

Nieukierunkiwane profilowanie metabolitów pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) w warunkach stosowania biopreparatu endofitycznego InnoEndop

Pacan M.¹, Fornal E.², Sumara A.², Nikolaichuk H.², Sochaczewska A.³, Kruczyńska A.³, Wolińska A.³, Kuźniar A.⁴

1. Wydział Medyczny, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
2. Zakład Bioanalitiky, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
3. Katedra Mikrobiologii i Medycyny Translacyjnej, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II
4. Pracownia Genomiki i Genetyki Laboratoryjnej, Katolicki Uniwersytet Lubelski Jana Pawła II

Wprowadzenie i cel badań

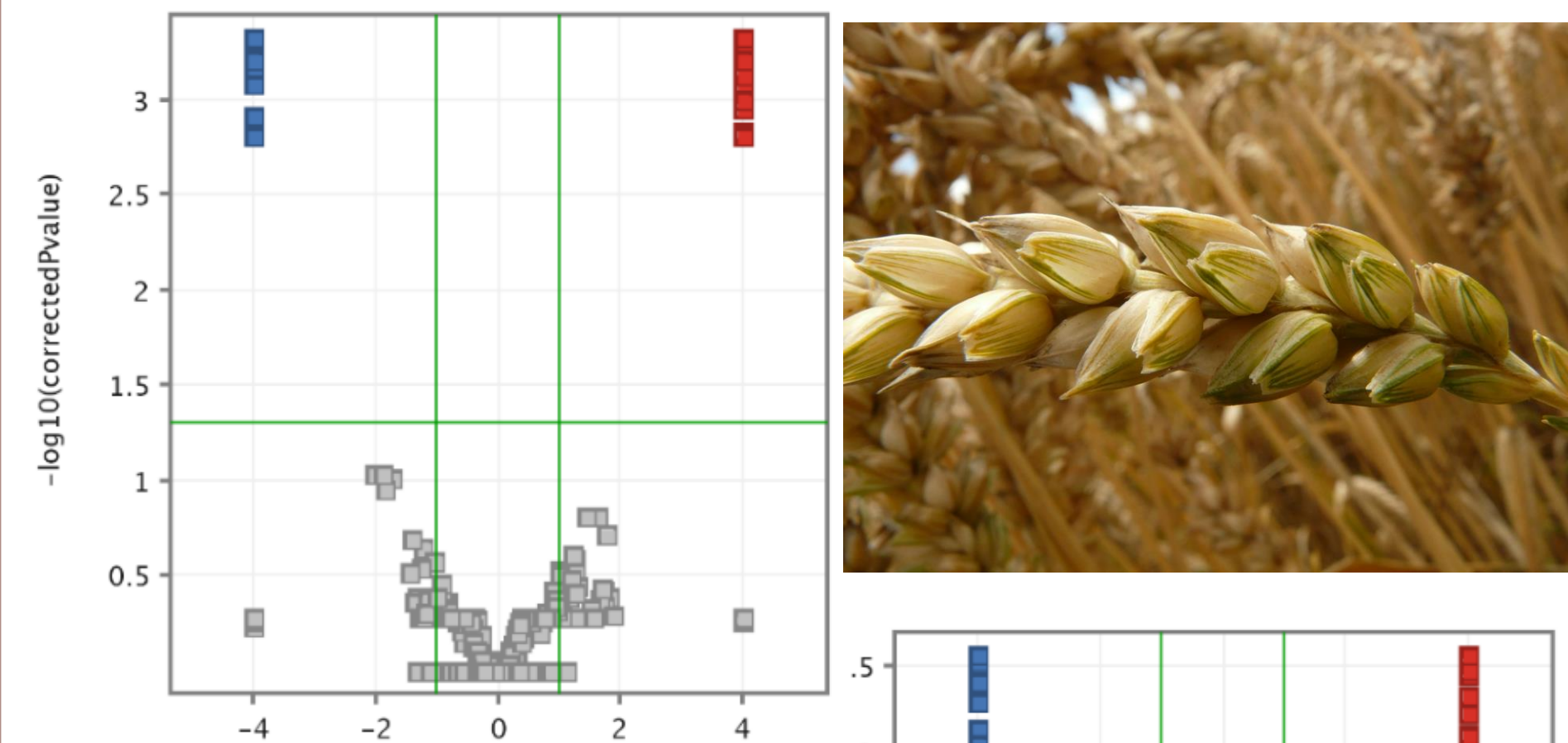
Ze względu na istotne znaczenie żywnościowe i gospodarcze pszenicy zwyczajnej, roślina ta jest przedmiotem zainteresowania metabolomiki, badającej zmiany metaboliczne zachodzące pod wpływem czynników biotycznych i abiotycznych, w tym działania mikroorganizmów endofitycznych. Dlatego też **celem niniejszego badania była ocena wpływu biopreparatu endofitycznego InnoEndop na wzrost pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) *in vitro* oraz na profil metabolomiczny roślin odmian Rokosz i Hondia w doświadczeniu wazonowym.**

