

**ZMIANY POZIOMU PROLINY W LIŚCIACH
MALINY CZERWONEJ (*RUBUS IDAEUS* L.)
W WARUNKACH STYMULOWANEGO STRESU SUSZY**

CHANGES IN THE PROLINE LEVEL
IN RED RASPBERRY (*RUBUS IDAEUS* L.) LEAVES UNDER
CONDITIONS OF DROUGHT STRESS STIMULATED

Danuta Kucharska, Teresa Orlikowska, Robert Maciorowski

Instytut Ogrodnictwa
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice
e-mail: danuta.kucharska@inhort.pl

Abstract

The effect of water deficiency *in vitro* and in a greenhouse on the concentration of free proline in the leaves of explants and raspberry plants of the ‘Canby’ and ‘Polka’ cultivars was examined. The purpose of this work was to determine whether proline may be a marker of drought stress and whether its application to the *in vitro* medium or foliarly on plants in the greenhouse will increase the concentration of endogenous free proline. In *in vitro* cultures, polyethylene glycol (PEG) and/or L-proline was added to media with different growth regulators, and the plants in the greenhouse were sprayed with L-proline. The concentration of free proline in the leaves was determined at different stress period. The addition of PEG and L-proline to the medium increased the concentration of free proline in the leaves in proportion to the concentration in the medium of these compounds and depending on the composition of growth regulators in the medium. The highest proline concentration was found in the leaves from medium without growth regulators, and the lowest in leaves from medium with IBA. Stress marker was not revealed on this medium. The concentration of free proline in the leaves of plants growing in the greenhouse increased many times due to the lack of water. Also spraying plants with L-proline increased the concentration of free proline in the leaves. The proline concentration in the leaves may be a marker of the raspberry reaction to water scarcity, both in *in vitro* shoot tests on medium without growth regulators, and in greenhouse tests.

Key words: polyethylene glycol (PEG), *in vitro*, raspberry, proline, drought stress

WSTĘP

Malina jest jedną z ważniejszych roślin jagodowych w polskim ogrodnictwie. Jest uprawiana na dużą skalę ze względu na wartości odżywcze, dietetyczne i lecznicze. Krzewy malin są bardzo wrażliwe na niedobór wody, co wynika z płytkiego systemu korzeniowego (Morales i in. 2013). Według tych autorów deficyt wody obniżał plonowanie w bieżącym i następnym roku odmian owocujących na pędach 2-letnich i przyspieszał wchodzenie w okres

spoczynku roślin odmian powtarzających. Szczególne zapotrzebowanie na wodę występuje w czasie owocowania. W warunkach klimatu umiarkowanego rośliny narażone są na niedobory wody i okresowy stres suszy wynikające z niekorzystnego rozkładu opadów w czasie sezonu wegetacyjnego. Pierwotny czynnik stresowy, jakim jest susza, wywołuje stres osmotyczny, który może powodować nieodwracalne zmiany na poziomie subkomórkowym. Odpowiedzią obronną roślin na stres osmotyczny jest zwiększona produkcja i akumulacja osmoprotektantów (Karolewski 1996; Chołuj i in. 2008). Związki te nie są toksyczne w wyższych stężeniach, powodują jedynie obniżenie potencjału wody, zapobiegając jej wypływowi z komórki. Jednym z osmoprotektantów jest prolina, której zmiany ilościowe, w wyniku odpowiedzi rośliny na czynniki stresowe, od szeregu lat są przedmiotem badań (Karolewski 1996). Choć prolina jest wskaźnikiem niespecyficznym, wytwarzanym i akumulowanym przez rośliny pod wpływem stresów różnego pochodzenia, to jej stężenie może być wskaźnikiem dla oceny reakcji roślin na kontrolowany czynnik stresowy. Zdolność do produkcji proliny jest uwarunkowana genetycznie i skorelowana z tolerancją suszy i zasolenia (Georgieva i in. 2004; Chaitanya i in. 2009; Mafakheri i in. 2010; Morales i in. 2013). W związku z powyższym czynione były próby, aby egzogenne zastosowanie proliny wykorzystać do zwiększenia odporności na suszę i zasolenie (Roy i in. 1993; Gadallah 1999; Heuer 2003; Ali i in. 2008; Athar i in. 2009; Huang i in. 2009; Dawood i in. 2014). W Polsce, podobnie jak w innych krajach naszej strefy klimatycznej, występują długotrwałe okresy suszy glebowej, które hamują wzrost i obniżają plonowanie maliny.

Celem niniejszych badań było poznanie reakcji dwóch odmian maliny czerwonej na stres spowodowany deficytem wody w warunkach *in vitro* i w szklarni, wyrażonej przez zmiany stężenia proliny w liściach oraz stwierdzenie, czy poziom proliny może być markerem reakcji maliny na stres. Badano także wpływ egzogenne podanej proliny, do pożywki oraz na liście roślin w szklarni w formie oprysku, na jej stężenie w liściach, w celu uzyskania informacji na temat możliwości regulowania skutków stresu wodnego.

MATERIAŁY I METODY

Doświadczenia w warunkach *in vitro*

Przedmiotem badań były pędy z ustalonej kultury *in vitro* dwóch odmian maliny – ‘Canby’ (owocująca na pędach 2-letnich) i ‘Polka’ (powtarzająca). Namnażanie pędów do doświadczeń wykonywano na pożywce zawierającej sole mineralne według Murashige i Skoog (1962) (MS), $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ sacharozy, witaminy (Woody Plant Medium – WPM) (Lloyd i McCown 1980), $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ chelatu żelaza (FeEDDHA), agar Plant $5,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz $0,8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP i $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ kwasu indolilo-3-octowego (IAA). Ukorzenie prowadzono na pożywce agarowej o zmniejszonym o $\frac{1}{2}$ stężeniu soli

MS, zawierającej witaminy WPM, z dodatkiem $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ kwasu indolilo-3-masłowego (IBA). Wykonano 3 doświadczenia w warunkach *in vitro*.

