

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP) »KONKURENČNOST SLOVENIJE 2006 – 2013«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Naziv težišča v okviru CRP:

Povezovanje ukrepov za doseganje trajnostnega razvoja

2. Šifra projekta:

V4-0476

3. Naslov projekta:

RAZVOJ METODE ZA ANALIZO ODPORNOSTI KMETIJSKIH RASTLIN NA SUŠNI STRES KOT ORODJA V PROCESU ŽLAHTNENJA

3. Naslov projekta

3.1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

RAZVOJ METODE ZA ANALIZO ODPORNOSTI KMETIJSKIH RASTLIN NA SUŠNI STRES KOT ORODJA V PROCESU ŽLAHTNENJA

3.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ANALYSIS OF AGRICULTURAL PLANTS TO DROUGHT STRESS AS A TOOL IN A BREEDING PROCESS

4. Ključne besede projekta

4.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

hmelj, fižol, podnebne spremembe, suša, analiza dednine, selekcijske metode, žlahtnjenje

4.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

hop, bean, climatic changes, drought, germplasm analysis, selection methods, breeding

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

Kmetijski inštitut Slovenije
Inštitut za fizikalno biologijo d.o.o.

6. Sofinancer/sofinancerji:

ARRS
MKGP

7. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

18828

Andreja Čerenak

Datum: 28.10.2010

Podpis vodje projekta:

dr. Andreja Čerenak

Podpis in žig izvajalca:

Martina Zupančič,
univ.dipl.ing.agr.

II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi?

- a) v celoti
 b) delno
 c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

V projektu smo si zadali 3 osnovne cilje in sicer:

1. Pri hmelju in fižolu proučiti najbolj primerno izpeljavo lončnega poskusa, s katerim se lahko objektivno spremlja vpliv sušnih razmer na rastline tolerantnih in občutljivih sort, upoštevajoč pravilno izbiro vseh abiotskih parametrov za vzorčenja za molekulske analize (substrat).
2. Prvič vpeljati več fizioloških merjenj rastlin, ki bodo omogočale razvoj selekcijske metode, povezane s tolerantnostjo na sušo tako pri enoletnih rastlinah (na primeru navadnega fižola) in trajnici (primer hmelja).
3. Z molekulskimi analizami listov in korenin določiti sekvence, povezane z občutljivostjo/tolerantnostjo na sušo in poskušati določiti gene, povezane z izražanjem suše pri rastlinah fižola in hmelja.

Vse zastavljene cilje smo uspešno izpolnili.

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

- a) da
 b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela¹:

Poročilo o realizaciji programa dela je opisano v Prilogi 1.

¹ Potrebno je napisati vsebinsko raziskovalno poročilo, kjer mora biti na kratko predstavljen program dela z raziskovalno hipotezo in metodološko-teoretičen opis raziskovanja pri njenem preverjanju ali zavračanju vključno s pridobljenimi rezultati projekta.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen² rezultatov vašega raziskovalnega projekta za:

- a) odkritje novih znanstvenih spoznanj;
- b) izpopolnitev oziroma razširitev metodološkega instrumentarija;
- c) razvoj svojega temeljnega raziskovanja;
- d) razvoj drugih temeljnih znanosti;
- e) razvoj novih tehnologij in drugih razvojnih raziskav.

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji (po metodologiji OECD-ja) sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- a) razvoj kmetijstva, gozdarstva in ribolova - Vključuje RR, ki je v osnovi namenjen razvoju in podpori teh dejavnosti;
- b) pospeševanje industrijskega razvoja - vključuje RR, ki v osnovi podpira razvoj industrije, vključno s proizvodnjo, gradbeništvom, prodajo na debelo in drobno, restavracijami in hoteli, bančništvom, zavarovalnicami in drugimi gospodarskimi dejavnostmi;
- c) proizvodnja in racionalna izraba energije - vključuje RR-dejavnosti, ki so v funkciji dobave, proizvodnje, hranjenja in distribucije vseh oblik energije. V to skupino je treba vključiti tudi RR vodnih virov in nuklearne energije;
- d) razvoj infrastrukture - Ta skupina vključuje dve podskupini:
 - transport in telekomunikacije - Vključen je RR, ki je usmerjen v izboljšavo in povečanje varnosti prometnih sistemov, vključno z varnostjo v prometu;
 - prostorsko planiranje mest in podeželja - Vključen je RR, ki se nanaša na skupno načrtovanje mest in podeželja, boljše pogoje bivanja in izboljšave v okolju;
- e) nadzor in skrb za okolje - Vključuje RR, ki je usmerjen v ohranjanje fizičnega okolja. Zajema onesnaževanje zraka, voda, zemlje in spodnjih slojev, onesnaženje zaradi hrupa, odlaganja trdnih odpadkov in sevanja. Razdeljen je v dve skupini:
- f) zdravstveno varstvo (z izjemo onesnaževanja) - Vključuje RR - programe, ki so usmerjeni v varstvo in izboljšanje človekovega zdravja;
- g) družbeni razvoj in storitve - Vključuje RR, ki se nanaša na družbene in kulturne probleme;
- h) splošni napredek znanja - Ta skupina zajema RR, ki prispeva k splošnemu napredku znanja in ga ne moremo pripisati določenim ciljem;
- i) obramba - Vključuje RR, ki se v osnovi izvaja v vojaške namene, ne glede na njegovo vsebino, ali na možnost posredne civilne uporabe. Vključuje tudi varstvo (obrambo) pred naravnimi nesrečami.

² Označite lahko več odgovorov.

3.3. Kateri so **neposredni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Predlagani projekt je s sodobnimi fiziološkimi in genetskimi pristopi podprl klasične žlahtniteljske metode. Rezultati projekta so neposredno uporabni v žlahtnjenju hmelja in fižola, saj smo analizirali najpomembnejše slovenske sorte obeh rastlin, ki bodo kot starševske komponente z znano tolerantnostjo na sušo vstopale v program vzgoje novih sort. Izpostavljena metodika - uporaba TRAP testa je prva uporabljena metoda za določanje tolerantnosti na sušni stres pri nas in bo lahko aplicirana tudi na druge kmetijske rastline. Rezultati projekta bodo omogočali večjo konkurenčnost slovenskega hmeljarstva in pridelave fižola v Sloveniji, z optimizacijo metode pa so rezultati uporabni tudi pri izboru sort drugih kmetijskih rastlin - vse to bo doprineslo k svetovanju pri izboru sorte strukture v slov. kmetijstvu. Fiziološke in molekulske analize so pri hmečlju prve v svetu, dopolnjujejo pa tudi raziskave na fižolu. Pričakovani rezultati prispevajo k uresničevanju ciljev razpisa CRP KS.

3.4. Kakšni so lahko **dolgoročni rezultati** vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Rezultati projekta so dolgoročno zasnovani, saj bodo omogočili raziskovalcem v Sloveniji in izven (z objavo SCI člankov) uporabo selekcijskih metod, povezanih s tolerantnostjo na sušo. Dolgoročno bodo rezultati pridelovalcem na rizičnih območjih Slovenije omogočali saditi sorte, tolerantnejše na sušo in hkrati vzgojene v naših rastnih razmerah, ter s tem bodo s tem dvignili svojo konkurenčnost. Rezultati imajo tudi širši učinek, saj niso uporabni samo v hmeljarstvu in pridelavi fižola, ampak tudi v ostalih panogah poljedelstva in vrtnarstva, kjer z zadnjem času prihaja do nastanka večjih škod zaradi klimatskih sprememb. Sofinancerji bodo pridelovalcem lahko svetovali, katere sorte so primerne za saditev v spremenljivih podnebnih razmerah.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- a) v domačih znanstvenih krogih;
- b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- c) pri domačih uporabnikih;
- d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Interes po rezultatih se izraža pri domačih pridelovalcih kmetijskih rastlin, zlasti hmeljarjih in pridelovalcih fižola, v strokovnih krogih in semenarskih hišah ter tujih znanstvenih inštitucijah (Bayer, Landesanstalt fuer Landwirtschaft, Institut fuer Pflanzenbau und Pflanzenzuechtung, Arbeitsbereich Hopfen, Hüll, Freising, Deutschland; Wye Hops Ltd., England).

3.7. Število diplomantov, magistrrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

Ena mlada raziskovalka je bila vključena v raziskovalni projekt.

4. Sodelovanje z tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi inštitucijami.

Sodelovanja:

- Horticulture Research International, Department of Hop Research, Wye College, Wye Ashford, Kent, England
- Hop Research Institute co., Žatec, Czech Republic
- Bayer. Landesanstalt fuer Landwirtschaft, Institut fuer Pflanzenbau und Pflanzenzuechtung, Arbeitsbereich Hopfen, Hüll, Freising, Deutschland
- Oregon State University, Botany and Plant Pathology, Corvallis, Oregon, USA
- Institute of Soil Science and Plant Cultivation, Pulawy, Poland
- Tasmania Institute of Agricultural Research, University of Tasmania, Australia

4.2. Kakšni so rezultati tovrstnega sodelovanja?

Rezultati tovrstnega sodelovanja temeljijo na izmenjavi materiala in izkušnj s kolegi iz tujine, predvsem na področju hmeljarskih in agronomskih tem ter povezovanju za nadaljnje prijave na EU projekte.

5. Bibliografski rezultati³ :

Za vodjo projekta in ostale raziskovalce v projektni skupini priložite bibliografske izpise za obdobje zadnjih treh let iz COBISS-a) oz. za medicinske vede iz Inštituta za biomedicinsko informatiko. Na bibliografskih izpisih označite tista dela, ki so nastala v okviru pričujočega projekta.

