

# WPŁYW SUSZY NA KONCENTRACJĘ L-PROLINY W WYBRANYCH ODMIANACH ZIEMNIAKA

dr Krzysztof Treder<sup>1</sup>, mgr inż. Mateusz Mielczarek<sup>1</sup>  
dr inż. Dominika Boguszewska-Mańkowska<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IHAR-PIB Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii

<sup>2</sup> IHAR-PIB, Oddział w Jadwisinie

e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

## Streszczenie

Nadprodukcja proliny jest często obserwowana u roślin doświadczających różnego rodzaju stresów, szczególnie suszy, która wiąże się z obniżeniem turgoru komórek. Oznaczenie koncentracji tego aminokwasu, wraz z innymi parametrami molekularnymi, może umożliwić analizę mechanizmów molekularnych uruchamianych w roślinach w odpowiedzi na stres. Dlatego podjęto prace nad optymalizacją mikropłytkowej metody oznaczania L-proliny pod kątem jej wykorzystania do badania wpływu suszy na zawartość tego aminokwasu w roślinach ziemniaka.

**Słowa kluczowe:** susza, tolerancja odmian ziemniaka na suszę, L-prolina

## Abstract

Overproduction of proline is often observed in plants experiencing a variety of stresses, particularly drought stress, which is associated with lowered cell turgor. Determining the concentration of this amino acid along with other molecular parameters may facilitate analysis of molecular mechanisms activated in plants in response to stress. Therefore, the study has been undertaken on the optimization of the microplate L-proline assay for its use to investigate the effect of drought on the content of this amino acid in potato plants.

**Keywords:** drought, tolerance of potato cultivars to drought, L-proline

Susza jest najważniejszym ze stresów abiotycznych, bowiem ma największy wpływ na plonowanie wszystkich roślin uprawnych. W związku z postępującym globalnym ociepleniem klimatu zaczyna dotyczyć również te regiony naszej planety, gdzie wcześniej występowała sporadycznie. W strefach o klimacie umiarkowanym wzrasta ilość opadów w okresie zimowym przy jednoczesnym ich spadku w sezonie wegetacyjnym (Haverkort, Verhagen 2008). W Polsce od roku 1983 do 2002 lata z optymalnym dla uprawy ziemniaków poziomem opadów wystąpiły tylko pięć razy (za Boguszewska-Mańkowska 2016), a zagrożenie ziemniaków suszą raportowano w okresie 2009-2011 (Boguszewska-Mańkowska 2016).

Współcześnie uprawiane odmiany ziemniaka mają duże wymagania wodne i przez to są bardzo wrażliwe na niedobór wody w glebie. Pomimo to ich zdolność do tolerowania suszy jest bardzo zróżnicowana. Stwarza to możliwość racjonalnego doboru odmian pod względem wysokiej tolerancji na suszę (Boguszewska 2014, Boguszewska-Mańkowska 2016). Jednym z mechanizmów leżących u podstaw zdolności roślin do tolerowania suszy jest akumulacja substancji obniżających ciśnienie osmotyczne (osmoprotektantów), która zapobiega utracie wody z komórki (Boguszewska-Mańkowska 2016). Odmiany ziemniaka dobrze tolerujące suszę charakteryzują się szybką akumulacją L-proliny (Bündig i in. 2017). Dlatego celem pracy była optymalizacja metody oznaczania tego osmoprotektanta i ocena wpływu suszy na jego akumulację w odmianach ziemniaka o zróżnicowanej tolerancji na suszę.

