

**PROCJENA TOLERANTNOSTI HRVATSKE GERMPLAZME VINOVE
LOZE NA SUŠU (KK.05.1.1.02.0010)**

**SHEMA ZA JAČANJE PRIMIJENJENIH ISTRAŽIVANJA ZA MJERE
PRILAGODBE KLIMATSKIM PROMJENAMA**

Razdoblje provedbe projekta: 1. ožujka 2020. do 1. ožujka 2023.

Transkriptomski profili – genska ekspresija ABA za pet genotipova
vinove loze

Pokus zasušivanja na autohtonim hrvatskim sortama u polukontroliranim uvjetima u stakleniku

Vinova loza često se koristi kao modelna biljka za istraživanje vodnog stresa, s obzirom da je po uzgoju, treća najznačajnija kultura u svijetu nakon krumpira i rajčice (Alston i Sambucci, 2019), uzgaja se na području Mediterana, koji predstavlja hot-spot vezan uz probleme suše. Pored toga, vinova loza kao drvenasta heliofilna vrsta, dubokog i snažnog korijena, ima izraženu tolerantnost na nedostatak vode. Ipak, s obzirom na veliku brojnost i raznolikost sorata prilagođenih pojedinoj regiji uzgoja, te nepredvidivost i ekstreme u vremenskim uvjetima, prioritetno su važna istraživanja ponašanja lokalne germplazme vinove loze na nedostatak vode.

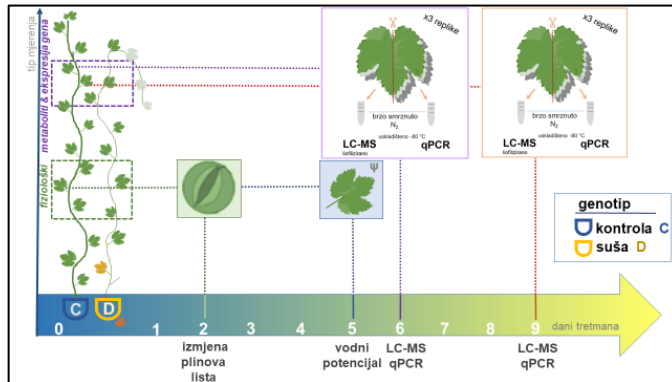
Novija istraživanja pokazuju kako vinova loza ima brz odgovor na stres suše, te je u najranijim stadijima nedostatak vode uvjetovan najprije hidrauličkim, fiziološkim signalima. Produljenjem stresa suše, slijedi metabolički odgovor biljke na stres, odnosno aktivacija obrambenih mehanizama. Hormon, abscizinska kiselina (ABA), smatra se najpouzdanijim markerom za stres suše, s obzirom na vrlo ranu akumulaciju u biljci tijekom stresa, a u prve korake u biosintezi ABA uključeni su s geni *NCED1* i *NCED2*. Pored ABA, važni metaboliti povezani sa stresom suše još su i salicilna kiselina (SA), osmoprotektant prolin, te malondialdehid (MDA) – biomarker lipidne peroksidacije koji se akumulira tijekom povećanog oštećenja lipida.

Analiza ekspresije gena (transkriptoma) se pokazala pouzdana, specifična metoda u identifikaciji gena i genomskih regija odgovornih za stresne uvjete poput suše, s obzirom da se u stresnim uvjetima prepisuje samo dio genetičke upute, DNA molekule u mRNA (transkripcija) u stanici, koje stanica u datim uvjetima „treba“. Transkripcija može biti potaknuta uslijed stresora iz okoline, promjene u metabolizmu ili nekog drugog signala koji stanica prima iz okoliša ili se pak može odnositi na specijaliziranu funkciju koju stanica regularno obavlja u organizmu.

Istraživanja na vinovoj lozi pokazala su da se najveće metaboličke promjene događaju prvih 4 do 8 dana od početka stresa suše, prvenstveno akumulacija i sinteza ABA odgovorne za provodljivost puči i njihovo zatvaranje tijekom stresa kao i zatvaranje akvaporina – proteinskih kanalića za međustanični protok vode i manjih topivih tvari, a nešto kasnije slijedi i metabolički odgovor povezan s održavanjem turgora u biljci i uspostavi osmotske ravnoteže kao i zaštita od oštećenja lipida (Degu i sur., 2019).