³ Bibliografijo raziskovalcev si lahko natisnete sami iz spletne strani:<http://www.izum.si/>

6. Druge reference⁴ vodje projekta in ostalih raziskovalcev, ki izhajajo iz raziskovalnega projekta:

Delni rezultati projekta so bili predstavljeni zainteresirani javnosti na združenem kongresu Slovenskega biokemičnega in genetskega društva z mednarodno udeležbo (Otočec, September 20-23, 2009), na 47. seminarju o hmeljarstvu z mednarodno udeležbo, ki se je odvijal 4. in 5. 2. 2010 v Portorožu. Rezultati so bili predstavljeni tudi na tehnološkem sestanku hmeljarjev, ki je bil 11. 8. 2010 na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije. Rezultati projekta so bili predstavljeni tudi na 5. Slovenskem simpoziju rastlinske biologije v Ljubljani, sept. 2010.

⁴ Navedite tudi druge raziskovalne rezultate iz obdobja financiranja vašega projekta, ki niso zajeti v bibliografske izpise, zlasti pa tiste, ki se nanašajo na prenos znanja in tehnologije.

Navedite tudi podatke o vseh javnih in drugih predstavitev projekta in njegovih rezultatov vključno s predstavitvami, ki so bile organizirane izključno za naročnika/naročnike projekta.

PRILOGA 1: Vsebinsko raziskovalno poročilo – program dela z raziskovalno hipotezo, metodološko teoretičen opis raziskovanja, vključno z rezultati:

1 UVOD

Zaradi spremenjenih klimatskih razmer so napovedane omejene zaloge virov namakanja, zato je nujna vzgoja sort kmetijskih rastlin, odpornih na sušo. Ponavljajoča se sušna leta izrazito vplivajo na rast in razvoj kmetijskih rastlin, kar se seveda odraža v ekstremno nizki količini in kvaliteti pridelka, modelne študije pa nakazujejo še slabšo razporejenost padavin in višje temperature v prihodnjih letih (Kajfež-Bogataj s sod., 2003). V zadnjih 25 letih se v poprečju vsako tretje leto pojavi ekstremno sušno leto (Matičič s sod., 2000). Pri hmelju (*Humulus lupulus* L.), ki se prideluje v trajnih nasadih, se posledice sušnih let odražajo še v naslednjih letih, kar pomeni večletna ekonomska tveganja. Relativno veliko vode v času rasti, ki naj bi bila čim bolj enakomerno porazdeljena, potrebuje hmelj zato, ker v kratkem času razvije veliko rastlinske mase. Hmelj raste v RS na približno 1500 ha, hmeljišča so locirana v Savinjski dolini, na Koroškem in na Ptujsko – Ormoškem območju. Zagotavljanje stalne oskrbe s hmeljem ustrezne kakovosti pa po drugi strani pomeni stalen položaj slovenskega hmeljarstva na svetovnem trgu. Razlike med sortami hmelja na odzivnost na sušne razmere so izkustveno znane. O vplivu vremenskih razmer na rast in pridelek Savinjskega goldinga je nekaj objav (Kralj, 1962; Majer, 1997). Ravno tako kaže sorta Aurora, ki pokriva dve tretjini vseh hmeljišč v Sloveniji, izredno dobro plastičnost genotipa ob različnih okoljskih razmerah.

Navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) je v svetovnem merilu najpomembnejša stročnica. Letna pridelava fižola v stroku in zrnju znaša preko 24 milijonov ton, kar presega polovico svetovne pridelave stročnic, namenjene človekovi prehrani (FAOSTAT). Fižol v prehrani človeka predstavlja pomemben vir proteinov, vitaminov in mineralov. Zaradi visoke vsebnosti proteinov, vključno z esencialnimi aminokislinami, predstavljajo stročnice v evropskem prostoru velik potencial kot nadomestek mesu (Broughton in sod., 2003). Slovenija ima dolgoletno tradicijo pridelovanja fižola. Skozi stoletja kontinuirane pridelave so se v Sloveniji razvile številne avtohtone populacije in sorte fižola, prilagojene lokalnim razmeram (Šuštar-Vozlič in sod., 2000). Čeprav so se površine, namenjene pridelavi fižola, v preteklih desetletjih precej zmanjšale, lahko na marsikateri slovenski kmetiji še vedno najdemo stare domače tradicionalne genske vire.

Suša pomeni za rastlino stres, ki pomeni zmanjšanje njene odpornosti tudi za napade bolezni in škodljivcev. Odzivnost organizma na stres variira glede na genetsko zasnovo, starost, stopnjo adaptacije in sezonsko oz. dnevno aktivnost organizma (Larcher, 1995). Pri hmelju je bilo v preteklosti v svetu in pri nas že nekaj raziskav o vplivu pomanjkanja vode na rastline hmelja, novejših objav pa ni. Kljub temu, da v številnih državah žlahtniteljicah hmelja potekajo intenzivni programi vzgoje novih sort pa še ni razvite metode za določanje tolerantnosti hmelja na sušne razmere.

Navadni fižol sodi med vrste, ki slabo prenašajo sušni stres. Posledice delovanja sušnega stresa na fižol se izražajo v odpadanju cvetov in strokov, zmanjšanem številu strokov in semena, masi posameznega semena, žetvenem indeksu in pridelku (do 90%) (Nunez in sod., 2005). Sušni stres ovira preskrbo rastline s fosforjem (Guida dos Santos in sod., 2004), zmanjšuje fiksacijsko posobnost ter vsebnost rastlin z dušikom (Serraj in Sinclair, 1998). V sušnih razmerah se koreninski sistem fižola krči, s čimer se zmanjša stična površina med koreninami in talnimi delci (North in Nobel, 1997). Izsledki raziskav odpornosti skupine genotipov navadnega fižola, opravljenih v več državah v 80-ih letih prejšnjega stoletja (White, 1987), nakazujejo na pomembno vlogo lokalne prilagojenosti genotipov navadnega fižola pri odpornosti na sušo.

Stopnjo oz. učinek stresa lahko ugotavljamo tako, da merimo specifične stresne simptome ali pa nespecifične, kot so sprememba encimske aktivnosti, akumulacija osmotikov, prisotnost stresnih hormonov, inhibicija dihanja in fotosinteze, zavrta rast rastlin, ... Dodaten problem pa predstavlja dejstvo, da sušni stres v rastlinah privede do postopnega pešanja celičnih antioksidativnih obrambnih sistemov in posledičnega kopičenja reaktivnih kisikovih spojin (ROS), ki so delno reducirane oblike atmosferskega kisika. V tem primeru govorimo, da je rastlina v stanju oksidativnega stresa. O oksidativnem stresu govorimo, ko se v organizmu poruši ravnotežje med ROS in antioksidanti. Kadar organizem ni pod stresom, so antioksidativni obrambni sistemi dovolj učinkoviti, da obdržijo količino ROS na neškodljivi ravni in popravijo celične poškodbe. Kadar pa zaradi vnosa eksogenih snovi nastanejo dodatne ROS, se v celici inducirajo dodatni obrambni sistemi - oksidativni stresni odgovor. Glavne posledice delovanja ROS so oksidacije membranskih lipidov, proteinov, nukleinskih kislin in spremenjeno redoks stanje v celici. V organizmu pride zaradi radikalov do poškodb tkiva in prezgodnje senescence (Mittler, 2002).

Sušni stres lahko učinkovito ocenimo tako, da merimo oksidativne stresne simptome, kot so spremembe aktivnosti antioksidativnih encimov, zavrta rast rastlin, redoks stanje in koncentracija glutationa, inhibicija fotosinteze (Razinger in sod., 2007a), lahko pa tudi z nespecifičnimi metodami, s katerimi zajamemo več prej omenjenih parametrov in tako dobimo celostno sliko o fiziološkemu stanju rastlin (Razinger in sod., 2007b). Primer take nespecifične metode je TRAP test (TRAP – total radical-trapping potential). Namen TRAP testa je ocena odpornosti sistema na oksidativni stres, oziroma določanje celokupne antioksidativne aktivnosti preiskovanega vzorca. Test temelji na znižanju kemiluminiscence, kar je povezano s koncentracijo in antioksidativno aktivnostjo vzorca (Baker in Mock, 2004). Test je odziven in relevanten, saj sušni stres privede do oksidativnega stresa.

Za ugotavljanje stresne situacije v rastlini se uporabljajo tudi metode merjenja intenzivnosti absorpcije svetlobe (Steven s sod., 1990). Kot uporabne metode za merjenje stresa se uporabljajo spektralne metode, kjer se meri odzivnost rastlin na različne strese in metoda merjenja fluorescence klorofila v stresnih situacijah (Lichenthaler, 1990). S tehniko PAM (pulse amplitude modulated) fluorometrije lahko določamo različne fotosintetske parametre: učinkovitost fotosistema II, hitrost elektronskega transporta, fotokemično dušenje in nefotokemično dušenje (Öquist in Wass, 1988).

Zaznavanje stresa rastlin opravljamo tudi z reflektometrijo, saj je različen odboj posameznih valovnih dolžin svetlobe pri rastlinah poznan že vrsto let. Povišana reflektivnost v rdečem delu spektra pomeni manjšo fotosintetsko aktivnost, znižana reflektivnost v bližnjem IR pa vodni stres (Gitelson in sod., 2003). Vegetacijski indeksi so spektralne transformacije dveh ali več pasovnih širin spektra odbite svetlobe s površine vegetacije (Deering, 1987). Omogočajo nam monitoring sezonskih, letnih in večletnih fizioloških, strukturnih, fenoloških in biofizikalnih parametrov vegetacije.

Vzorec ukoreninjenja, še posebej dolžina korenin, je pomemben dejavnik, ki vpliva na dovzetnost na vodni stres (Sponchiado in sod., 1989). Z razvojem novih orodij molekulske biologije so se pojavili tudi pristopi, ki omogočajo proučevanje odzivnosti rastlin na stres na ravni celice. Ena takih naprednih metod je diferencialni prikaz (differential display). Metoda omogoča identifikacijo genskih sekvenc, odgovornih za specifično reakcijo rastlin na sušni stres. Merjenje ravni izražanja teh istih genskih sekvenc pa omogoča metoda kvantitativnega PCR v realnem času. Z metodo diferencialnega prikaza želimo v predlaganem projektu opredeliti spremembe v transkriptomu koreninskega sistema fižola in hmelja.