## Materiał i metody

**Optymalizacja warunków ekstrakcji L-proliny.** L-prolinę oznaczano wg Carillo i innych (2008) z modyfikacjami. Liście ziemniaka utarto na proszek w ciekłym azocie. Z proszku

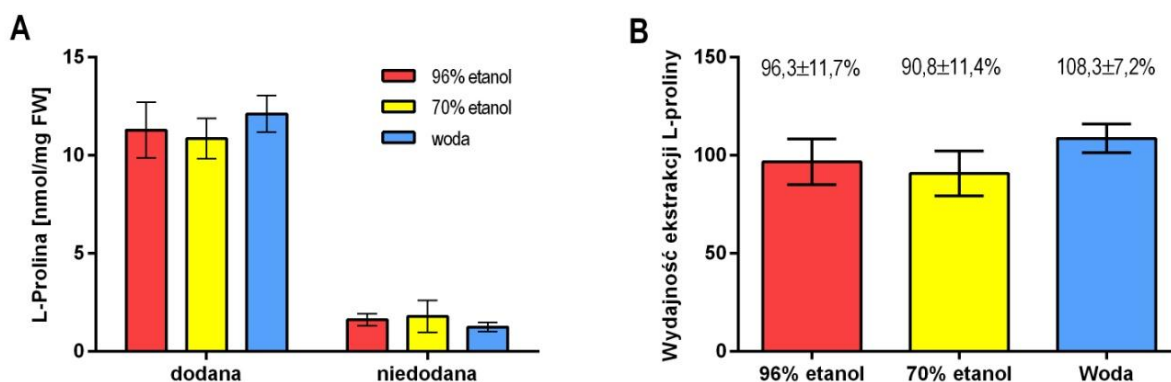
odważono sześć serii prób po 20 mg każda. Każda seria była wykonana w 3 powtórzeniach. Do trzech serii dodano 200 nmoli L-proliny na każde 20 mg tkanki (10 nmoli/mg). Próby zawieszono w 1 ml 96-proc. etanolu lub 1 ml 70-proc. etanolu, lub 1 ml wody. Następnie wytrząsano przez 10 min i inkubowano przez 20 min w 95°C. Po odwirowaniu (14 000xg/4°C/5 min) supernatanty (0,05 ml) przeniesiono do probówek zawierających 0,1 ml roztworu ninhydryny (1-proc. ninhydryna w 60-proc. kwasie octowym i 20-proc. etanolu). Próby inkubowano w 95°C przez 20 min. Po ochłodzeniu oraz odwirowaniu (2500xg/1 min) 0,1 ml supernatantu przeniesiono do studzienek mikro płytki i wykonano pomiar absorbancji w 520 nm.

Koncentrację L-proliny obliczono z krzywej kalibracyjnej, uzyskanej dla wzorcowych roztworów o znanej koncentracji L-proliny. Wydajność ekstrakcji L-proliny obliczono z różnicy koncentracji L-proliny dodanej do badanych prób i oznaczonej po ekstrakcji. Pomiar koncentracji L-proliny wykonano w mikro płytkach, a absorbancję mierzono za pomocą spektrofotometru mikro płytkowego Epoch (BioTek).

**Wpływ suszy na koncentrację L-proliny w liściach ziemniaka.** Do badania odmian zastosowano ekstrakcję wodą. Oznaczono zawartość L-proliny w grupie 6 odmian różniących się podatnością na stres suszy: Gwiazda, Oberon, Cekin, Tajfun, Bogatka, Gawin. Odmiany podzielono na dwie grupy, jedną podlewano, drugą poddano stresowi suszy. Po 20 dniach uprawiania w fitotronie oznaczono w badanych odmianach zawartość proliny. Równolegle te same odmiany badano w doświadczeniu wazonowym, w którym określono wpływ suszy na plon bulw.

