

DEVELOPMENT OF PHENOTYPING METHODS FOR DROUGHT TOLERANCE IN *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH. BASED ON SPECTRAL REFLECTANCE AND THERMAL IMAGING

VÝVOJ METOD FENOTYPIZACE TOLERANCE K SUCHU U *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH ZALOŽENÝCH NA SPEKTRÁLNÍ ODRAZIVOSTI A TERMÁLNÍM ZOBRAZOVÁNÍ

Rajsnerová P.^{1,2}, Klem K.^{1,2}

¹Department of Forest Ecology, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 1/1665, 613 00 Brno, Czech Republic

²CzechGlobe – Global Change Research Centre AS CR, v. v. i., Bělidla 986/4a, 603 00 Brno, Czech Republic

E-mail: rajsnerova.p@czechglobe.cz

ABSTRACT

The main objective of our study was to develop new phenotyping methods for early detection of tolerance to drought stress. The six *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. natural accessions were used as a model for development of phenotyping methods based on spectral reflectance and thermal imaging. Plants were grown in pots under artificial light and controlled temperature conditions. The drought stress was induced at the leaf rosette growth stage for 14 days. We tested the various vegetation and chlorophyll indices derived from spectral reflectance measurements and thermal imaging method for the assessment of leaf temperature differences between dry and wet treatments. It was found that both approaches are able to detect responses to drought stress. However, it is clear that the responses of individual parameters on the effect of drought stress have different meaning. For this reason it will be necessary to carry out additional measurements in which the response of individual spectral reflectance and leaf temperature parameters will be correlated to direct indicators of plant response to drought stress such as leaf water potential and stomatal conductance.

Key words: phenotyping, drought stress, *Arabidopsis thaliana*, spectral reflectance, thermal imaging, vegetation indices

Acknowledgments: This work was supported by the European Commission (project CzechGlobe - contract CZ.1.05/1.1.00/02.0073).

ÚVOD

Zvýšená frekvence a intenzita abiotických i biotických stresových podmínek v rostlinné produkci, související s nárůstem časové a prostorové variability klimatických podmínek, vyžaduje rychlou reakci v sektoru šlechtění, jejímž cílem by měly být nové genotypy vykazující zvýšenou odolnost vůči očekávaným změnám prostředí a výskytu škodlivých organismů. Tyto požadavky staví šlechtitele před velmi komplexní úkol tvorby genotypů, u kterých bude skloubena odolnost vůči abiotickým a biotickým stresům a vysoká efektivita využití zdrojů (především živin a vody) s požadavky na kvalitu a produktivitu. Dosažení tohoto cíle není v současnosti možné bez zavedení nových metodických přístupů a technologií, které zajišťují zásadní zrychlení selekce genotypů ať již v oblasti vývoje nástrojů molekulární genetiky pro podporu šlechtění jako je například „MAS - marker-assisted breeding“ (Collard a Mackill, 2008) nebo vývoje technologií pro high-throughput vyhodnocení fenotypu. V případě komplexních znaků (založených větším počtem genů) je nezbytná kvantitativní analýza strukturních a funkčních vlastností rostlin (fenotypizace rostlin) která se nyní stává nejslabším článkem šlechtitelského procesu (Whitepaper of the European Plant Science Organisation on Plant Phenotyping, 2010). Podstatou fenotypizace rostlin je sběr a vyhodnocení velkého množství informací o růstových, fyziologických a biochemických parametrech rostlin, které jsou měřeny a vyhodnocovány pomocí nedestruktivních metod, včetně metod nepřímých, nejčastěji založených na optických signálech, jako je spektrální reflektance (Montes et al. 2007), fluorescence chlorofylu (Jansen et al. 2009) či termální zobrazování (Munns et al. 2010). Zásadním úkolem fenotypizace je transformace těchto dat do podoby využitelné ve šlechtění, tedy do formy kvantitativní či kvalitativní informace o komplexních znacích jako je např. výnos, kvalita produkce, odolnost k abiotickému stresu či odolnost k chorobám.

Cílem této práce bylo vyvinout rychlou a neinvazivní metodu diagnostiky tolerance k suchu, která by umožňovala selekci genotypů na tento znak na základě vyhodnocení fenotypové odezvy (fenotypizaci). Modelové experimenty byly prováděny s genotypy *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. přirozeného původu u kterých byl uměle indukován stres sucha a následně prováděna pravidelná měření spektrální odrazivosti v rozsahu 350-2500 nm a teploty listů pomocí termální kamery.

MATERIÁL A METODY

Experiment se šesti genotypy *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. byl prováděn v laboratorních podmínkách při umělém osvětlení LED panely a řízené teplotě. Rostliny byly kultivovány v nádobách s rašelinovým substrátem do fáze vytvoření listové růžice. Do této fáze bylo rovnoměrné zásobení vodou zajištěno kapilárním vztláním. Následně byl u tří opakování od každého genotypu indukován stres sucha a u tří opakování bylo udržováno stejné zásobení vodou každodenním doplněním na stejnou hmotnost.