Doświadczenie 1

Badano wpływ glikolu polietylowego 6000 (PEG) w stężeniach 0, 0,5, 1 i $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ dodanego do pożywek w celu symulowania warunków suszy. Jedna pożywka nie zawierała regulatorów wzrostu, do drugiej dodano BAP i IAA. Reakcję na stres suszy mierzono przez oznaczanie stężenia wolnej proliny w liściach mikropędów przez 4 tygodnie, co 7 dni. Zawartość proliny oznaczano w reakcji ninhydrynowej, według metody Bates i in. (1973). W tym celu ucierano 0,5 g liści dodając 10 ml 3% kwasu 5-sulfosalicylowego, następnie homogenat filtrowano przez bibułę Whatman nr 2. Do 2 ml filtratu dodawano 2 ml kwasu ninhydrynowego i 2 ml kwasu octowego lodowatego. Mieszaninę inkubowano w bloku termicznym w temperaturze $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 1 h, a następnie chłodzono na lodzie. Do chłodnej mieszaniny reakcyjnej dodawano 4 ml toluenu i intensywnie mieszano przez worteckowanie przez 15 sek. Z górnej warstwy mieszaniny pobierano 1 ml i mierzono ekstynkcję przy długości fali 520 nm. Jako próbę 0 używano toluenu. Zawartość proliny (w $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ świeżej masy) obliczano z krzywej regresji wyznaczonej na podstawie standardu.

Doświadczenie 2

Badano wpływ dodatku L-proliny do pożywki na stężenie wolnej proliny w liściach. Zastosowano 4 stężenia proliny: 0, 115,1; 230,2 i $345,3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ (0, 1, 2 i 3 mM). Prolinę dodawano do pożywki bez regulatorów wzrostu, do pożywki do namnażania pędów z dodatkiem BAP i IAA oraz do ukorzenia z dodatkiem IBA. Stężenie wolnej proliny w liściach oznaczano po 4 tygodniach. Oceniano wpływ proliny na ukorzenie pędów oraz na parametry wzrostu mikro roślin posadzonych w szklarni.

Doświadczenie 3

Badano akumulację wolnej proliny w liściach eksplantatów pędowych rosnących przez 4 tygodnie na pożywkach bez regulatorów, z dodatkiem $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ PEG lub 2 mM proliny oddzielnie oraz łącznie. W szklarni po 2 miesiącach od posadzenia oceniano także wpływ wymienionych związków dodanych do pożywki na ukorzenie oraz na wysokość pędu, liczbę liści, suchą masę oraz zawartość chlorofilu (Chlorofil Content Meter CCM-200 Opti-Sciences).

Doświadczenia szklarniowe

Doświadczenie 1

Oceniano wpływ przesuszenia roślin maliny na stężenie proliny w liściach młodych (pierwszy dobrze ukształtowany liść, zazwyczaj drugi od wierzchołka) i starszych (5-6 od wierzchołka). Doświadczenie wykonano po 4 miesiącach od posadzenia roślin w szklarni. Rośliny rosły w doniczkach

o pojemności 1 dm³ wypełnionych podłożem z przewagą substratu torfowego. Część roślin podlewano codziennie do pełnej pojemności wodnej, część nie była podlewana przez 3 dni. Temperatura w szklarni wahała się od 16 °C w nocy do 25 °C w dzień. Liście z 5 roślin pobierano do analizy po 3 dniach od zaprzestania podlewania. W kombinacji było 5 roślin.

Doświadczenie 2

Na roślinach w tym samym wieku i prowadzonych w podobny sposób, oceniano wpływ L-proliny zastosowanej w formie opryskiwania w stężeniach 1, 3 i 6 mM, dwukrotnie co 10 dni na rośliny nawadniane i nienawadniane. Ocenę stężenia wolnej proliny wykonano na liściach z 3 roślin, pobranych po 10 dniach od drugiego oprysku.

Analiza statystyczna

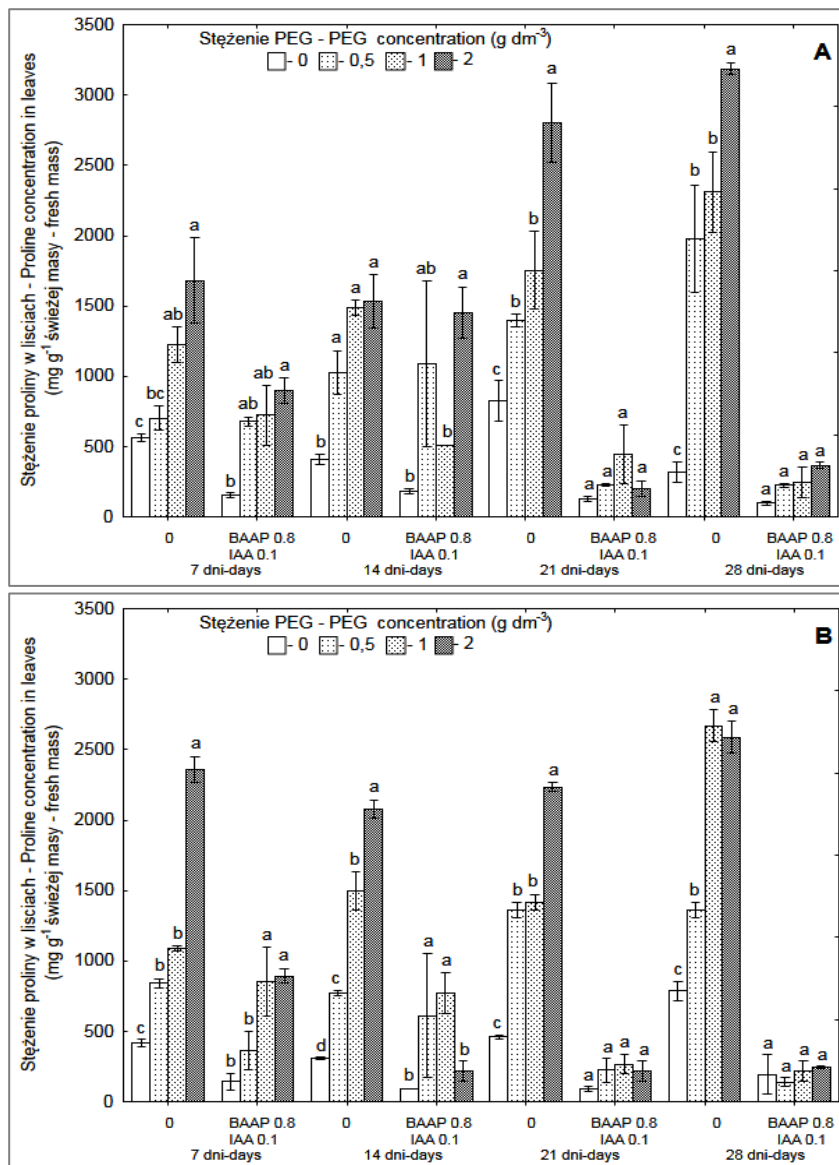
Doświadczenie I w kulturach *in vitro* było analizowane w modelu potwarzanych pomiarów, natomiast wyniki pozostałych doświadczeń w modelach jedno- i dwuczynnikowych kompletnie losowych. Po zastosowaniu analizy wariancji dla istotnych efektów porównania wielokrotne średnich wykonano według procedury Duncana przy $p = 0,05$. Wszystkie analizy wykonano oddzielnie dla każdej odmiany ze względu na fakt, że a priori zróżnicowane wzrostowo odmiany dobrane zostały do doświadczeń. Obliczenia wykonano w pakiecie statystycznym Statistica v. 13 (Dell 2016).