Poznavanje morfoloških (listi, koreninski sistem), biokemičnih (genska regulacija) in fizioloških mehanizmov odpornosti oziroma občutljivosti rastlin na sušni stres odpira nove možnosti za prilagajanje genfonda rastlin spremenjenim okoljskim razmeram. Zaradi širše

možnosti uporabnosti vpeljane metode je bil poskus postavljen pri trajnici (hmelj) in enoletni metuljnici (fižol).

Iz omenjenega so bili glavni cilji projekta:

- 1) določiti vpliv sušnih razmer na pojavljanje stresa pri dveh gospodarsko pomembnih rastlinah (hmelj, fižol),
- 2) s spremljanjem fizioloških in morfoloških parametrov pri različnih sortah določiti genski potencial obstoječih sort na sušni stres,
- 3) razviti metodo določanja tolerantnosti kmetijskih rastlin na sušni stres uporabno tudi v drugih žlahtniteljskih programih,
- 4) poskušati določiti gene, povezane z odpornostjo na sušo v listih in koreninah hmelja in fižola.

2 METODE DELA

2.1 Lončni poskus

V poskus smo vključili sorti hmelja, ki se razlikujeta glede na tolerantnost na sušo v pridelavi hmelja (po izkušnjah), in sicer Auroro kot bolj tolerantno in Savinjski golding kot manj tolerantno oz. občutljivo na sušo.

Med sortami fižola smo izbrali Starozagorski čern kot občutljivo na sušo in Tiber ter Bat, sorti odporni na sušo.

Rastline hmelja so bile enoletne rastline, vzgojene vegetativno in posajene v 4l loncih; rastline fižola so bile vzgojene iz semena in posajene ravno tako v 4l loncih. V vsakem obravnavanju smo imeli 20 rastlin.

Obravnavanja:

1. Aurora – sušne razmere
2. Aurora – kontrola
3. Savinjski golding – sušne razmere
4. Savinjski golding – kontrola
5. Starozagorski čern – sušne razmere
6. Starozagorski čern – kontrola
7. Tiber - sušne razmere
8. Tiber – kontrola

Poskus v rastni komori:

Substrat (Gramoflor, Nemčija) je vseboval vsa potrebna hranila, za obdobje trajanja poskusa rastlin nismo dodatno dognojevali. Posebej pozorni smo bili na zagotavljanje enake volumnske gostote substrata pri vseh rastlinah, s čimer smo zmanjšali napako pri določanju vlage ter natančno spremljanje vlage v različnih obravnavanjih.

V prvem letu izvajanja lončnega poskusa so bile rastline izpostavljene kontroliranim ravnim pogojem v rastni komori pod sledečimi pogoji:

- Kontrola: Normalna osvetlitev (15000 lux); relativna zračna vlaga 70 %; dolžina dneva 15 ur; temperatura: dnevna: 26°C, nočna: 20°C.; rastline bodo zalivane do ocenjene 70 % poljske kapacitete
- Sušne razmere: Normalna osvetlitev (15000 lux); relativna zračna vlaga 70% ob začetku poskusa in 55% v sušnem obdobju; dolžina dneva 15 ur; temperatura dnevna: 26°C, nočna: 20°C.; rastline so bile zalivane do ocenjene 70 % poljske kapacitete – izpostavitve sušnim razmeram – vzdrževanje 35 % poljske kapacitete

Rastline smo optimalno preskrbeli z vodo na podlagi meritev s tenziometri in tehtanjem loncev. Vlago v substratu smo pri vsakem obravnavanju spremljali s pomočjo tenziometra in kontrolirali gravimetrično ob vsakem vzorčenju poskusa. Vlago smo spremljali tudi večkrat tedensko s tehtanjem loncev posameznih obravnavanj, s čimer smo lahko ugotovili porabo vode in s tem določili potrebno količino vode za zalivanje. Na ta način smo zagotavljali optimalno preskrbljenost rastlin z vodo.

Po izpostavitvi sušnim razmeram smo rastline ponovno začeli zalivati z manjšimi odmerki v krajših presledkih in spremljali različno sposobnost regeneracije sort. Pri rastlinah fižola oz. hmelja smo začeli s ponovnim zalivanjem rastlin glede na to kako so se rastline odzivale na sušo – torej pred propadom rastlin smo pričeli s ponovnim dodajanjem vode.

V drugem letu smo poskus postavili v rastlinjaku, da smo se izognili ventilaciji v rastni komori, ki je zelo neenakomerno izsuševala rastline v poskusu. Obravnavanja in število vključenih rastlin v poskus je bilo enako kot pri izvedbi poskusa v rastni komori, s tem da smo dodali še novo sorto fižola Bat, z izkazano tolerantnostjo na sušo (Miklas in sod., 2006).

Dodatni obravnavanji:
 9. Bat – sušne razmere
 10. Bat – kontrola

Zagotavljali smo 20-25°C dnevne temperature in nočne 15-18°C ter dodatno osvetljevanje od 6.00 do 20.00. Uporabili smo substrat vermikulit : pesek v razmerju 1:1. Rastline smo enkrat tedensko dognojevali s tekočim gnojilom Flora Gro, FloraMicro in FloraBloom v sledečih količinah:

Preglednica 1: Gnojenje lončnega poskusa v rastlinjaku (v ml/10l raztopine).

| <i>teden</i> | <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> | <i>6 in več</i> |
|-------------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|
| Flora Gro | 2,5 | 2,5 | 7 | 15 | 15 | 5 |
| FloraMicro | 2,5 | 2,5 | 7 | 10 | 10 | 10 |
| FloraBloom | 2,5 | 2,5 | 7 | 5 | 5 | 15 |

Zaradi slabe kalitve semen fižola smo poskus ponovno ponovili v februarju in nato še aprila, ko smo uporabili komercialno uporabljen substrat.

Rastline hmelja smo vzorčili v 3 terminih po izpostavitvi sušnih razmer, in sicer 13. ter 21. dan, nakar smo ponovno začeli z zalivanjem sušnih rastlin – spremljanje sposobnosti regeneracije rastlin.

Pri fižolu smo rastline vzorčili v 4. terminih: 7., 12., 17. dan trajanja suše, nakar smo vse sušne rastline začeli ponovno zalivati (regeneracija). Zadnje vzorčenje je bilo izvedeno 20. dan poskusa.

2.2 Merjenje fotosintetske učinkovitosti

Meritve fluorescence klorofila so standardna metoda za določanje fiziološkega stanja fotosintetskega aparata rastlin. Meritve smo izvajali s PAM fluorometrom OptiSciences 7 in iz meritev določili sledeče parametre:

- Fv/Fm: maksimalni kvantni izkoristek fotosistema II (PSII). Zmanjšanje Fv/Fm je posledica poškodb reakcijskega centra PSII
- Qp: fotokemično dušenje predstavlja učinkovitost konverzije svetlobne energije pri fotosintezi

- Qn: nefotokemično dušenje je mera za stres v fotosintetskem aparatu rastline

Meritev fluorescence je potekala po sledečem protokolu:

- 10 minut temne adaptacije s posebno sponko
- Meritev F0 in Fm. $Fv/Fm=(Fm-F0)/Fm$
- Meritev fluorescenčne kinetike pod aktinično osvetlitvijo: 3 min
- Določitev Parametrov Qp in Qn

Meritve smo opravili na 3. paru listov pri fižolu in 5. paru pri hmelju. Iz meritev na 5 rastlinah iz istega tretmaja smo izračunali povprečje in standardno deviacijo.

2.3 Merjenje vodnega potenciala z NDVI (normalized difference vegetation index) in WC (water content)

Ob vzpostavitvi sušnim razmeram smo pri obravnavanjih določali reflektometrični indeks NDVI v listih. Sušni stres se izkazuje kot postopno zmanjševanje bližnje infrardeče reflektivnosti NIR (0.7-1.1 μm) v razmerju z reflektivnostjo v rdečem delu spektra R (0.6-0.7 μm).

$$NDVI = \frac{NIR - R}{NIR + R}$$

Meritve reflektivnosti smo izvajali točkovno na 3. paru listov pri fižolu in 5. paru pri hmelju. Za meritve reflektivnosti smo uporabili halogensko svetilko, reflektometrično sondo in prenosni VIS-NIR spektrofotometer OceanOptics USB2000. Iz reflektančnih spektrov smo izračunali vrednosti vegetacijskega indeksa NDVI.

Delež vode v listih (WC) smo določili na osnovi enačbe: $WC = [(FW - DW) / FW] \times 100\%$, kjer FW predstavlja maso svežega lista, DW pa maso suhega lista. Maso svežega lista smo izmerili ob točki vzorčenja pri vseh obravnavanjih. Svež list smo nato polžili v petrijevko z namočenim filter papirjem, listni pecelj obložili z navlaženo vato, pokrili petrijevko in inkubirali 24 ur pri sobni temperaturi in svetlobi. Lističe smo stekali (TW - Turgid weight) in jih prenesli v grelno komoro ter inkubirali 24-72 ur pri 70°C ter nato izmerili maso osušenih listov.

2.4 Merjenje morfoloških parametrov rastlin - št. nodijev, št. listov, dolžina rastline, dolžina koreninskega sistema, teža koreninskega sistema

Delu rastlin vsakega obravnavanja smo pred izpostavitvi sušnim razmeram izmerili dolžino stebela, št. nodijev, št. listov, ter ob vzorčenjih določili še dolžino in težo koreninskega sistema.

2.5 Določanje celokupne antioksidativne aktivnosti - TRAP test

Test temelji na kemiluminiscenčnem signalu, jakost oz. stopnjo antioksidativne aktivnosti preiskovanega vzorca smo določili iz dušenja kemiluminiscenčnega signala, ki je posledica lovljenja luminol radikalov in vodikovega peroksida. Pri vsaki točki meritve smo odvzeli po 3 vzorce na 5. listu od rastnega vršička navzdol. Vzorček smo stekali, v terilnico dodali kalij-fosfatni pufer in strli 100 mg rastlinskega tkiva s pomočjo kovinskih kroglic ter naprave Smart Helix Cell Deintegrator (IFB d.o.o., Slovenia). Epice s homogenizatom smo centrifugirali in supernatant dali v ultra-zamrzovalnik na -80°C do meritev TRAP vrednosti.