V pravidelných časových intervalech od indukce sucha byla prováděna měření spektrální odrazivosti listů v rozsahu 350-2500 nm přístrojem FieldSpec3 s optickým vláknem a teploty listů pomocí termální kamery s vysokým rozlišením Flir řady SC. Tato měření byla doplněna o stanovení světlem saturované rychlosti asimilace a stomatální vodivosti s využitím otevřeného gazometrického systému LiCor 6400. Data byla statisticky zpracována pomocí software SigmaPlot 11.

VÝSLEDKY A DISKUSE

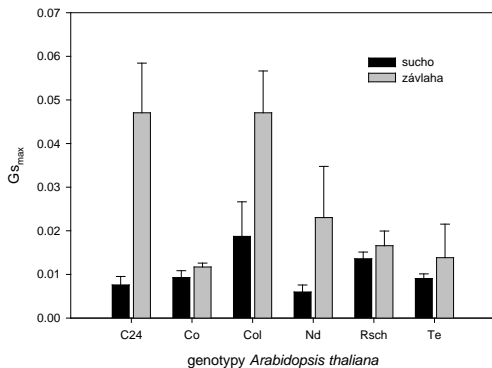
Výsledky měření prováděných v pravidelných intervalech od začátku indukce sucha umožnily vyhodnotit dynamiku změn jednotlivých parametrů a možnosti jejich využití pro včasnou detekci odezvy genotypů na stres sucha. Zásadní rozdíly mezi jednotlivými metodami měření, parametry i genotypy jsou ovšem patrné z výsledků, které byly získány v závěru experimentu, tedy 14 dní po začátku indukce sucha. Rozdílná odezva jednotlivých genotypů na stres sucha je velmi dobře patrná na parametru světlem saturované stomatální vodivosti $G_{s_{max}}$ (obr. 1). Tyto údaje ukazují významné rozdíly mezi suchou a zavlažovanou variantou u genotypů C24 a Col, zatímco u genotypů Co, Rsch a Te se stomatální vodivost liší jen nepatrně.

Mezi nepřímými metodami pro odhad stomatální vodivosti a tím také odezvy na stres sucha se jako nejvhodnější ukazuje měření teploty listů pomocí termální kamery. Teplota listů se mění s otevřeností průduchů a rychlostí transpirace, přičemž zavírání průduchů vede ke zvyšování teploty (obr. 2). Rozdíly v teplotě listů mezi suchou a zavlažovanou variantou jsou patrné z obr. 3. Je zřejmé, že teplota listů se vlivem sucha zvyšuje u všech genotypů, ovšem např. u genotypu Te jsou rozdíly jen malé v porovnání např. s genotypem Col.

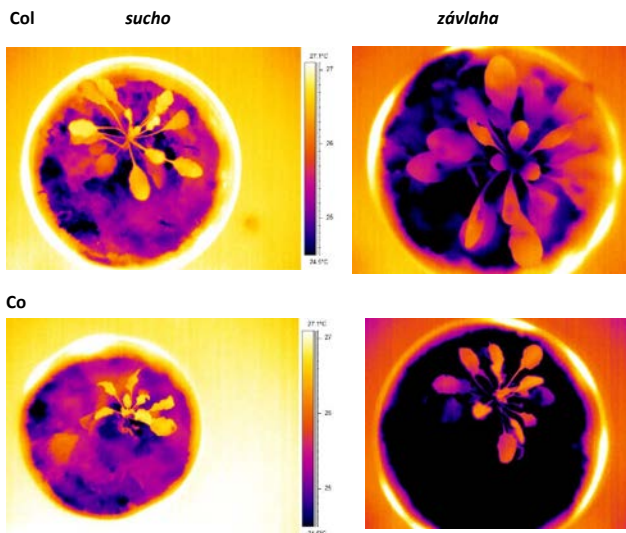
Pro vyhodnocení vlivu sucha na spektrální odrazivost byly použity tzv. vegetační a chlorofylové indexy, které jsou založeny obvykle na jednoduchých nebo normalizovaných poměrech odrazivosti ve dvou až čtyřech vlnových délkách. V rámci celé řady indexů byly nejzajímavější výsledky dosaženy u indexu $NDVI_{2340}$ který využívá absorpčního pásma pro vodu a pak u tzv. Water Index (WI) který již byl dříve využíván pro diagnostiku stresu sucha. Tyto indexy budou mít pravděpodobně odlišnou interpretaci, protože vykazují rozdílnou odezvu jednotlivých genotypů. Zatímco například u indexu $NDVI_{2340}$ byly nejvyšší kontrasty mezi suchou variantou a závlahou zaznamenány u genotypu C24 a nejnižší u genotypu Te v případě WI byly nejvyšší rozdíly zjištěny

u genotypu Te. Je ovšem patrné, že odezva na stres sucha je poměrně konzistentní napříč všemi genotypy pro oba indexy.