WYNIKI

Doświadczenia w warunkach *in vitro*

Doświadczenie 1

Wszystkie czynniki: stężenie PEG, obecność regulatorów wzrostu w pożywce oraz długość okresu stresowania wykazały istotny wpływ na stężenie proliny w odmianie ‘Polka’. Istotne znaczenie miały także interakcje pomiędzy badanymi czynnikami. W odniesieniu do odmiany ‘Canby’ nie stwierdzono istotnego wpływu długości trwania stresu ani istotnej interakcji stężenia PEG i długości trwania stresu (tab. 1). Stężenie wolnej proliny w liściach maliny obydwu odmian było wyższe w pędach rosnących na pożywce bez regulatorów wzrostu niż z pędów rosnących na pożywce z regulatorami, przy każdej długości trwania stresu i niezależnie od obecności i stężenia PEG, z wyjątkiem długości stresu 14 dni (rys. 1 A, B). Szczególnie duże różnice wystąpiły po 21 i 28 dniach stresu, kiedy na pożywce z regulatorami wzrostu nastąpiło kilkakrotne obniżenie stężenia proliny. Na pożywce bez regulatorów wzrostu stężenie proliny u obydwu odmian wzrastało wraz z czasem i stężeniem PEG. W pożywce z regulatorami wzrostu stężenie proliny w liściach także zwiększało się wraz ze wzrostem stężenia PEG, z wyjątkiem trwania stresu przez 14 dni przy stężeniu 1 g·dm⁻³ u odmiany ‘Canby’ i 2 g·dm⁻³ u odmiany ‘Polka’. W próbach badanych po 21 i 28 dniach stężenie proliny w liściach nie zwiększało się w reakcji na obecność PEG w pożywce.



Rys. 1. Wpływ PEG i regulatorów wzrostu w pożywce na stężenie wolnej proliny w liściach eksplantatów pędowych maliny odmiany 'Canby' (A) i 'Polka' (B) w zależności od terminu analizy. Pionowe kreski prezentują wartości błędów standardowych. Średnie oznaczone tą samą literą dla danego terminu pomiaru i regulatora wzrostu nie różnią się istotnie według testu Duncana przy $p = 0,05$

Fig. 1. The effect of PEG and growth regulators in the medium on the concentration of free proline in the leaves of raspberry explants of 'Canby' (A) and 'Polka' (B), depending on the time of analysis. The vertical bars present standard error. Averages marked with the same letter for a given measurement date and growth regulator do not differ significantly according to Duncan's test at $p = 0.05$

Tabela 1. Syntetyczne wyniki analizy wariancji w układzie powtarzanych pomiarów wpływu glikolu polietylenowego (PEG), regulatorów wzrostu w pożywce (Reg) i terminu analizy (Ter) na stężenie proliny w liściach kultur pędowych *in vitro*

Table 1. Synthetic results of the analysis of variance in a system of repeated measurements of the effect of PEG, growth regulators in the medium and the term of analysis on the concentration of free proline in the raspberry leaves of *in vitro* shoot cultures

Źródło zmienności Source of variation	Df	F	
		'Polka'	'Canby'
PEG	3	167,9***	48,8***
Regulatory wzrostu w pożywce; Regulators in the medium (Reg)	1	878,6***	193,1***
PEG × Reg	3	89,7***	13,9***
Terminy analizy; The term of analysis (Ter)	3	11,1***	1,8 ns
PEG × Ter	9	6,3***	0,9 ns
Reg × Ter	3	49,1***	20,1***
PEG × Reg × Ter	9	8,3***	3,5**

*** p < 0,001; ** p < 0,01; ns – p > 0,05; F – statystyka testu Fishera; Fisher's statistic

Doświadczenie 2

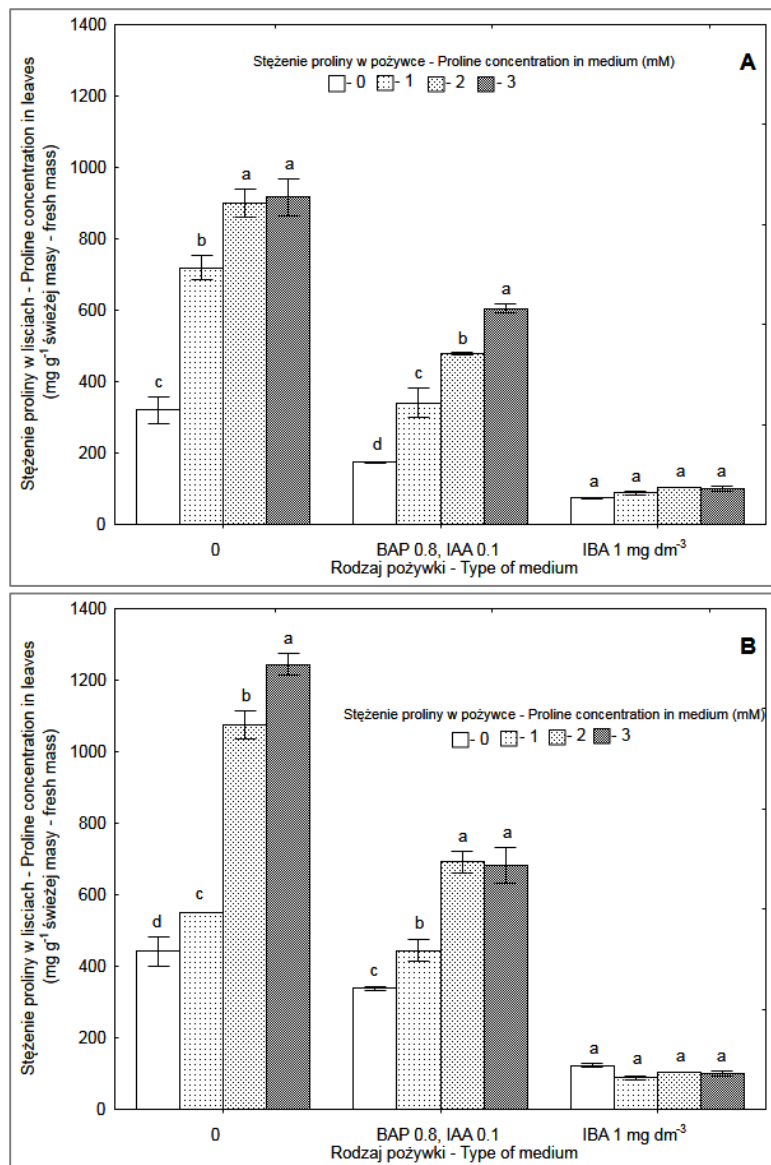
Wszystkie badane czynniki miały istotny wpływ na stężenie proliny w liściach. Istotna była także interakcja pomiędzy rodzajem pożywki i stężeniem proliny (tab. 2). Najwięcej proliny akumulowały liście z pożywki bez regulatorów wzrostu, znacznie mniej z pożywki z dodatkiem BAP i IAA (do namnażania pędów), a najmniej z pożywki z dodatkiem IBA (do ukorzenia) (rys. 2 A, B). Stężenie proliny w liściach rosło wraz z jej stężeniem w pożywce w kombinacjach bez regulatorów wzrostu i z dodatkiem BAP i IAA. Takiej zależności nie stwierdzono w liściach pobranych z pędów rosnących na pożywce z dodatkiem IBA. Stężenie proliny w liściach z pożywek bez dodatku proliny było najniższe z pożywki z auksyną, a najwyższe z pożywki bez regulatorów wzrostu.