## Wyniki i dyskusja

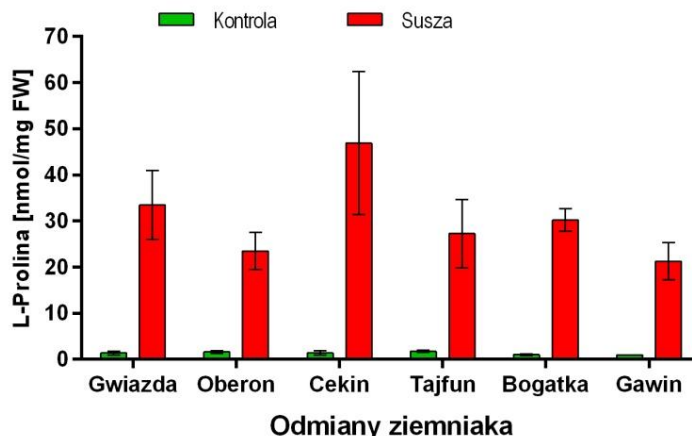
W badaniach wazonowych najmniejszym spadkiem plonu pod wpływem suszy charakteryzowała się odmiana Gwiazda (10%), a największym – Cekin (46%). Niski spadek plonu bulw charakteryzował grupę Bogatka, Tajfun i Satina. Wysoki spadek plonu bulw miały Oberon i Gawin. Wydajność ekstrakcji L-proliny z tkanki ziemniaka była wysoka niezależnie od tego, czy stosowano do ekstrakcji etanol, czy wodę (rys. 1).



Rys. 1. Wydajność ekstrakcji L-proliny z tkanki ziemniaka etanolem w różnym stężeniu i wodą. A – do prób dodawano po 10 nmoli L-proliny na 1 mg świeżej masy (dodana), kontrolę stanowiły próby, do których nie dodawano L-proliny (niedodana). B – wydajność ekstrakcji L-proliny obliczona po odjęciu stężenia L-proliny naturalnie występującej w tkance ziemniaka. Słupki błęd reprezentują odchylenie standardowe

Ekstrakcja etanolem pozwoliła na 90-96-proc. odzysk dodanej do tkanki L-proliny, podczas gdy ekstrakcja wodą umożliwiła całkowite odzyskanie dodanego aminokwasu (rys. 1B). Nieznacznie lepszy wynik uzyskano, stosując wodę. Koncentracja L-proliny w tkance ziemniaka, do której nie dodano L-proliny, wynosiła ok. 1-2 nmoli/mg tkanki (rys. 1A, panel niedodana L-prolina). W próbach, do których dodano 10 nmoli L-proliny na 1 mg tkanki, koncentracja tego aminokwasu mieściła się w zakresie 10-12 nmoli/mg (rys. 1A, panel dodana L-Prolina).

Różnica między etanolem a wodą zastosowanymi do ekstrakcji proliny nie jest istotna. Dlatego do oznaczania poziomu stężenia L-proliny w odmianach ziemniaka podlewanych i poddanych stresowi suszy wybrano ekstrakcję wodą, gdyż dzięki temu metoda jest prostsza i tańsza. Koncentracja L-proliny w grupie odmian podlewanych wahała się w zakresie od 1 (Bogatka, Gawin) do 1,6-1,7 (Oberon, Tajfun) nmola/mg świeżej masy (rys. 2 Kontrola, tab. 1).



Rys. 2. Wzrost stężenia L-proliny w świeżej masie (FW) badanych odmian ziemniaka pod wpływem suszy. Słupki błęd reprezentują odchylenie standardowe

Porównanie stężenia L-proliny w świeżej masie odmian podlewanych ze stężeniem tego aminokwasu w świeżej masie odmian poddanych suszy wykazało znaczny wzrost jej koncentracji, indukowany przez suszę. Koncentracja L-proliny wzrosła 14-16 razy w świeżej masie odmian Oberon i Tajfun, 22-25 razy w odmianach Gawin i Gwiazda i 30-34 razy w odmianach Bogatka i Cekin (rys. 2 Susza, tab. 1).

Najniższe stężenie L-proliny w warunkach suszy glebowej stwierdzono u odmian Gawin i Oberon (21,3 i 23,5 nmola/mg świeżej masy). Tajfun, Bogatka i Gwiazda miały zbliżoną koncentrację L-proliny, pomiędzy 27-33,5 nmola/mg świeżej masy. Najwyższe stężenie L-proliny (47 nmoli/mg) stwierdzono w świeżej masie odmiany Cekin (tab. 1). Pod względem kryterium rolniczego odmiana ta charakteryzowała się największym spadkiem plonu w warunkach suszy glebowej, spośród badanych odmian.