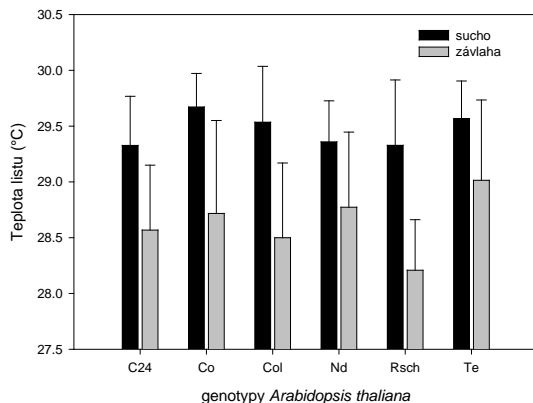
Obr. 1 Vliv stresu sucha na hodnoty světlem saturované stomátální vodivosti u jednotlivých genotypů Arabidopsis thaliana. Měření bylo provedeno 14 dní po začátku indukce sucha pomocí otevřeného gasometrického systému LiCor 6400. V grafu jsou znázorněny průměry (sloupce) a směrodatné odchylky (chybové úsečky) (n≥3).



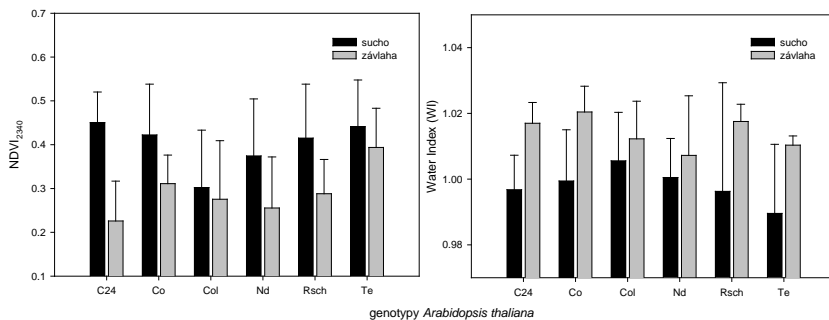
Obr. 2 Příklady rozdílné teploty listů u suché a zavlažované varianty u dvou genotypů Arabidopsis thaliana. Snímky byly pořízeny termální kamerou Flir řady SC. Světlé barvy (oranžová až bílá) reprezentují vyšší teplotu listu zatímco tmavé barvy (modrá až černá) představují nižší teplotu listu.



Obr. 3 Vliv stresu sucha na teplotu listů u jednotlivých genotypů *Arabidopsis thaliana*. Měření bylo provedeno 14 dní po začátku indukce sucha pomocí termální kamery Flir řady SC. V grafu jsou znázorněny průměry (sloupce) a směrodatné odchylky (chybové úsečky) ($n \geq 3$).



Obr. 3 Vliv stresu sucha na vybrané vegetační indexy NDVI₁₃₄₀ a Water Index (WI) u jednotlivých genotypů *Arabidopsis thaliana*. Měření bylo provedeno 14 dní po začátku indukce sucha pomocí spektrometru FieldSpec 3. V grafu jsou znázorněny průměry (sloupce) a směrodatné odchylky (chybové úsečky) ($n \geq 3$).



ZÁVĚRY

V rámci experimentu bylo potvrzeno, že metodiky založené na spektrální odrazivosti a termálním zobrazování jsou využitelné pro včasnou diagnostiku stresu sucha.

Vybrané vegetační indexy NDVI₂₃₄₀ a WI, jakož i teplotní difference mezi suchou a zavlažovanou variantou jsou schopné odlišit rozdíly v reakci jednotlivých genotypů.

Pro spolehlivou interpretaci jednotlivých parametrů budou ovšem nezbytné doplňující experimenty, které umožní korelovat data s přímými parametry charakterizujícími odezvu na stres sucha jako je vodní potenciál listu, či stomatální vodivost.

LITERATURA

Collard, B.C.Y., Mackill, D.J. (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363, 557 -572.

Montes, J.M., Melchinger, A.E., Reif, J.C. (2007) Novel throughput phenotyping platforms in plant genetic studies. *Trends in Plant Science*, 12, 433-436.

Munns, R., James, R.A., Sirault, X.R.R., Furbank, R.T., Jones, H.G. (2010) New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *Journal of Experimental Botany*, 61, 3499-3507

Jansen M, Gilmer F, Biskup B, Nagel KA, Rascher U, Fischbach A, Briem S, Dreissen G, Tittmann S, Braun S, De Jaeger I, Metzclaff M, Schurr U, Schar H, Walter A (2009) Simultaneous phenotyping of leaf growth and chlorophyll fluorescence via GROWSCREEN FLUORO allows detection of stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* and other rosette plants. *Functional Plant Biology*, 36, 902–914.