Tabela 2. Syntetyczne wyniki analizy wariancji wpływu proliny dodanej do pożywki i regulatorów wzrostu w pożywce na stężenie proliny w liściach kultur pędowych *in vitro*

Table 2. Synthetic results of analysis of the variance of the effect of proline added to the medium and growth regulators in the medium on the proline concentration in raspberry leaves of *in vitro* cultures

Źródło zmienności Source of variation	Df	F	
		'Polka'	'Canby'
Prolina; Proline (Prol)	3	142,9***	101,2***
Regulatory wzrostu w pożywce; Regulators in the medium (Reg)	2	726,5***	535,3***
Prol × Reg	6	54,7***	26,4***

*** – p < 0,001; F – statystyka testu Fishera; Fisher's statistic

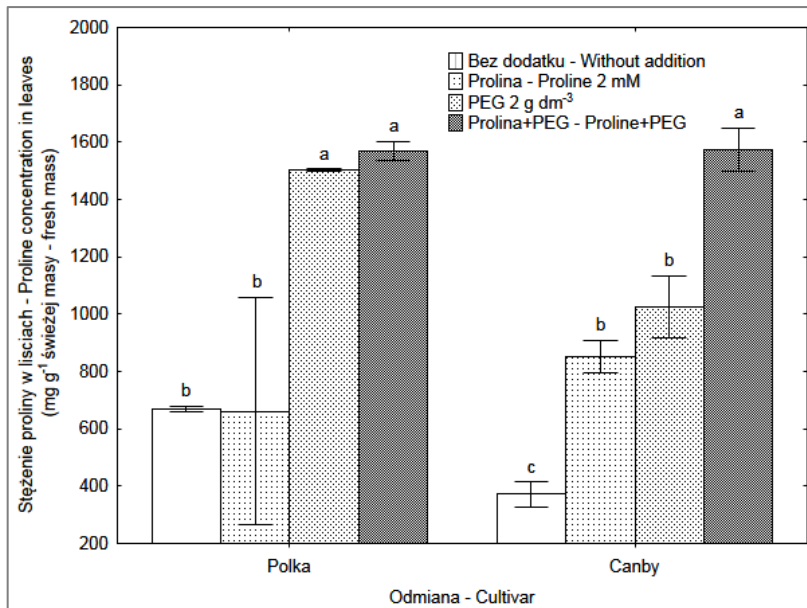


Rys. 2. Wpływ L-proliny i rodzaju regulatorów wzrostu w pożywce na stężenie wolnej proliny w liściach eksplantatów pędowych maliny ‘Canby’ (A) i ‘Polka’ (B) po 4 tygodniach kultury. Pionowe kreski oznaczają wartości błędów standardowych. Średnie oznaczone tą samą literą dla danego regulatora wzrostu nie różnią się istotnie według testu Duncana przy $p = 0,05$

Fig. 2. The effect of L-proline and growth regulators in the medium on the concentration of free proline in the leaves of explants of raspberry ‘Canby’ (A) and ‘Polka’ (B) after 4 weeks of culture. The vertical bars indicate the values of the standard error. Averages marked with the same letter for a given growth regulator do not differ significantly according to Duncan’s test at $p = 0.05$

Doświadczenie 3

Stwierdzono znaczny wzrost stężenia wolnej proliny w liściach maliny odmiany ‘Canby’ rosnących na pożywce z dodatkiem 2 mM L-proliny, natomiast prolina w pożywce nie miała wpływu na stężenie tego związku w liściach odmiany ‘Polka’ (rys. 3). Obecność PEG w pożywce wpływała na zwiększenie stężenia wolnej proliny w liściach, przede wszystkim odmiany ‘Polka’. Najwyższe stężenie stwierdzono w liściach obydwu odmian z pędów rosnących na pożywce z dodatkiem PEG i L-proliny, przy czym u odmiany ‘Polka’ było ono wynikiem wyłącznie obecności PEG. Rośliny z tego doświadczenia posadzono w szklarni. Po wyjęciu ukorzenionych mikropędów z pożywki stwierdzono hamujący wpływ L-proliny w pożywce na ukorzenianie obydwu odmian (tab. 3). Średnia długość korzeni wyrosłych na pożywce z L-proliną wynosiła 0,4 i 0,5 mm, a korzeni z kombinacji kontrolnej – odpowiednio 4,4 dla ‘Canby’ i 7,8 mm dla ‘Polki’. PEG również zmniejszała długość korzeni odpowiednio do 1,6 i 2,6 mm, a na pożywce z proliną i PEG długość korzeni była średnia.