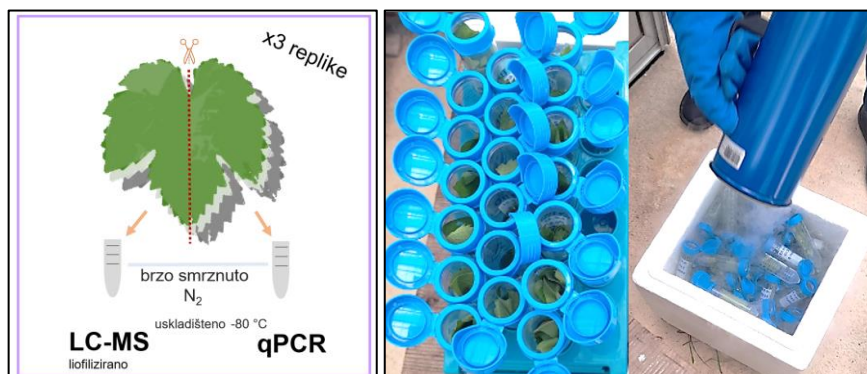
U okviru projekta TOLVIN, analizirano je pet genotipova vinove loze, *Vitis vinifera* L., četiri najznačajnije autohtone ili udomaćene sorte vinove loze (Graševina, Malvazija istarska, Plavac mali crni, Tribidrag) te jedan genotip divlje loze, *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* Gmel Hegi. Proveden je devetodnevni pokus zasušivanja u periodu od 31. svibnja do 9. lipnja, 2021. godine. Svaki genotip sastojao se od 18 biljaka organiziranih u nasumičnom rasporedu. Devet biljaka podvrgnuto je tretmanu stresa suše na način da je u potpunosti izostavljeno navodnjavanje, dok je devet biljaka odgovarajuće

kontrole navodnjavano do poljskog kapaciteta prvog, četvrtog i osmog dana trajanja tretmana. Hodogram pokusa suše prikazan je na slici 6.



Slika 6. Shematski prikaz provedenog pokusa zasušivanja, provedenih mjerenja i rokova uzorkovanja

Uzorci za analizu metabolita i ekspresije gena prikupljeni su 6. i 9. dana tretmana: u prvom roku uzorkovan je peti potpuno razvijeni list te u drugom roku šesti potpuno razvijeni list od vrha mladice za biljke tretmana i kontrole. Svaki genotip bio je zastupljen s tri biološke replike (svaka po tri biljke, n= ukupno devet biljaka po tretmanu). Polovica svakog lista uzeta je za analizu metabolita, a druga polovica za ekspresiju gena. Odmah po uzorkovanju, uzorci lista smrznuti su brzim postupkom pomoću tekućeg dušika te pohranjeni na -80 °C (slika 7).



Slika 7. Uzorkovanje listova za analizu metabolita i ekspresije gena tijekom stresa suše

