical mechanisms involved id drought tolerance. *Frontiers in Plant Science*, Issue 7:1108, p. 14.

Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, T. I. & Renaut, J., 2011. Plant proteome changes under abiotic stress - Contribution of proteomics studies to inderstanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, Issue 74, pp. 1301-1322.

Lisec, J. a další, 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, 1(1), pp. 387-396.

Vítámvás, P. a další, 2015. Quantitative analysis of proteome extracted from barley crowns under different drought conditions. *Frontiers in Plant Science*, Issue 6:479.

Wang, N. a další, 2015. Comparative proteomic analysis of drought tolerance in the two contrasting Tibetan wild genotypes and cultivated genotype. *BMC Genomics*, Issue 16:432, p. 19.

Wise, M. J. & Tunnacliffe, A., 2004. POPP the question: what do LEA proteins do?. *TRENDS in Plant Science*, Issue 9, pp. 13-17.

Kontaktní adresa 1. autora:
Bláhová Tereza, Ing., Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i., Laboratoř biologie stresu a biotechnologie ve šlechtění, Drnovská 507, 161 06 Praha 6 – Ruzyně, Česká republika, blahova@vurv.cz