Rys. 3. Wpływ PEG 6000 i L-proliny w pożywce bez regulatorów wzrostu na stężenie wolnej proliny w liściach eksplantatów pędowych maliny ‘Canby’ i ‘Polka’ po 4 tygodniach kultury. Pionowe kreski oznaczają wartości błędów standardowych. Średnie oznaczone tą samą literą dla danej odmiany nie różnią się istotnie według testu Duncana przy $p = 0,05$

Fig. 3. The effect of PEG 6000 and L-proline in the medium without growth regulators on the concentration of free proline in the leaves of raspberry explants ‘Canby’ and ‘Polka’ after 4 weeks of culture. The vertical bars indicate the values of the standard error. Averages marked with the same letter for a given variety do not differ significantly according to the Duncan’s test at $p = 0.05$

Tabela 3. Wpływ dodatku L-proliny i PEG do pożywki na parametry wzrostu, zawartość chlorofilu oraz suchej masy mikrosadzonek po dwóch miesiącach od posadzenia w szklarni

Table 3. Influence of the of L-proline and PEG in the medium on growth parameters, chlorophyll content and dry matter of raspberry microcuttings after two months from planting in a greenhouse

Odm. Culti- var	Pożywka Medium	Dł. korzeni przed sadzeniem Root length before planting (cm)	Po 2 miesiącach wzrostu w szklarni After 2 months of growth in the glasshouse			
			Wys. pędu Stem length (cm)	Liczba liści No. of leaves	Zawartość chlorofilu Chlorophyll content	Sucha masa Dry matter (%)
'Canby'	Kontrola; control	4,4*±0,6 a	15,9±0,7 a	13,2±0,7 a	18,9±0,6 a	20,7±0,6 a
	Prolina 3 mM	0,4±0,04 c	15,2±2,1 a	11,4±0,7 ab	16,7±0,8 a	17,0±1,5 ab
	PEG 2 g·dm ⁻³	1,6±0,4 b	16,9±1,3 a	11,2±0,6 ab	16,7±0,8 a	17,3±1,5 ab
	PEG 2 g·dm ⁻³ + prolina 3 mM	0,6±0,04 bc	14,1±2,0 a	9,4±0,8 b	17,0±0,8 a	15,0±1,3 b
'Polka'	Kontrola; control	7,8±0,6 a	24,6±1,0 a	14,4±1,0 a	15,7±0,6 a	18,9±0,6 a
	Prolina 3 mM	0,5±0,0 c	23,5±1,7 ab	11,6±0,7 b	10,7±0,6 b	16,5±1,1 ab
	PEG 2 g·dm ⁻³	2,6±1,1 b	18,4±2,2 c	9,2±0,4 c	11,2±0,5 b	14,4±0,7 bc
	PEG 2 g·dm ⁻³ + prolina 3 mM	1,4±0,2 bc	19,0±0,9 bc	9,0±0,3 c	10,2±0,5 b	13,6±0,9 c

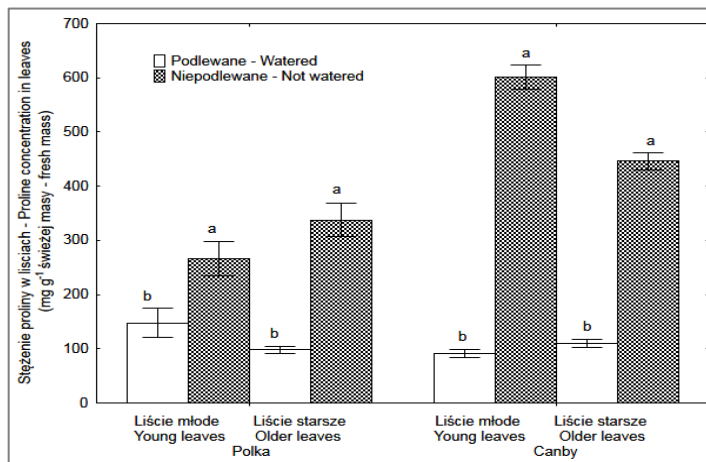
* średnie ±SE oznaczone w kolumnie tą samą literą dla każdej odmiany nie różnią się istotnie według testu Duncana przy p = 0,05; means ±SE in columns followed by the same letter do not differ significantly for each cultivar at p = 0.05 according to Duncan's test

Ocena roślin po 2 miesiącach wykazała brak istotnych różnic w wysokości pędów odmiany 'Canby', natomiast rośliny odmiany 'Polka' ukorzenione na pożywce zawierającej PEG miały istotnie krótsze pędy niż w kontroli. Najwięcej liści wytworzyły rośliny odmiany 'Canby' ukorzenione na pożywce bez dodatku PEG i proliny, a istotnie mniej rośliny ukorzenione na pożywce z dodatkiem obydwu substancji. Podobnie u odmiany 'Polka', najwięcej liści wytworzyły rośliny z pożywki kontrolnej, a dodatek PEG i proliny w pożywce do ukorzeniania wpływał na obniżenie liczby liści. Najwięcej chlorofilu stwierdzono w liściach obu odmian z pożywki kontrolnej, jednak tylko u roślin odmiany 'Polka' ukorzenianych na pożywkach z ww. dodatkami różnice były istotne. Podobna tendencja została stwierdzona w zawartości suchej masy w liściach. Największą procentową zawartość suchej masy stwierdzono w liściach pędów ukorzenionych na pożywce kontrolnej, a najmniejszą na pożywce z obydwoima dodatkami.