Tabela 1

**Stężenie L-proliny (nmol/mg świeżej masy) oznaczone dla odmian podlewanych (Kontrola) i odmian poddanych 20-dniowemu stresowi suszy (Susza)**

Odmiana	Kontrola			Susza			Wzrost krotność
	nmol/mg	SD	N	nmol/mg	SD	N	
Gwiazda	1,357	0,410	3	33,43	7,47	6	24,6
Oberon	1,619	0,297	3	23,50	3,99	6	14,5
Cekin	1,371	0,480	6	46,89	15,53	6	34,2
Tajfun	1,736	0,272	3	27,27	7,40	6	15,7
Bogatka	1,006	0,193	3	30,21	2,42	6	30,0
Gawin	0,943	0,015	3	21,26	4,00	6	22,5

SD – odchylenie standardowe, N – liczba powtórzeń. Wzrost stężenia L-proliny pod wpływem suszy obliczano, dzieląc koncentrację L-proliny w świeżej masie roślin poddanych suszy przez koncentrację tego aminokwasu w świeżej masie roślin podlewanych

W doświadczeniu wykonanym w pomieszczeniu fitotronowym jedynym czynnikiem stresowym była susza glebową, pozostałe parametry, takie jak temperatura czy wilgotność powietrza, miały wartości optymalne. W doświadczeniach wazonowych czy polowych

dodatkowym czynnikiem zazwyczaj jest stres termiczny. Dlatego w celu znalezienia związku pomiędzy działaniem stresu a odpowiedzią roślin polegającą na zmianach stężenia L-proliny, w powiązaniu z poziomem strat w plonie, prowadzone są dalsze badania, rozszerzone o wpływ stresu termicznego na koncentrację tego aminokwasu w tkankach ziemniaka.

### Podsumowanie

Wydajność ekstrakcji L-proliny z tkanki ziemniaka wynosi ponad 90% niezależnie od tego, czy do ekstrakcji stosuje się etanol, czy wodę. Zastosowana metoda pozwala na szybkie oznaczenie stężenia L-proliny w dużej liczbie prób. Stres suszy indukuje znaczny wzrost stężenia L-proliny we wszystkich badanych odmianach ziemniaka. Najmniejszy wzrost stężenia L-proliny pod wpływem suszy obserwowano u odmian Oberon i Tajfun, a najwyższy u odmian Bogatka i Cekin. Dwie ostatnie odmiany w znaczącym stopniu różnią się spadkiem plonu w odpowiedzi na suszę. Dlatego w świetle uzyskanych wyników nie można stwierdzić związku pomiędzy indukowanym przez suszę wzrostem koncentracji L-proliny w badanych odmianach a poziomem spadku plonu bulw. Poznanie roli L-proliny w odpowiedzi odmian ziemniaka na suszę wymaga dalszych badań.

### Literatura

**1. Bündig C., Vu T. H., Meise P., Seddig S., Schum A., Winkelmann T. 2017.** Variability in osmotic stress tolerance of starch potato genotypes (*Solanum tuberosum* L.) as revealed by an in vitro screening: role of proline, osmotic adjustment and drought response in pot trials. – J. Agron. Crop Sci 203: 206-218; **Carillo P., Mastrolonardo G., Nacca F., Parisi D., Verlotta A., Fuggi A. 2008.** Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. – Funct. Plant Biol. 35: 412-426; **Haverkort A. J., Verhagen A. 2008.** Climate change and its repercussions for the potato supply chain. – Potato Res. 51: 223-237; **Boguszewska D. 2014.** Fizjologiczno-biochemiczne mechanizmy warunkujące tolerancję ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) na suszę glebową. Rozpr. dokt. IHAR-PIB Oddz. Jadwisin; **Boguszewska-Mańkowska D. 2016.** Odporność ziemniaka na suszę glebową i metody oceny. – Biul. IHAR 279: 65-75