Procedura badawcza

- Materiały:** Ziarniaki pszenic odmian Hondia, Tytanika i Rokosz oraz preparat endofityczny InnoEndop.
- Doświadczenie *in vitro*:** Inkubacja ziarniaków z biopreparatem (Bprep A: gęstość komórek 1,07·10⁷; Bprep B: 6,67·10⁴) w trzech temperaturach.
- Doświadczenie wazonowe:** Prowadzenie **40 - dniowej hodowli z zaprawionych** (0,25g na kg ziarna) **biowęgłem** (Hondia - WBcarbH, Tytanika - WBcarbT, Rokosz - WBcarbR) **lub biopreparatem** (odpowiednio WBprepH, WBprepT, WBprepR) **ziarniaków na podłożu torfowym** wobec prób kontrolnych (odpowiednio WOH, WOT, WOR).
- Analiza aktywności enzymatycznej PAL** - amoniakolizazy L-fenylalaniny (wg Smirnofi i wsp. 2015, Medda i wsp. 2020) **oraz POX** - peroksydazy (Debona i wsp. 2012; Shokat i wsp. 2020).
- Analiza metabolomiczna** siewek (S) i bielm z okrywą nasienną (E) z bardzo wczesnej fazy wzrostu (05/09 wg skali BBCH) oraz roślin z 10, 20 i 40 dnia hodowli, **Ekstrakcja metabolitów** mieszaniną metanol/chloroform/woda (2,5:1:0,5 v/v/v) w -20°C, **Analiza LC/TOF MS** w trybie skan m/z 100 do 1000, ESI+ i ESI- (LC: Agilent Technologies 1290, MS: Agilent Technologies 6550 iFunnel LC/QTOF, źródło jonów: Dual JetStrem Technology), rozdział prowadzono na kolumnie Zorbax Extend C18 (2.1x100mm, 1.8µm, Agilent Technologies) z fazą ruchomą - 0,1% kwasem mrówkowym w wodzie (A) oraz acetonitrylu (B) w gradiencie liniowym siły elucji 5–95% B (frakcja niepolarna) i 3–10% B (frakcja polarna).
- Analiza statystyczna:** Do oceny istotności różnic pomiędzy grupami zastosowano wieloczynnikową analizę wariancji MANOVA.

Tab. 3. Liczba cech metabolicznych dla odmian Rokosz i Hondia w pierwszym i ostatnim dniu doświadczenia (S - siewka, E - bielmo z okrywą nasienną, R - roślina; N - frakcja niepolarna, P -frakcja polarna)

Typ analizy	W0_OR	W0_OH	WBprep_OR	WBprep_OH
S-N, ESI+	846	990	717	797
E-N, ESI+	606	389	525	585
S-P, ESI+	571	541	532	441
E-P, ESI +	451	355	446	343
Typ analizy	W0_40R	W0_40H	WBprep_40R	WBprep_40H
R-N, ESI+	1377	1499	1364	1415
R-N, ESI-	658	792	766	702
R-P, ESI+	691	721	713	589
R-P, ESI-	636	741	668	576



Rys. 2. Wyniki profilowania cech metabolicznych dla odmiany Rokosz po 40 dniach doświadczenia wazonowego jako analiza porównawcza między grupą kontrolną (W0_40R) i badawczą (WBprep_40R); po lewej: ESI+, frakcja polarna; po prawej ESI-, frakcja niepolarna; na czerwono zaznaczono cechy metaboliczne upregulated po zastosowaniu biopreparatu, zaś na niebiesko - downregulated.