Doświadczenia szklarniowe

Doświadczenie 1

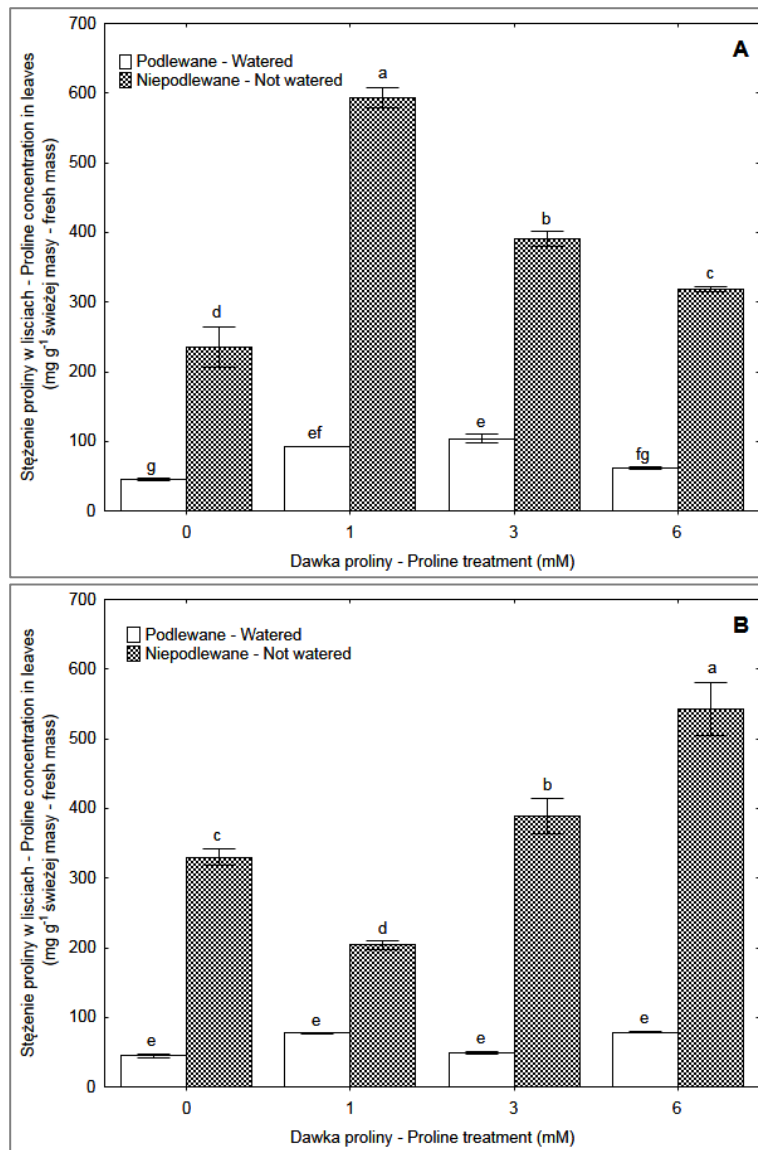
Górne liście roślin niepodlewanych więdły po 3 dniach, ale po podlaniu turgor powracał. Krótkotrwała susza (3 dni bez podlewania) spowodowała 2- i 3-krotne zwiększenie stężenia proliny w liściach roślin odmiany ‘Polka’, zarówno młodych, jak i starszych (rys. 4). W liściach roślin odmiany ‘Canby’ zwiększenie stężenia proliny pod wpływem niedostatku wody było 6- i 5-krotne w porównaniu do stężenia proliny w liściach roślin podlewanych.



Rys. 4. Wpływ niedoboru wody na stężenie wolnej proliny w liściach roślin maliny ‘Canby’ i ‘Polka’ rosnących w szklarni, podlewanych i niepodlewanych przez 3 dni, po 3 dniach od zaprzestania podlewania. Pionowe kreski oznaczają wartości błędów standardowych. Średnie oznaczone tą samą literą dla danej odmiany nie różnią się istotnie według testu Duncana przy $p = 0,05$ Fig. 4. The effect of water deficiency on the concentration of free proline in the leaves of raspberry ‘Canby’ and ‘Polka’ plants growing in the greenhouse, watered and not treated for 3 days, after 3 days from cessation of watering. The vertical bars indicate the values of the standard error. Averages marked with the same letter for a given variety do not differ significantly according to the Duncan’s test at $p = 0.05$

Doświadczenie 2

Opryskiwanie roślin roztworami L-proliny w stężeniach: 1, 3 i 6 mM miało istotny wpływ na stężenie proliny w liściach podlewanych roślin ‘Canby’, natomiast nie wpływało na stężenie proliny w liściach podlewanych roślin odmiany ‘Polka’ (rys. 5 A i B). Stężenie proliny w liściach niepodlewanych roślin ‘Canby’ było większe około 5 razy w przypadku opryskiwania wodą, a po opryskiwaniu prolina wzrosło od 12 do 7 razy, w zależności od stężenia proliny, a największe po opryskiwaniu prolina w stężeniu 1 mM. Zwiększenie stężenia proliny w liściach roślin niepodlewanych i opryskiwanych prolina było od 5 do 12 razy większe, w zależności od stężenia proliny, a największe w opryskiwanych prolina w stężeniu 6 mM.



Rys. 5. Wpływ L-proliny zastosowanej 2-krotnie dolistnie na stężenie wolnej proliny w liściach roślin maliny odmiany 'Canby' (A) i 'Polka' (B) rosnących w szklarni, podlewanych i niepodlewanych, po 10 dniach od drugiej aplikacji. Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie według testu Duncana przy $p = 0,05$

Fig. 5. Effect of L-proline applied 2-fold foliar on the concentration of free proline in the leaves of raspberry 'Canby' (A) and 'Polka' (B) plants growing in the greenhouse, watered and not watered, after 10 days from the second application. The vertical bars indicate the values of the standard error. The means marked with the same letter do not differ significantly according to the Duncan's test at $p = 0.05$

DYSKUSJA

Czynniki stresowe, takie jak susza czy zasolenie, wywołują stres osmotyczny, powodując denaturację białek oraz zaburzenie równowagi jonowej. Jedną z reakcji roślin na stres osmotyczny jest zwiększone wytwarzanie i gromadzenie substancji o charakterze osmoprotektantów, które wspierają adaptację rośliny do warunków stresowych przez obniżenie potencjału osmotycznego, co zapobiega wypływowi wody z komórki. Do nich należy m.in. prolina. Aminokwas ten występuje powszechnie u roślin wyższych i zwykle w odpowiedzi na stesy środowiskowe gromadzi się w dużych ilościach, przede wszystkim w liściach, szczególnie młodych (Amberger-Ochsenbauer i Obendorfer 1988; Ali i in. 2008; Öztürk i Demir 2002; Hsu i in. 2003; Kavi Kishor i in. 2005). Oprócz pełnienia roli regulatora ciśnienia osmotycznego prolina przyczynia się do ustabilizowania błon komórkowych i białek, usuwa wolne rodniki i pełni rolę bufora komórkowego potencjału redoks w warunkach stresu. Jest także źródłem energii oraz rezerwuarem węgla i azotu, co umożliwia szybką regenerację po ustąpieniu stresu (Karolewski 1996; Verbruggen i Hermans 2008). Zawartość proliny w roślinach zależy od wielu czynników, takich jak: wiek, stadium rozwojowe, organ, genotyp, a także od rodzaju i nasilenia niekorzystnych czynników środowiskowych. Wyżej wymienione właściwości sprawiają, że prolina może być jednym z markerów odpowiedzi roślin na stres. Z racji swej niespecyficzności ma szczególne zastosowanie w doświadczeniach, gdzie można zastosować kontrolę zmiennych. Niektóre doświadczenia nad stresem suszy prowadzono w kulturach *in vitro*, gdzie w stałych warunkach temperatury, oświetlenia, wilgotności i składu pożywki łatwiej można ocenić wpływ danego czynnika na produkcję proliny. Stres niedostatku wody w warunkach *in vitro* może być indukowany m.in. przez włączenie do pożywki glikolu polietylenowego (PEG), który w wersji 6000 nie jest przyswajany przez rośliny (Georgieva i in. 2004; Orlikowska i in. 2009) lub mannitolu (Watanabe i in. 2000). Wpływ PEG 6000 na kultury proliferacyjne pięciu genotypów *Rubus* był przedstawiony w pracy Orlikowskiej i in. (2009). Wszystkie odmiany reagowały na dodatek PEG do pożywki zmniejszeniem liczby pędów bocznych i zwiększeniem stężenia wolnej proliny w liściach, a siła reakcji zależała od stężenia PEG w pożywce, czasu oddziaływania i genotypu. Także w omawianych badaniach czynnikiem stymulującym wzrost stężenia wolnej proliny w liściach maliny *in vitro* był stres indukowany obecnością PEG 6000. Natężenie reakcji na stres zależało w bardzo dużym stopniu od składu pożywki. Najsilniej stres wystąpił w pędach rosnących na pożywce bez regulatorów wzrostu, w mniejszym stopniu w pędach rosnących na pożywce z BAP i IAA, a najslabiej na pożywce z dodatkiem auksyny. L-prolina dodana do pożywki zwiększała także stężenie tego związku w liściach, co mogłoby oznaczać, że była z pożywki pobierana przez pędy lub jej produkcja w liściach jest stymulowana obecnością proliny w pożywce albo