Kemiluminiscenco smo merili na Luminoskan Ascent luminometru (Thermo Electron Corp) (Razinger in sod., 2008).

2.6 Določanje ekspresije genov v koreninah in listih hmelja in fižola z metodo diferencialnega prikaza

V raziskave smo vključili dva kultivarja hmelja, Auroro in Savinjski golding ter dva kultivarja fižola, Starizagorski in Tiber. Ob pojavu simptomov venačenja pri rastlinah, podvrženih sušnemu stresu, smo iz obeh obravnavanj (kontrola, suša) odvzeli dele listnega in koreninskega tkiva. Za pripravo izolacije nukleinskih kislin smo praviloma vzorčili peti list (šteto od spodaj navzgor) (za hmelj) oziroma tretji list (za fižol), prav tako smo vzorčili tudi korenine. Liste in korenine smo takoj po vzorčenju potopili v tekoči dušik in jih do izolacije shranili na -70°.

Izolacija RNA

Za izolacijo RNA smo preizkušali zelo veliko metod in komercialnih kitov. Pomemben del so predstavljali poskusi odstranjevanja DNA iz vzorcev RNA. Primerjalne meritve smo izvajali na nanodropu, Qubit-u in Agilent bionalizatorju. Največ in najboljšo RNA iz rastlinskega tkiva smo pridobili s SIGMA Spectrum Plant Total RNA Kitom.

Postopek izolacije RNA, ki smo ga nato uporabili pri vseh vzorcih hmelja, je potekal po naslednjem protokolu: rastlinsko tkivo smo strli v terilnici na suhem ledu ob dodatku tekočega dušika. 100 mg tkiva smo prenesli v 2 ml mikrocentrifugirko, ki je bila ohlajena na suhem ledu. Dodali smo 500 µl Lysis razstopine, ki je vsebovala 2-merkaptetanol ter vzorce stresali najmanj 30 s. Sledila je inkubacija pri 56 °C za 5 min. Po centrifugiranju pri maksimalni hitrosti 3 min smo supernatant prenesli v kolone po navodilih proizvajalca in postopek večkrat ponovili. Izolirano RNA smo raztopili v 50 µl elucijske raztopine in jo shranili v zamrzovalniku na -80°C.

Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija je potekala po naslednjem postopku:

V mikrocentrifugirki smo zmešali začetne oligonukleotide (500 ng/µl), dNTP (vsak 10 mM), 1 µg do 5 µg RNA in vodo do skupnega volumna 13 µl. Sledila je inkubacija na 65 °C, 5 min in nato inkubacija na ledu 1 min. Vsebinsi, ki smo jo zbrali s kratkim centrifugiranjem, smo dodali 5X First-Strand pufer, 0,1 M DTT, reverzno transkriptazo Superscript III RT (200 U/µl) in vodo do skupnega volumna 7 µl. Po inkubaciji 1 h pri 50 °C je sledil reverzni prepis in inaktivacija reakcije z inkubacijo pri 70 °C za 15. Reakcija je potekala v PCR termostatu Perkin Elmer 9700 (Applied Biosystems).

Diferencialni prikaz (DD-RT-PCR)

Nastalo cDNA smo uporabili v reakciji DD-RT-PCR. Pripravili smo PCR mešanico, ki je vsebovala pufer (5X), MgCl (25 mM), začetni oligonukleotid dT + XY (10 µM) in reverzni začetni oligonukleotid (10 µM) dNTP (10 mM each), Taq pol. (5 U/µl) in cDNA v skupnem volumnu 20 µl. Pogoji reakcije so bili naslednji: 95°C 5 min, 40 ciklov: 1 min pri 94°C, 1 min 40 s pri 37,5°C in 2 min pri 72°C ter končna inkubacija 10 min pri 72°C.

Na manjšem številu vzorcev smo preizkušali kombinacije začetnih oligonukleotidov. Začetne nukleotide, pri katerih smo dobili diferencialno izražene fragmente, smo nato uporabili v reakciji na vseh vzorcih.

Čiščenje PCR produktov

PCR produkte, ki smo jih izrezali iz gela, smo očistili z uporabo komercialnega kita Roche High Pure PCR Product Purification Kit po navodilih proizvajalca. Uspešnost izolacije PCR produkta smo preverili z nanosom dela vzorca (3 – 4 µl) na agarozni gel (1,4 %).

Sekvenčna reakcija

Za sekvenčno reakcijo očiščenih PCR fragmentov smo uporabili ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit. PCR mešanica je vsebovala 3,5 µl vode, 1,5 µl sekvenčnega pufra, 1,5 µl reverznega začetnega oligonukleotida iz DD-PCR reakcije (10 uM), 0,5 µl PCR produkta (po čiščenju iz gela) ter 1,5 µl BigDye v skupnem volumnu 17 µl. Pogoji reakcije so bili naslednji: 95°C 10 s, 30 ciklov: 20 s pri 96°C, 10 s pri 38°C in 3 min pri 60°C ter končna inkubacija 1 min pri 60°C.

Precipitacija sekvenčne reakcije je potekala po naslednjem postopku:

Za 1 reakcijo (vzorec) smo pripravili 50 µl 96% etanola + 2 µl Na-acetata, dodali 17 µl oz. celotno sekvenčno reakcijo in inkubirali 15 min pri sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje 20 min pri 20.000 g (oz. max. obratih). Nato smo previdno odpipetirali vodno fazo in dodali 250 µl 75% etanola. Zopet smo centrifugirali 5 min pri 20.000 g (oz. max. obratih). Previdno smo odpipetirali vodno fazo in osušili na zraku. Osušeno DNA smo raztopili v 10 µl formamida, prenesli vsebino v male mikrocentrifugirke (stripe), kratko centrifugirali in denaturirali 2 min pri 92 °C. Vzorce smo shranjene na ledu odnesli na Biotehniško fakulteto na Rodici, kjer je bila narejena sekvenčna reakcija na sekvenatorju ABI3130 pri temperaturi prileganja 37 °C.

Dobljene sekvence smo uredili v programu Chromas. Sekvence hmelja smo prevedli v aminokislinsko (AK) zaporedje in z uporabo BLAST algoritma poiskali podobna AK zaporedja v podatkovni bazi NCBI. Funkcijo genskih sekvenc fižola smo ugotavljali na osnovi primerjave z DNA zaporedji v EST bazi, uporabili smo BLAST algoritem in program blastn.

3. REZULTATI IN DISKUSIJA

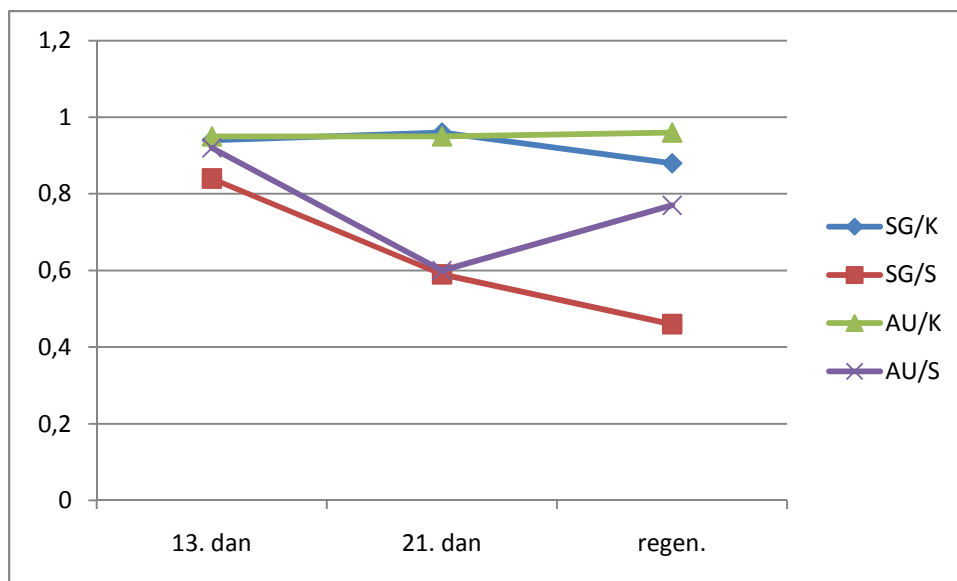
3.1 Izvedba lončnega poskusa

Za določitev poljske kapacitete in točke venenja v substratu smo nameravali izdelati vodno retenzijsko krivuljo, ki bi nam povedala s kakšno silo je voda vezana v substratu. Kljub več ponovitvam to zaradi značilnosti substrata ni bilo možno izvesti (komercialni substrat oz. v naslednjem letu pripravljena mešanica kremenčev pesek : glinopor).

V letu 2009 je potekal poskus v rastni komori, kjer sta bila svetlobni in temperaturni režim za rast rastlin optimalna. Zaradi ohranjanja enakomerne temperature v komori je potrebno prezračevanje komore, ki se ga zaradi delovanja komore ne da izključiti. To nam je povzročilo v letu 2009 precej preglavic, saj je zračenje povzročalo neenakomerno izsuševanje substrata v loncih, kar pa je ključnega pomena pri poskusih, povezanih s sušnimi razmerami. Pri analizah rezultatov smo opazili precejšnje razlike znotraj posameznih obravnavanj kljub temu, da smo z različnimi tehničnimi rešitvami želeli učinek zračenja zmanjšati (zapore ventilatorjev, ...). Glede na to smo poskus v 2010 zastavili v rastlinjaku, z namenom boljšega spiranja korenin za molekulske analize pa smo spremenili tudi substrat. Preliminarno smo v decembru naredili poskus s tremi različnimi substrati - 100 % vermikulit, 100 % pesek in mešanico vermikulit/pesek v razmerju 1:1. Po končanem poskusu smo ugotovili, da se vlaga v substratu precej dolgo obdrži, torej da so glede na vlago vse 3

kombinacije primerne. Za nadaljnji poskus smo izbrali mešanico vermikulit : pesek v razmerju 1:2; z mešanico smo izboljšali zračne razmere v substratu.