Wnioski

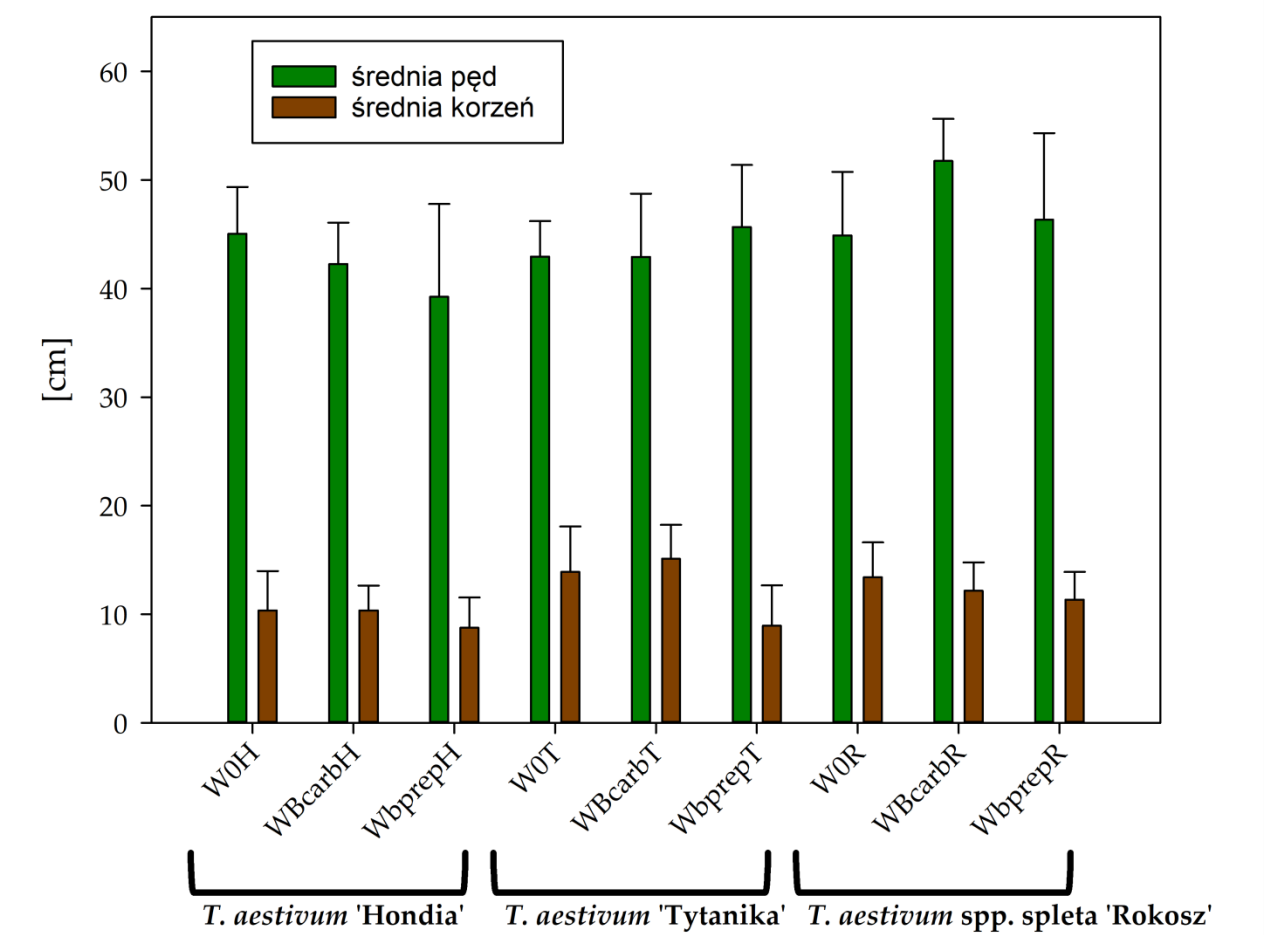
- Najbardziej optymalną dawką biopreparatu jest ta o gęstości komórek 6,67·10⁴ dla wszystkich badanych odmian pszenic zwyczajnych w temperaturach 15°C i 20°C.
- Istotność statystyczna potwierdza pozytywny wpływ InnoEndop na wzrost pędów pszenic Tytanika i Rokosz.
- Wobec zmiennej w czasie aktywności PAL i POX, biopreparat InnoEndop może być pomocny w zwiększaniu tolerancji lub odporności pszenicy na porażenie patogenem.
- Biopreparat InnoEndop może wpływać na stymulację syntezy auksyny (IAA).

Wyniki

Tab. 1. Długości epikotyli i korzeni badanych odmian pszenic po 20 dniach inkubacji *in vitro* z biopreparatem (n=5)

Grupa badaw - cza	Temperatura (°C)											
	5			15			20			30		
	Hondia	Rokosz	Tytanika	Hondia	Rokosz	Tytanika	Hondia	Rokosz	Tytanika	Hondia	Rokosz	Tytanika
Długość epikotyl (mm)												
Kontrola	5,536	6,546	5,649	15,000	20,024	11,175	20,000	22,359	13,071	30,000	55,024	45,550
Bprep A	5,897	4,848	4,647	6,414	11,982	10,900	25,595	28,897	22,436	16,308	22,842	21,421
Bprep B	6,209	5,321	4,811	22,175	24,257	9,093	12,143	21,302	11,622	32,825	50,462	46,262
Długość korzeni (mm)												
Kontrola	8,429	13,041	9,298	15,867	18,235	20,714	18,037	19,410	16,396	30,918	41,442	31,579
Bprep A	10,326	9,679	8,472	19,634	28,673	17,764	15,851	25,269	14,958	28,677	41,189	29,780
Bprep B	9,448	10,405	7,118	17,875	20,671	18,272	21,500	19,633	17,494	18,658	24,657	17,888