była czynnikiem wpływającym na zmianę potencjału osmotycznego pożywki. Podobnie jak w doświadczeniach z PEG większe stężenie wolnej proliny obserwowano w liściach roślin z pożywki bez regulatorów wzrostu. Bardzo małe stężenie wolnej proliny w liściach roślin z pożywki zawierającej IBA, zarówno w kombinacji kontrolnej, jak i w kombinacjach z dodatkiem PEG i L-proliny należy wiązać z obecnością w pożywce auksyny lub z pojawieniem się korzeni, ponieważ ocena stężenia proliny była wykonana po 4 tygodniach, gdy zaczątki korzeni były widoczne. Być może korzenie, nawet krótkie, zwiększyły możliwość pobierania wody z pożywki, co znosiło warunki stresowe. Obecność BAP w pożywce mogła wpływać na zmniejszenie reakcji stresowych związanych z mniejszą możliwością pobierania wody przez pędy (Pospíšilová i in. 2008). Badania Shi i in. (2014) prowadzone na roślinach *Arabidopsis* wykazały, że IAA podana dolistnie zwiększała odporność na stres suszy, jednak ta odpowiedź nie była testowana przy stosowaniu różnych stężeń wolnej proliny. Prolina dodana do pożywki w ilości 3 mM powodowała redukcję długości korzeni do 0,2 mm, jednakże tak krótkie korzenie w czasie sadzenia w szklarni nie hamowały wzrostu roślin. De Klerk (2002) podkreślał pozytywny wpływ dodatku proliny (1 mM) do pożywki do ukorzeniania na aklimatyzację mikrosadzonek jabłoni do warunków szklarni, co można wiązać z lepszą tolerancją na stres, który rośliny dotyka w czasie zmiany środowiska życiowego. Wpływ proliny na ukorzenianie *in vitro* jest kontrowersyjny. Według Orlikowskiej (1988) 200 mg·dm⁻³ proliny zwiększało liczbę ukorzenionych pędów i korzeni oraz ograniczało kalusowanie podstawy pędu podkładki gruszy – pigwy S1. Jednak w doświadczeniach nad ukorzenianiem podkładek jabłoni, prolina w pożywce w stężeniu 200 mg·dm⁻³ ograniczała długość korzeni podkładki P60 (Orlikowska 1991) oraz zmniejszała liczbę korzeni podkładki P2 (Orlikowska 1992). Naturalną konsekwencją związku wzrostu stężenia proliny w roślinach ze zwiększoną tolerancją na stresse osmotyczne było sprawdzenie, czy podana egzogenne prolina (dokorzeniowo lub dolistnie) także spowoduje zwiększenie tolerancji na stresse. Doświadczenia z zastosowaniem proliny prowadzono na szeregu roślin. Roy i in. (1993) dodawali prolinę do pożywki, w której uprawiano ryż stresowany dodatkiem NaCl w celu poznania możliwości zwiększenia odporności na zasolenie. Stwierdzono, że dodatek proliny w stężeniu 30 mM znosił stres solny i toksyczny efekt NaCl, co sugeruje możliwość zastosowania jej w praktyce. Ali i in. (2008) opryskiwali rośliny kukurydzy proliną i stwierdzili, że w stężeniu 30 mM przeciwdziałała ona szkodliwemu działaniu stresu wodnego na pobieranie składników mineralnych. Dawood i in. (2014) stwierdzili, że dolistna aplikacja proliny w stężeniu 25 mM minimalizowała szkodliwy wpływ zasolenia, poprawiając parametry wzrostu, ilość chlorofilu, zasobność w składniki mineralne i zmniejszenie ilości jonów Na⁺ i Cl⁻ w roślinach *Vicia*

faba. W doświadczeniach z tym samym gatunkiem Gadallah (1999) obserwował redukcję uszkodzenia błon komórkowych i większe pobieranie jonów K^+ . Athar i in. (2009) donosili o korzystnym wpływie proliny w stężeniach 1 i 5 mM na kiełkowanie rzepaku w zasolonym środowisku. Podobne wyniki otrzymał Heuer (2003) w doświadczeniach z młodymi roślinami pomidora. Kumar i in. (2010) z pozytywnym skutkiem stosowali zanurzanie pędów róży w roztworze proliny w celu przedłużenia żywotności kwiatów ciętych. Przy stężeniu 5 mM wartość ozdoba była wydłużona o 3 dni. W naszych wstępnych doświadczeniach potwierdziliśmy, że zastosowanie krótkotrwałego stresu wodnego stymuluje produkcję proliny w liściach maliny rosnących w szklarni, a oprysk prolina, podobnie jak jej obecność w warunkach *in vitro* zwiększa jej stężenie w liściach. Jednakże wpływ zewnętrznego podania proliny na wzrost i kondycję roślin maliny rosnących w warunkach stresu należy zbadać w doświadczeniu długoterminowym.