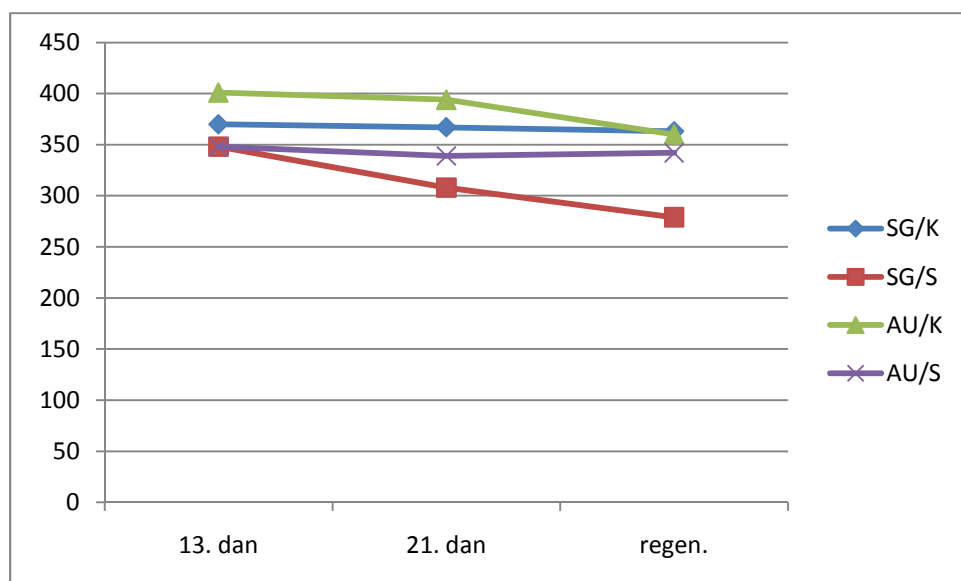
V poskus smo vključili 40 rastlin vsake sorte (hmelj - Savinjski golding (SG) in Aurora (AU); fižol - Tiber in Starozagorski (STZ)). Na začetki poskusa smo izenačili težo vsem loncem, zalivali smo jih s po 50 ml vode. Temperaturo smo uravnali na dnevno 25 °C in nočno 20 °C. Rastline sorte Tiber niso vzkli, zato smo celotni poskus s fižolom ponovili še enkrat v februarju; pri tem smo seme sorte Tiber posadili manj globoko saj smo pri tej sorti skleпали, da je vzrok nekalivosti v pretežkem substratu. Ves čas smo dnevno kontrolirali tudi temperaturo rastlinjaka, v jutranjih in večernih urah (6-9h in od 18-20h) smo rastline še dodatno osvetljevali. Po 4 dneh je približno 50 % rastlin fižola že vzkli. Zaradi ugodnih temperaturnih razmer se je na hmelju pojavil škodljivec hmeljeva pršica (v sledovih), ki smo ga dvakrat zatirali. Pričeli smo tudi z merjenjem višine rastlin in št. nodijev ter števila listov.



Slika 1: Delež vode v listih pri rastlinah hmelja tekom poskusa (SG - Savinjski golding, AU – Aurora; K - kontrola; S - suša)

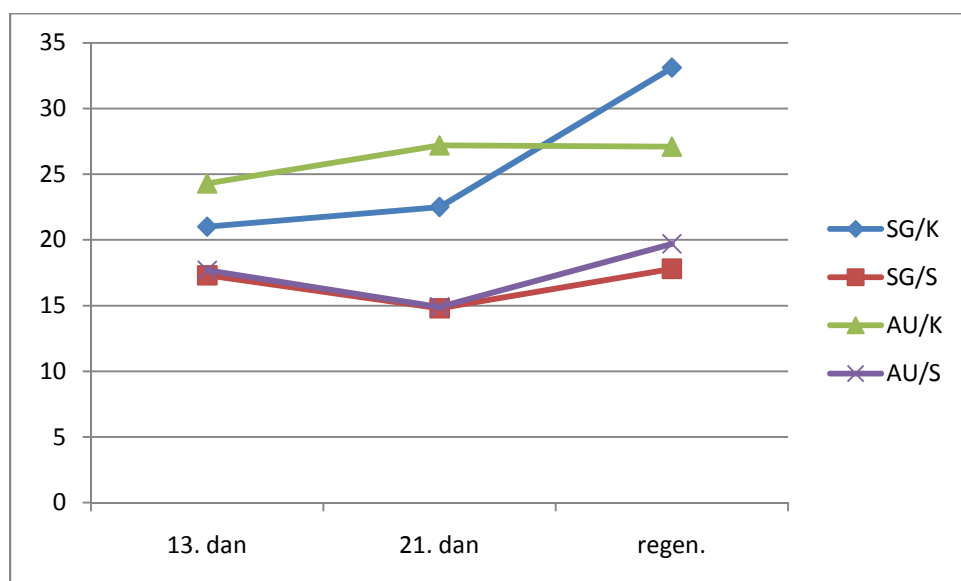
Kot je razvidno iz Slike 1 so bile kontrolne rastline obeh sort optimalno zalite, nihanja v vrednostih RWC praktično ni bilo zaznati. Razlika je očitna med obema sortama pri obravnavanju 'suša', kjer v času trajanja suše RWC pada pri obeh sortah enako.

Sklep: Očitna razlika je pri regeneraciji rastlin, kjer se vrednost pri Aurori izrazito poveča, medtem ko pri Savinjskem goldingu še vedno pada. Sklepamo, da Aurora po končanem izpostavljanju suši lažje vzpostavi normalne vodne razmere v listih.



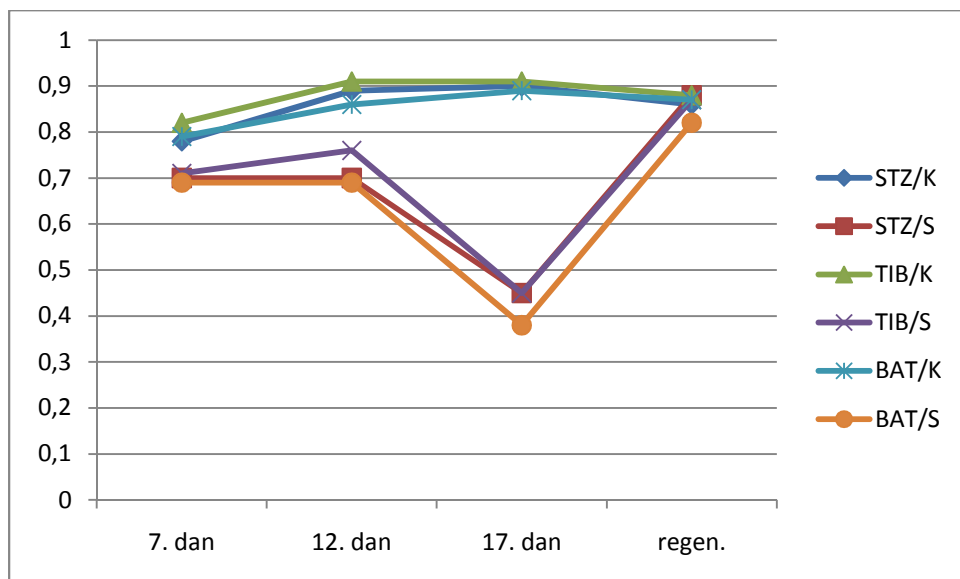
Slika 2: Dolžina koreninskega sistema pri rastlinah hmelja tekom poskusa (SG- Savinjski golding, AU – Aurora; K- kontrola; S- suša)

Rezultati meritev koreninskega sistema ravno tako potrjujejo rezultate, dobljene z meritvami RWC, da od vseh obravnavanj najbolj odstopajo rastline Savinjskega goldinga, izpostavljene suši – pri teh se je dolžina koreninskega sistema ves čas trajanja poskusa zmanjševala.



Slika 3: Teža koreninskega sistema pri rastlinah hmelja tekom poskusa (SG- Savinjski golding, AU – Aurora; K- kontrola; S- suša)

Kot je za pričakovati, se teža korenin vseh rastlin ob izpostavitvi suši zmanjšuje, medtem ko se po ponovnem zalivanju pri rastlinah teža korenin dvigne kot posledica dviga vlage v tkivu. Rastline SG – kontrola imajo po regeneraciji precej višje vrednosti, kar je verjetno posledica močnejših rastlin, določenih za to vzorčenje in ne posledica rasti razmer.

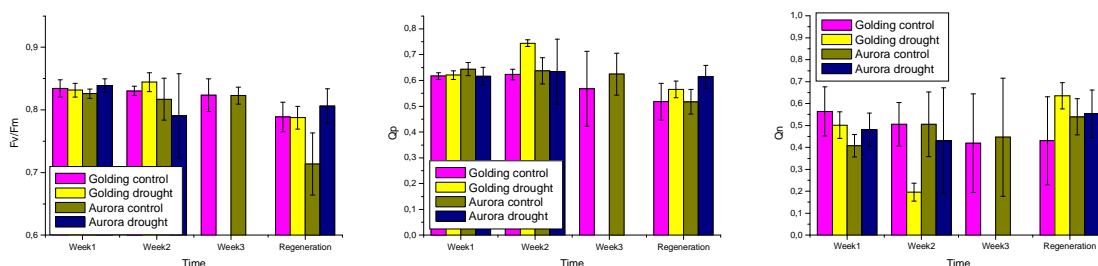


Slika 4: Delež vode v listih pri rastlinah fižola tekem poskusa (STZ- Starozagorski črn, TIB – Tiber; K- kontrola; S- suša)

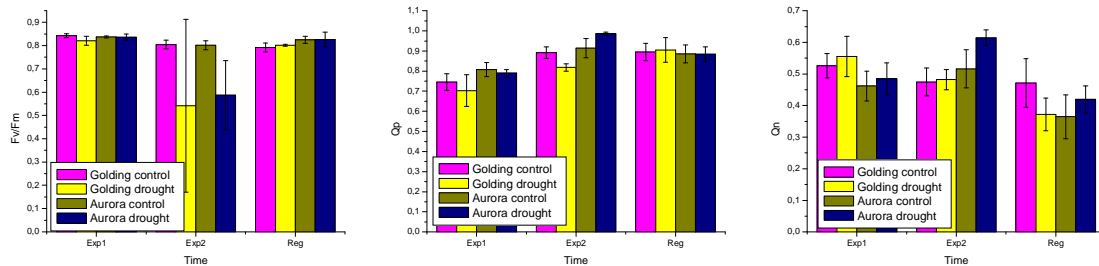
Tudi pri rastlinah fižola RWC vrednost pri izpostavitvi sušnim razmeram upada, zelo izrazito med 12. in 17. dnevom poskusa, ne glede na sorto. V času regeneracije se le-ta dvigne enako pri vseh sortah – torej med sortami fižola nismo opazili večjih razlik, povezanih z vrednostjo RWC.