Wykazano statystycznie istotny wpływ dawki Bprep B na długość epikotyłu (p=0,00002) i korzenia (p=0,00001) w 15°C i 20°C dla odmian Hondia, Tytanika i Rokosz. Temperatury te mogą występować podczas pierwszych etpów wzrostu pszenicy ozimej.



Rys. 1. Długość pędów i korzeni roślin w 40-dniowym doświadczeniu wazonowym po traktowaniu InnoEndop i biowęgłem wobec kontroli (wartości średnie wraz z OD, n=3).

Stosowanie biopreparatu w sposób statystycznie istotny stymulowało wzrost pędu odmian Rokosz i Tytanika (p=0,00088), natomiast w przypadku biowęgła zależność ta dotyczyła tylko pszenicy Rokosz. Dla długości korzenia nie odnotowano istotności statystycznej w odniesieniu do wpływu InnoEndop.

Tab. 2. Aktywność POX i PAL w tkankach pszenicy podczas 40-dniowego doświadczenia wazonowego wyrażona jako pomiar absorbancji przy λ=470 nm (n=3)

Grupa badawcza	Czas wzrostu siewki (dzień)															
	5		10		15		20		25		30		35		40	
	POX	PAL	POX	PAL	POX	PAL	POX	PAL	POX	PAL	POX	PAL	POX	PAL	POX	PAL
WOH	0,08 5	0,718	0,036	1,688	2,184	1,207	0,625	2,023	0,067	1,203	0,761	2,996	0,065	0,802	0,695	2,797
WBcarbH	0,00 3	1,353	0,397	2,023	0,015	4,028	0,293	3,488	1,224	1,655	0,408	1,919	0,248	1,602	0,149	2,448
WBprepH	0,03 2	1,732	0,008	0,711	0,739	1,822	0,641	1,711	0,630	1,275	0,048	1,641	0,022	0,249	1,506	0,023
WOR	0,01 6	0,590	0,139	1,124	0,124	0,319	0,646	1,271	0,007	0,640	0,198	0,592	0,740	0,928	0,899	0,175
WBcarbR	1,20 7	0,449	0,053	0,613	0,030	3,812	1,298	3,065	0,283	1,952	0,187	0,608	0,291	0,733	0,023	0,988
WBprepR	0,02 7	2,902	0,020	8,488	0,618	3,998	0,672	11,273	0,326	4,942	0,073	5,232	0,010	3,817	0,387	3,763

Pomimo braku trwałości aktywności POX, wyraźnie wyższe jej wartości odnotowano w 40 dniu doświadczenia u roślin inokulowanych biopreparatem, w stosunku do kontroli, dla odmian Hondia i Tytanika. Podwyższona aktywność POX może świadczyć o tworzącej się ochronie np. przeciwko patogenom. Natomiast aktywność PAL wzrosła istotnie statystycznie w roślinach po traktowaniu InnoEndop (p=0,001) i utrzymywała się na stosunkowo wysokim poziomie przez 30 dni. Przykładem wysokiej aktywności enzymu aż do 40 dnia hodowli była odmiana Rokosz inokulowana preparatem.

Analiza LC/TOF MS pozwoliła na określenie cech metabolicznych, które wyróżniano z profili metabolicznych przy pomocy algorytmu find by molecular formula (Tab. 3). W próbach roślinnych poddanych traktowaniu biopreparatem ilość wytypowanych cech metabolicznych była w zakresie 576 - 1415, w zależności od testowanej odmiany, polarności metabolitów oraz zastosowanej jonizacji, przy jednoczesnej ilości cech w zakresie 636 - 1499 dla kontroli.

Pośród wszystkich analizowanych grup badawczych istnieją statystycznie istotne różnice (p=0,05) w profilach metabolicznych, obejmujące metabolity o co najmniej dwukrotnej różnicy intensywności sygnału, scharakteryzowane na podstawie dokładnej masy i czasu retencji (Rys. 2). W przykładowym profilowaniu zidentyfikowano kwas indolo-3-octowy (IAA). Cecha ta, po dodaniu preparatu, była określona jako upregulated, co pośrednio może sugerować udział składników InnoEndop jako stymulatorów syntezy tego związku.