WNIOSKI

1. Dodatek PEG i L-proliny do pożywki wpływał na zwiększenie stężenia wolnej proliny w liściach obu odmian w kulturach pędowych *in vitro*. Przy równoczesnym podaniu efekty nie sumowały się.
2. Najwięcej wolnej proliny akumulowały liście z pożywki nie zawierającej regulatorów wzrostu, następnie liście z mikropędów rosnących na pożywce z BAP i IBA, a najmniej na pożywce z dodatkiem IBA. Ta tendencja nie była zależna od obecności PEG ani L-proliny.
3. Obecność L-proliny w pożywce bez regulatorów wzrostu hamowała wzrost korzeni. Dodatek L-proliny i PEG rozdzielnie i łącznie wpływał następczo na wzrost roślin w szklarni, powodując zmniejszenie liczby liści, stężenia chlorofilu i udziału suchej masy.
4. Obniżenie stopnia nawodnienia podłoża w szklarni do etapu wędnięcia najmłodszych liści, powodowało wielokrotny wzrost stężenia proliny w liściach obu odmian.
5. Zastosowanie oprysku roślin prolina zwiększało stężenie proliny w liściach roślin, szczególnie roślin stresowanych niedostatkami wody.
6. Stężenie proliny w liściach maliny może być markerem reakcji na niedostatek wody, zarówno w testach na pędach w warunkach *in vitro* na pożywce bez regulatorów wzrostu, a także w testach szklarniowych.

Literatura

- Ali Q., Ashraf M., Shahbaz M., Humera H. 2008. Ameliorating effect of foliar applied proline on nutrient uptake in water stressed maize (*Zea mays* L.) plants. Pakistan Journal of Botany 40: 211–219.

- Amberger-Ochsenbauer S., Obendorfer J. 1988. Levels of free proline in ornamental plants: I. Influence of plant age, leaf age, and leaf region in *Saintpaulia* and *Chrysanthemum*. *Journal of Plant Physiology* 132: 758–761. DOI: 10.1016/s0176-1617(88)80242-6.
- Athar H.U.R., Ashraf M., Wahid A., Jamil A. 2009. Inducing salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.) by exogenous application glycinebetaine and proline: response at the initial growth stages. *Pakistan Journal of Botany* 41: 1311–1319.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205–207. DOI: 10.1007/bf00018060.
- Chaitanya K.V., Rasineni G.K., Reddy A.R. 2009. Biochemical responses to drought stress in mulberry (*Morus alba* L.): evaluation of proline, glycine betaine and abscisic acid accumulation in five cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 437–443. DOI: 10.1007/s11738-008-0251-6.
- Chołuj D., Karwowska R., Ciszewska A., Jasińska M. 2008. Influence of long-term drought stress on osmolyte accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 679–687. DOI: 10.1007/s11738-008-0166-2.
- Dawood M.G., Taie H.A.A., Nassar R.M.A., Abdelhamid M.T., Schmidhalter U. 2014. The changes induced in the physiological, biochemical and anatomical characteristics of *Vicia faba* by the exogenous application of proline under seawater stress. *South African Journal of Botany* 93: 54–63. DOI: 10.1016/j.sajb.2014.03.002.
- De Klerk G.J. 2002. Rooting of microcuttings: theory and practice. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 38: 415–422. DOI: 10.1079/ivp2002335.
- Dell 2016. Statistica (data analysis software system), version 13.
- Gadallah M.A.A. 1999. Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia faba* responses to salt stress. *Biologia Plantarum* 42: 249–257. DOI: 10.1023/a:1002164719609.
- Georgieva M., Djilianov D., Konstantinova T., Parvanova D. 2004. Screening of Bulgarian raspberry cultivars and elites for osmotic tolerance in vitro. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 19: 95–98. DOI: 10.1080/13102818.2004.10817093.
- Heuer B. 2003. Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Science* 165: 693–699. DOI: 10.1016/s0168-9452(03)00222-x.
- Hsu S.Y., Hsu Y.T., Kao C.H. 2003. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. *Biologia Plantarum* 46: 73–78. DOI: 10.1023/a:1022362117395.
- Huang Y., Bie Z., Liu Z., Zhen A., Wang W. 2009. Protective role of proline against salt stress is partially related to the improvement of water status and peroxidase enzyme activity in cucumber. *Soil Science and Plant Nutrition* 55: 698–704. DOI: 10.1111/j.1747-0765.2009.00412.x.
- Karolewski P. 1996. Rola proliny u roślin wyższych w warunkach stresu abiotycznego. *Wiadomości Botaniczne* 40: 67–81.

- Kumar N., Pal M., Singh A., SaiRam R.K., Srivastava G.C. 2010. Exogenous proline alleviates oxidative stress and increase vase life in rose (*Rosa hybrida* L. 'Grand Gala'). *Scientia Horticulturae* 127: 79–85. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.09.009.
- Kavi Kishor P.B., Sangam S., Amrutha R.N., Sri Laxmi P., Naidu K.R., Rao K.R.S.S. i in. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88: 424–438.
- Lloyd G., McCown B. 1980. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society* 30: 421–427.
- Mafakheri A., Siosemardeh A., Bahramnejad B., Struik P.C., Sohrabi E. 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science* 4: 580–585.
- Morales C.G., Pino M.T., del Pozo A. 2013. Phenological and physiological responses to drought stress and subsequent rehydration cycles in two raspberry cultivars. *Scientia Horticulturae* 162: 234–241. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.07.025.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Orlikowska T. 1988. Propagation of quince S1 (*Cydonia oblonga* Mill.) *in vitro*. *Fruit Science Reports* 15(4): 157–165.
- Orlikowska T. 1991. Propagation *in vitro* of P-60 – new Polish clonal apple rootstock. *Fruit Science Reports* 18(1): 1–5.
- Orlikowska T. 1992. Effect of amino acids on rooting of apple dwarf rootstocks *in vitro*. *Biologia Plantarum* 34: 39–44. DOI: 10.1007/bf02925788.
- Orlikowska T., Kucharska D., Horbowicz M. 2009. The reaction of raspberry and blackberry cultivars to drought stress simulated *in vitro* by polyethylene glycol (PEG) 6000. *Acta Horticulturae* 839: 337–342. DOI: 10.17660/actahortic.2009.839.43.
- Öztürk L., Demir Y. 2002. *In vivo* and *in vitro* protective role of proline. *Plant Growth Regulation* 38: 259–264. DOI: 10.1023/a:1021579713832.
- Pospíšilová J., Synková H., Rulcová J. 2008. Cytokinin and water stress. *Biologia Plantarum* 43: 321–328. DOI: 10.1023/a:1026754404857.
- Roy D., Basu N., Bhunia A., Banerjee S.K. 1993. Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt-sensitive cultivar of rice. *Biologia Plantarum* 35: 69–72. DOI: 10.1007/bf02921122.
- Shi H., Chen L., Ye T., Liu X., Ding K., Chan Z. 2014. Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* 82: 209–217. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.06.008.
- Watanabe S., Kojima K., Ide Y., Sasaki S. 2000. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 199–206. DOI: 10.1023/a:1010619503680.
- Verbruggen N., Hermans Ch. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753–759. DOI: 10.1007/s00726-008-0061-6.