ABA

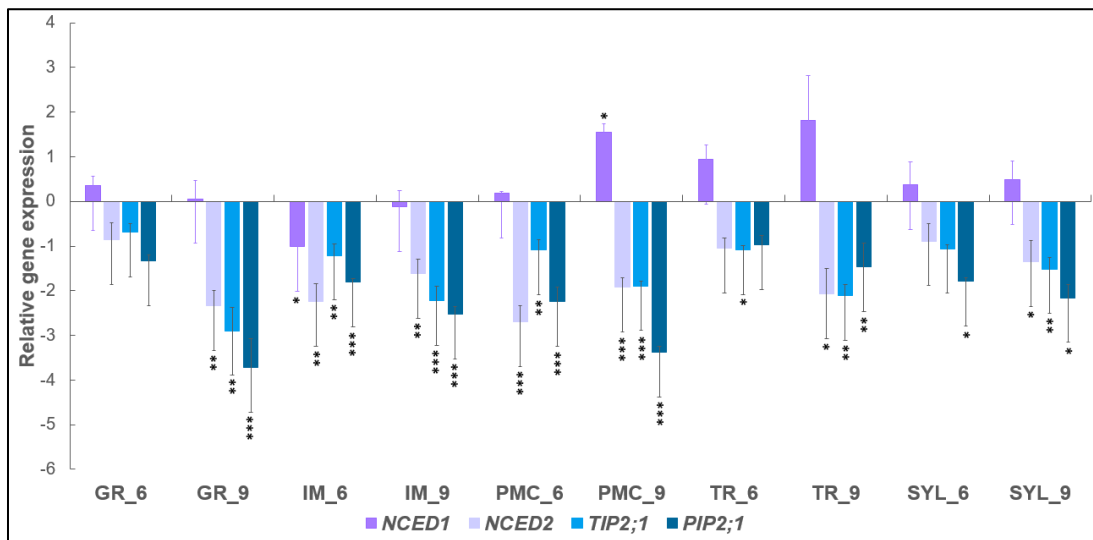
Rezultati istraživanja pokazali su dinamičan odgovor svih genotipova na akumulaciju metabolita tijekom stresa suše. Abscizinska kiselina (ABA) pokazala je najjači i najraniji signal akumulacije te može poslužiti kao pouzdan marker za ranu detekciju stresa suše. Geni povezani s biosintezom ABA (*NCED1* i *NCED2*) različito su se ekspresirali u listu vinove loze (slika 6). *NCED1* se pokazao kao bolji marker stresa suše od *NCED2* (down-regulated). *NCED1* je pokazao pojačanu ekspresiju (up-regulation) kod svih genotipova, osim kod Malvazije istarske. Najizraženija ekspresija *NCED1* gena utvrđena je kod Plavca malog. Razlike između ekspresije gena kod Malvazije istarske i Plavca malog upućuju na

različitu brzinu reakcije genotipova na stres, a *NCED1* u tom smislu, pokazao se i kao informativniji marker od metabolički akumulirane abscizinske kiseline u listu. Izražen je značajan učinak tretmana na akumulaciju metabolita kao potvrda brze reakcije svih *Vitis vinifera* genotipova na stres suše. Utvrđen je i značajan utjecaj genotipa za pojedine parametre, što upućuje na raznolikost genotipova, te potrebu daljnjih istraživanja tolerantnosti suše, obuhvaćanjem većeg broja genotipova.

Akvaporini

Brojna istraživanja utvrdila su razlike u ekspresiji gena akvaporina u biljkama tijekom suše. Kod vinove loze, plasma membrane intrinsic proteins (PIPs) i tonoplast intrinsic protein (TIPs) pokazali su značajnu ekspresiju tijekom suše, naročito geni *PIP2;1* i *TIP2;1*. Istraživanja su pokazala da je ekspresija navedena dva gena visoko korelirana s hidrauličkom provodljivosti lista (K_{leaf}), a *TIP2;1* još i s provodljivosti puči (g_s) te da je u sušnim uvjetima, opadanje hidrauličke provodljivosti lista za 30% korelirano sa zatvaranjem puči (g_s). Istraživanja su također utvrdila i smanjenu ekspresiju (down-regulation) gena za akvaporine u listovima tijekom stresa suše, te njihovu pojačanu ekspresiju u korijenu vinove loze, što svjedoči o važnosti korijena u borbi protiv stresa suše.

Rezultati projekta TOLVIN u skladu su s prethodnim istraživanjima vezanim uz akvaporine i njihove smanjene ekspresije (down-regulacije) tijekom prvih dana suše, što je u skladu i s pojačanom ekspresijom gena za abscizinsku kiselinu, koja tijekom stresa ima učinak na zatvaranje i puči i akvaporina (slika 8).



Slika 8. Ekspresija gena za abscizinsku kiselinu (ABA: *NCED1* i *NCED2*) i akvaporine (AQP: *TIP2;1* i *PIP2;1*) u listu pet genotipova *Vitis vinifera* L., 6. i 9. dan poduzimanja tretmana suše