3.2 Meritve fotosintetskih parametrov

3.2.1 Hmelj



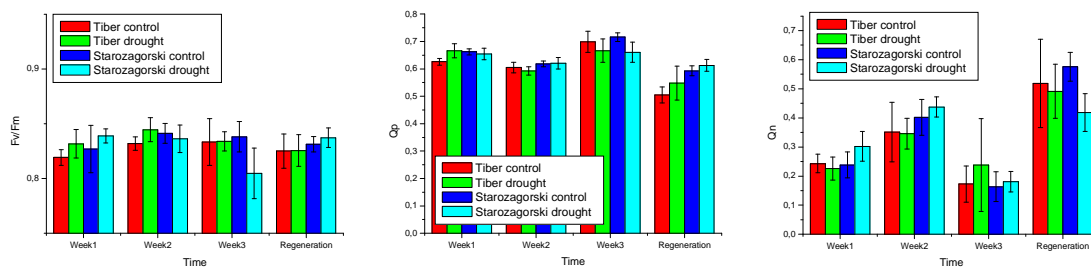
Slika 5. Fotosintetski parametri Fv/Fm, Qp in Qn izmerjeni med sušnim stresom ter regeneracijo pri dveh sortah hmelja (Poskus iz leta 2009). Prikazana so povprečja meritev na 5 rastlinah s standardno deviacijo.



Slika 6. Fotosintetski parametri Fv/Fm, Qp in Qn izmerjeni med sušnim stresom ter regeneracijo pri dveh sortah hmelja (Poskus iz leta 2010). Prikazana so povprečja meritev na 5 rastlinah s standardno deviacijo.

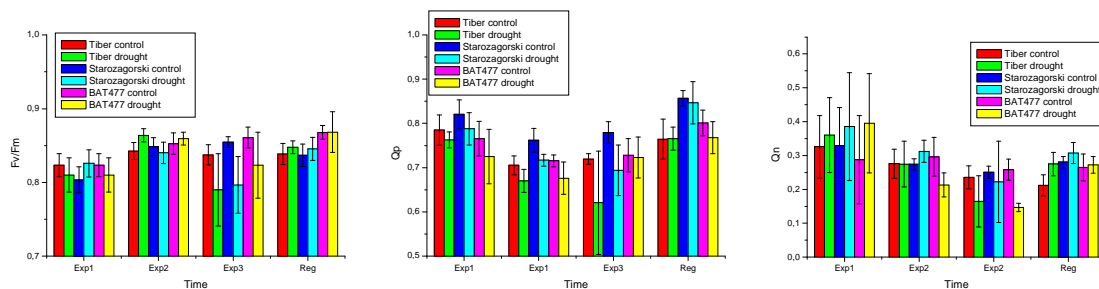
V prvem poskusu manjkajo nekatere meritve v tretjem terminu, zato je interpretacija rezultatov pomanjkljiva (Slika 5). V drugem poskusu (Slika 6) vidimo močan vpliv suše na parameter Fv/Fm pri obeh sortah v drugem terminu. Učinek suše na parameter Qp je manjši, oziroma kaže celo na izboljšanje fotosintetskega statusa. V času regeneracije se vrednosti Fv/Fm in Qp zopet ustalijo.

3.2.2 Fižol



Slika 7. Fotosintetski parametri Fv/Fm, Qp in Qn izmerjeni med sušnim stresom ter regeneracijo pri dveh sortah fižola (Poskus iz leta 2009). Prikazana so povprečja meritev na 5 rastlinah s standardno deviacijo.

Vrednost parametra Fv/Fm se je v prvem poskusu gibala v bližini optimuma 8,3 (Slika 7). Statistično značilno razliko pri sušnih rastlinah v primerjavi s kontrolo smo opazili pri sorti Starozagorski črn v tretjem tednu. Pri regeneraciji je vrednost Fv/Fm spet narastla. Statistično značilne razlike smo opazili tudi pri parametru Qp v tretjem tednu izpostavitve in sicer zmanjšanje fotokemičnega dušenja pri obeh sortah hmelja izpostavljenih suši.

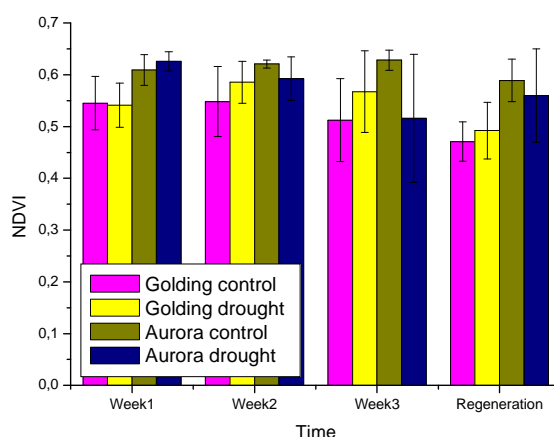


Slika 8. Fotosintetski parametri Fv/Fm, Qp in Qn izmerjeni med sušnim stresom ter regeneracijo pri treh sortah fižola (Poskus iz leta 2010). Prikazana so povprečja meritev na 5 rastlinah s standardno deviacijo.

V drugem poskusu so bili rezultati podobni, tako da smo zmanjšanje vrednosti Fv/Fm opazili pri vseh treh sortah (Slika 8). Zmanjšanje Qp je bilo opazno pri sortah Tiber in Starozagorski, ne pa pri sorti Bat. Opazno je tudi zmanjšanje nefotokemičnega dušenja pri vseh treh sortah. V času regeneracije so se vrednosti vseh parametrov približale vrednostim pri kontroli.

3.3 Meritve reflektometričnega indeksa NDVI

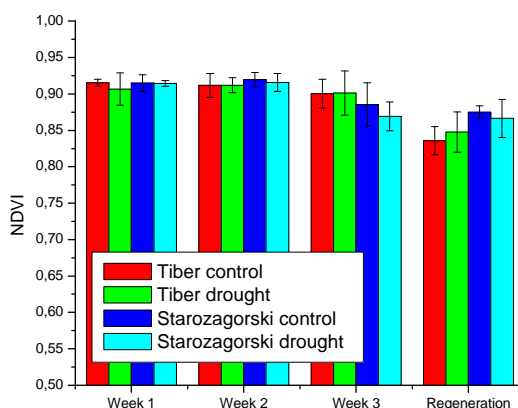
3.3.1 Hmelj



Slika 9. Vrednosti reflektometričnega indeksa NDVI izmerjeni med sušnim stresom ter regeneracijo pri dveh sortah hmelja (Poskus iz leta 2009). Prikazana so povprečja meritev na 5 rastlinah s standardno deviacijo.

Vrednosti indeksa NDVI pri sorti Aurora so višje kot pri Savinjskem goldingu, kar kaže na drugačno strukturo listov. V tretjem tednu se vrednost NDVI pri sušnih rastlinah sorte Aurora zmanjša, nato pa se med regeneracijo spet popravi.

3.3.2 Fižol



Slika 10. Vrednosti reflektometričnega indeksa NDVI izmerjeni med sušnim stresom ter regeneracijo pri dveh sortah fižola (Poskus iz leta 2009). Prikazana so povprečja meritev na 5 rastlinah s standardno deviacijo.

V prvih dveh tednih izpostavitve rastlin suši ni bilo opaznih razlik v vrednosti NDVI med posameznimi skupinami rastlin (Slika 10). V tretjem tednu opazimo statistično ne-signifikanten padec vrednosti NDVI pri sušnih rastlinah sorte Starozagorski čern.

Diskusija:

Učinke suše na fotosintetske parametre lahko pri obeh poskusih opazimo v zadnjem terminu pred regeneracijo. Stres se manifestira v zmanjšanju fotokemičnega dušenja, kar je najverjetneje posledica zaprtja listnih rež in posledičnega znižanja koncentracije CO₂ v mezofilnem tkivu (Baker and Rosenquist, 2004). Pri sušnih rastlinah nismo opazili povečanja nefotokemičnega dušenja, kar bi kazalo na povečan stres ob aktiničnem osvetljevanju rastlin.

Poškodbe fotosintetskega aparata, še posebno fotosistema II lahko opazujemo s parametrom Fv/Fm, ki se je zmanjšal pri praktično vseh sortah, tako pri hmelju kot pri fižolu. Tak učinek ni pričakovan pri zmerni suši (Lima et al. 2002, Ogren 1990). V času regeneracije se vrednosti fotosintetskih parametrov izenačijo z kontrolnimi rastlinami, kar vendarle kaže, da stres ni bil tako močan, da bi povzročil trajne poškodbe.

Z uporabo parametra Fv/Fm pri fižolu lahko v prvem poskusu opazimo večjo občutljivost sorte Starozagorski čern v primerjavi s Tiberjem (Slika 8). V drugem poskusu so učinki suše na parameter Fv/Fm pri vseh vrstah podobni. Na manjšo občutljivost sorte BAT477 kaže parameter Qp (Slika 8). Pri hmelju fotosintetski parametri ne kažejo na bistvene razlike v odpornosti posameznih rastlin na sušo (Slika 5 in 6).

Pri obeh vrstah rastlin se je izkazal NDVI za razmeroma robusten parameter, ki kaže na pomanjkanje vode šele v zelo hudih razmerah. Zanimivo pa so opazne razlike med sortami, tako je pri fižolu bolj občutljiva sorta Starozagorski čern.

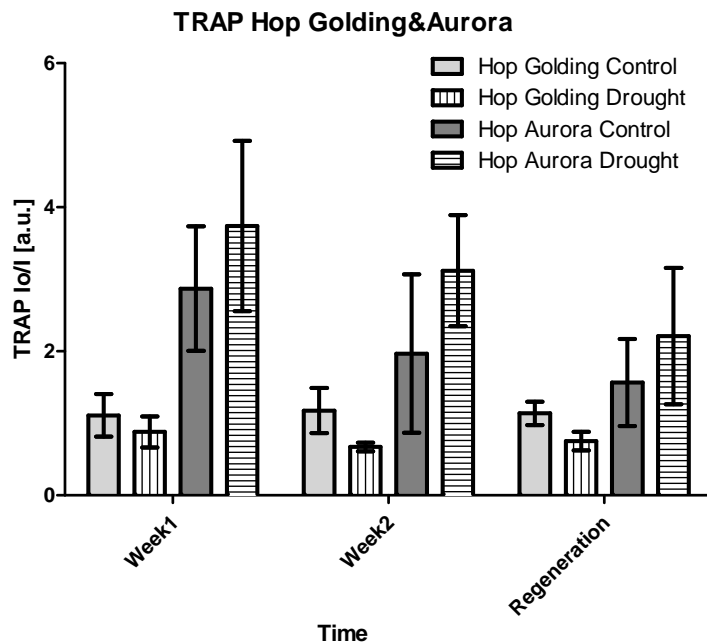
3.5 Določanje celokupne antioksidativne aktivnosti - TRAP test

3.5.1 Hmelj

Hmelj sorta Savinjski golding izkazuje tipičen stresni odziv, kjer pride po določenem času do indukcije antioksidativne obrambne mreže, na kar je le-ta preobremenjena, kar nakazuje nižja TRAP vrednost regeneriranih rastlin. Pri hmelju sorta Aurora se v sušnem stresu TRAP vrednost zmanjša, a se ne razlikuje bistveno od kontrolnih rastlin. Pri regeneraciji pa se pri sušnih rastlinah povrne na začetni nivo in presega vrednosti kontrolnih rastlin. To nakazuje boljšo odpornost na sušni stres, ali pa vsaj na boljšo sposobnost regeneracije.

Na splošno ima hmelj višje TRAP vrednosti od fižola, kar morda nakazuje višje celične koncentracije nizkomolekularnih antioksidantov. Če bi želeli preveriti to hipotezo, bi morali pomeriti koncentracije askobrata, glutationa in aktivnosti glavnih antioksidativnih encimov.

Slika 11: TRAP vrednosti pri sortah hmelja Aurora in Savinjski golding – obravnavanje kontrola (control) in suša (drought)



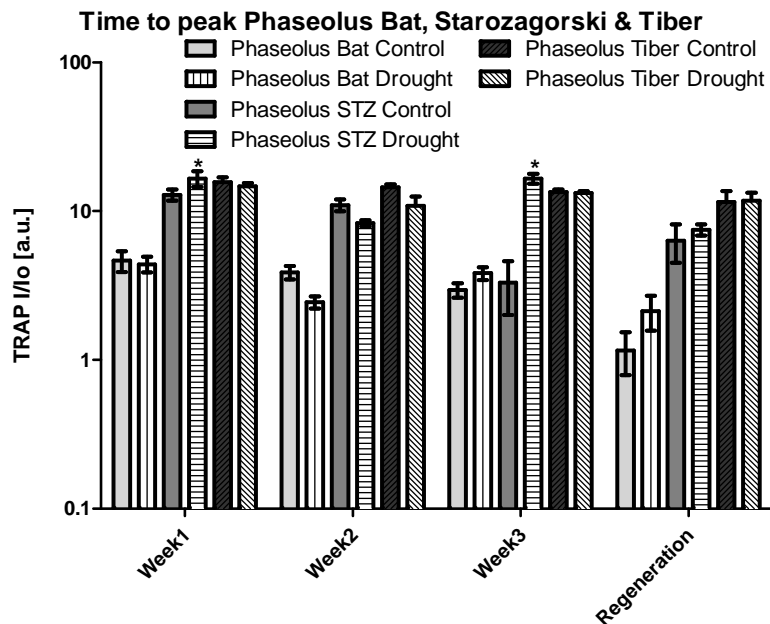
Glede na rezultate sklepamo, da so rastline sorte Savinjski golding, ne glede na to, ali so bile izpostavljene sušnim razmeram ali ne, dosegle povsod nižje TRAP vrednosti od rastlin sorte Aurora. Rastline Savinjskega goldinga so dosegle povsod nižje TRAP vrednosti od kontrolnih rastlin. Obratno velja za sorto Aurora – pri tej so rastline dosegle zmeraj višje vrednosti v kolikor so bile izpostavljene suši.

Sklep: Fiziološke stabilnost oz. toleranca na sušo je pri rastlinah sorte Aurora višja kot pri Savinjskem goldingu, kar sovпада z opažanji obeh sort v pridelavi. Dodatno na podlagi lanskoletnih rezultatov sklepamo, da ima sorta Aurora višjo regenerativno sposobnost v primerjavi s sorto Savinjski golding, saj se rastlinam sorte Aurore TRAP vrednosti pri regeneraciji povrnejo na kontrolno raven.

3.5.2 Fižol

Pri fižolu TRAP meritve niso podale najboljših rezultatov – zlasti zaradi močno povišanih TRAP vrednosti izmerjenih pri Starozagorskem černu v prvemu tednu suše. TRAP vrednost pri Starozagorskem černu močno upade tekom poskusa, pri fižolu Tiber pa je bolj ali manj konstantna. To nakazuje večjo toleranco rastlin Tiber na sušo, ki se jim pri regeneraciji TRAP vrednost celo poveša.

Slika 12: TRAP vrednosti pri sortah navadnega fižola Starozagorski čern, Tiber in Bat – obravnavanji kontrola (control) in suša (drought)



Iz rezultatov je razvidno, da dosega sorta Bat povsod najnižje TRAP vrednosti. V drugem tednu suše je opazen močan upad vrednosti pri sušnih rastlinah. Zanimivo je, da pri kontrolnih rastlinah TRAP vrednosti tekom poskusa upadajo (morda so bile za to sorto ne-optimalne rastne razmere).

Pri sorti Starozagorski črn (STZ) je zaznano povišanje TRAP vrednosti v prvem tednu suše, kar je rezultat aktivne indukcije antioksidativne obrambne mreže. V drugem tednu je opazeno znižanje TRAP vrednosti sušnih rastlin v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Težje razločljivi so rezultati v 3. tednu, ko so se pri rastlinah kontrole TRAP vrednosti močno zmanjšale, pri rastlinah suše pa povečale – verjetno je to rezultat težjega zagotavljanja optimalnih razmer v času poskusa. V regeneraciji so se vrednosti kontrol in sušnih rastlin izenačile.

Pri sorti Tiber je TRAP vrednost tekom poskusa najbolj stabilna. V drugem tednu suše je opazeno znižanje pri sušnih rastlinah, nato v tretjem tednu in v regeneraciji pa povrnitev nazaj na kontrolni nivo.

Pri vseh treh sortah je opazen upad TRAP vrednosti pri sušnih rastlin v drugem tednu izpostavljanja suši.

Sklep: Fiziološka stabilnost oz. toleranca na sušo se je izkazala za najvišjo pri sorti Tiber, sledita ji Starozagorski črn in Bat. Tudi v lanskoletnih poskusih se je sorta Tiber izkazala za bolj tolerantno od sorte Starozagorski črn, saj so bile TRAP vrednosti pri sušnih rastlinah konstante. To nakazuje sorazmerno toleranco na sušni stres: antioksidativna obrambna mreža ni bila ne inhibirana, ne inducirana. Morda to nakazuje strategijo izogibanja stresu pri sorti Tiber.

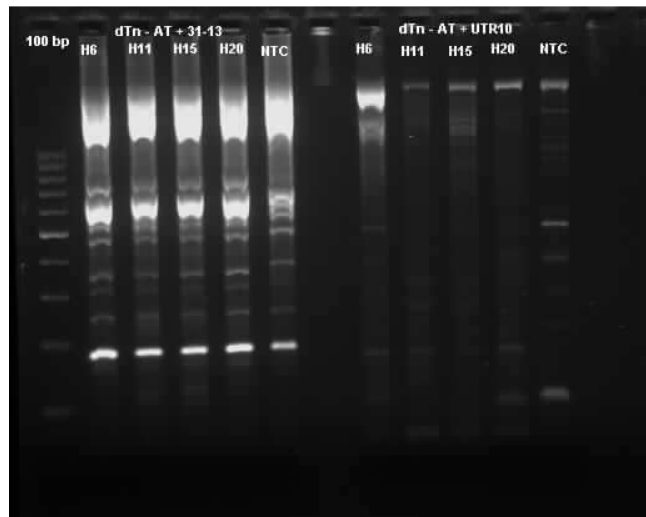
.....

3.6 Določanje ekspresije genov v koreninah in listih hmelja in fižola z metodo diferencialnega prikaza

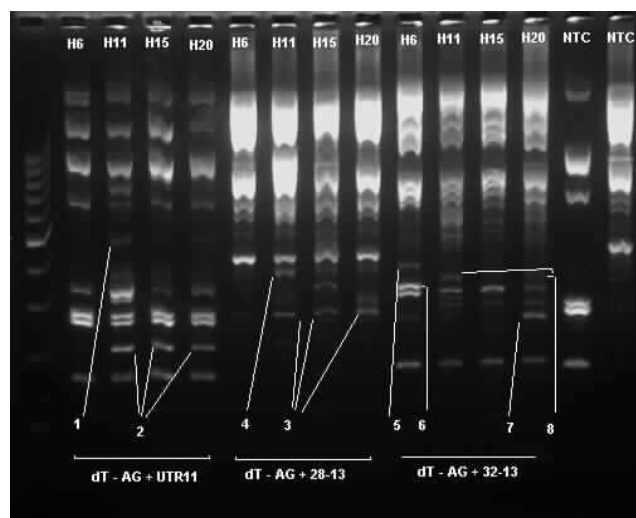
Izolirali smo RNA iz 38 vzorcev korenin hmelja, 38 vzorcev listov hmelja in 12 vzorcev listov fižola. Podrobneje je predstavljen potek dela na koreninah hmelja.

Po reverzni transkripciji, ki smo jo naredili z začetnim oligonukleotidom dT – A (preizkušali smo tudi oligonukleotida dT – G in dT – C), smo na manjšem številu vzorcev v reakciji DD-RT-PCR preizkusili več kot 50 različnih kombinacij začetnih oligonukleotidov (začetni oligonukleotidi: dT – A, dT – AT, dT – AG, dT – CC, dT – CA, dT – C, dT – CG, dT – TG, reverzni začetni oligonukleotidi: UTR10, UTR11, H-AP25 – H-AP32). Pri uporabi 12-ih kombinacij začetnih oligonukleotidov smo dobili diferencialno izražene fragmente (sliki 14 in 15, na sliki 13 pa je prikaz reakcije, kjer ni diferencialno izraženih fragmentov).

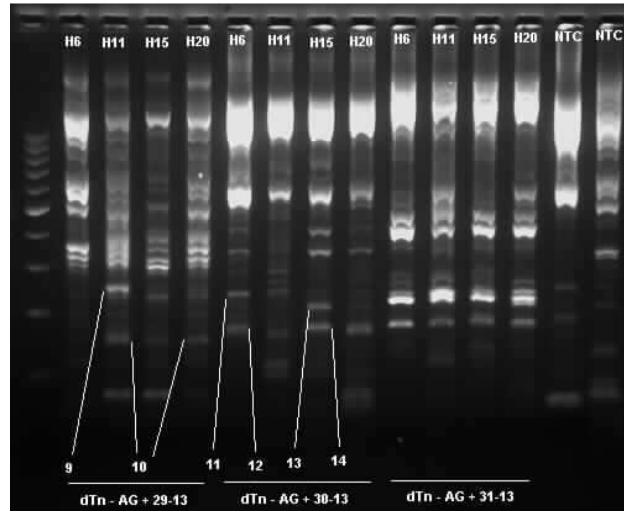
Diferencialni prikaz DD-RT-PCR za štiri vzorce korenin hmelja je prikazan na slikah 13-15.



Slika 13: DD-RT-PCR hmelj-korenine (začetni oligonukleotidi: dT – AT + H-AP31 in dT – AT + UTR10). Ni potencialno diferencialno izraženih fragmentov.



Slika 14: DD-RT-PCR hmelj-korenine (začetni oligonukleotidi: dT – AG + UTR11, dT – AG + H-AP28 in dT – AG + H-AP32). Potencialno diferencialno izraženi fragmenti so označeni s številkami 1-8.



Slika 15: DD-RT-PCR hmelj-korenine (začetni oligonukleotidi: dT – AG + H-AP29, dT – AG + H-AP30 in dT – AG + H-AP31). Potencialno diferencialno izraženi fragmenti so označeni s številkami 9-14.

Izbrali smo 20 jasno diferencialno izraženih fragmentov, jih očistili in naredili sekvenčno reakcijo. Sekvence smo prevedli v aminokislinsko zaporedje. Z uporabo BLAST algoritma smo poiskali podobna AK zaporedja v podatkovni bazi NCBI. S primerjavo AK zaporedij smo določili podobnost z nekaterimi proteini (npr. aquapurin), ki so povezani s sušno vodnim stresom pri različnih rastlinskih vrstah (med drugim topol, detelja). Na podlagi izoliranih AK zaporedij z največjo podobnostjo s proteini ostalih rastlinskih vrst bomo izdelali degenerirane sekvence začetnih oligonukleotidov za preverjanje izražanja teh genov v sušnem/vodnem stresu.

Po enakem postopku je in bo v nadaljevanju potekala analiza listov hmelja.

Pri fižolu, kjer je bila narejena analiza na listih, smo potrdili rezultate predhodnih raziskav. DD-RT-PCR profili na agaroznih gelih so pokazali enake trende od kontrole do različnih stopenj sušnega stresa (suša 1, suša 2, suša 3) za oba kultivarja, Starozagorski in Tiber. Medtem ko so bile med sušo 1 in sušo 2 opazne manjše razlike, so bile le-te večje med sušo 2 in sušo 3 v primerjavi s kontrolo. To nakazuje, da močno pomanjkanje vode inducira jasno izražene razlike v ekspresiji genov.

Zaključek:

Končna uporaba rezultatov projekta – uporaba TRAP testa v selekcijskih metodah žlahtnjenja hmelja in fižola – bo lahko direktno aplicirana v klasičnem žlahtnjenju obeh rastlin, prav tako pa z optimizacijo metode pri ostalih kmetijskih rastlinah. S poznavanjem odzivnosti slovenskih sort hmelja in fižola na sušne razmere bomo lahko poznane genotipe vključili v križanja, z vpeljano metodo določanja tolerantnosti na sušni stres pa bomo le-to uporabili direktno v žlahtniteljskem programu obeh rastlin. TRAP metoda pa bo v prihodnje lahko prenesena tudi v vzgojo sort ostalih kmetijskih rastlin. Rezultati bodo v pomoč pri odločitvah, katere sorte pri različnih kmetijskih rastlinah se naj sadijo zaradi boljše prilagojenosti sušnim razmeram.

Viri:

- Broughton W.J., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil*, 252: 55-128.
- Deering DW. Rangeland reflectance characteristics measured by aircraft and spacecraft sensors. Ph.D. Dissertation, Texas A & M University, College Station, TX, 338 pp. (1978)
- Guida dos Santos M., Vasconcelos R., Ferraz R., Pimentel C. 2004. Gas exchange and yield response to foliar phosphorus application in *Phaseolus vulgaris* L. under drought. *Brazil. J. Plant Physiol.* 16: 171-179.
- Kajfež-Bogataj L., Bergant, K. 2003. Vpliv podnebnih sprememb v Sloveniji na porazdelitev območij s potencialnim primankljajem vode v tleh. *Sodob. kmet.*, 2003, let. 36, št. 2, str. 19-21.
- Kralj D. 1962. Vpliv toplote in padavin na razvoj in rast savinjskega goldinga. I. Jugoslovanski simpozij za hmeljarstvo, Velenje, 25. – 26. April 1962, str. 7-20.
- Larcher W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, Third Edition, 1995, str. 215-275.
- Majer D. 1997. Vodni stres pri hmelju (*Humulus lupulus* L.) cv. 'Savinjski golding'. Doktorska disertacija. Ljubljana.
- Matičič B., Osvald J., Knapič M., Tojnko S. Suše in možnosti ublažitve posledic v kmetijstvu = Droughts and possibilities of consequences mitigation in agriculture. V: Tajnšek, A. (ur.), Šantavec, I. (ur.). *Novi izzivi v poljedelstvu 2000 : zbornik simpozija : proceedings of symposium*, [Moravske Toplice, 14. in 15. december 2000], (Novi izzivi v poljedelstvu). Ljubljana: Slovensko agronomsko društvo, 2000, str. 42-48.
- Miklas, P.N., Kelly, J.D., Beebe S.E., Blair M.W. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. *Euphytica*, 147: 105-131, 2006.
- Neve, R.A. 1991. *Hops*. London, New York, Chapman and Hall, s. 62-65.
- North G.B., Nobel P.S. 1997. Root-soil contact for the desert succulent *Agave deserti* in wet and drying soil. *New Phytol.* 135: 21-29.
- Nunez Barrios A., Hoogenboom G., Nesmith D.S. 2005. Drought stress and the distribution of vegetative and reproductive traits of a bean cultivar. *Scientia Agric.* 62: 18-22.
- Öquist G., Wass R., 1988. A portable, microprocessor operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology. *Physiologia Plantarum*, 73, 211-217.
- Razinger J., Dermastia M., Dolenc Koče J., Zrimec A. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environ. pollut.* (1987). [Print ed.], 2008, vol. 153, str. 687-694. JCR IF: 3.135
- Serraj R, Sinclair TR. 1998. N₂ fixation response to drought in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Bot.* 82: 229-234.
- Steven, M.D., Malthus, T.J., Demetriades-Shah, T.H., Danson, F.M., Clark, J.A. 1990. High-spectral resolution indices for crop stress. Application of Remote Sensing in Agriculture. London, Cambridge University Press.
- Šuštar-Vozlič J., Černe M., Meglič V. 2000. Genetska variabilnost fižola v Sloveniji. *Sodobno kmetijstvo*, 33, 9: 378-379.
- Torres G.A.M., Pflieger S., Corre-Menguy F., Mazubert C., Hartmann C., Lelandais-Brière C. 2006. Identification of novel drought-related mRNAs in common bean roots by differential display RT-PCR. *Plant Science* 171: 300-307.
- White J.W. 1987. Preliminary results of the Bean International Drought Yield Trial (BIDYT). V: *Proceedings of the International Bean Drought Workshop*, 19-21 October 1987, p. 126-145. Cali, Colombia.
- White J.W., Ochoa R., Ibarra F., and Singh S.P., 1994. Inheritance of seed yield, maturity and seed weight of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under semi-arid rainfed conditions. *J Agric Sci* 122: 265-273.



.....