

SYNTEZA WOLNEJ PROLINY W LIŚCIACH TRZECH KLONÓW WIERZBY WICIOWEJ *SALIX VIMINALIS* JAKO ODPOWIEDŹ NA ZASOLENIE PODŁOŻA

Anna STOLARSKA, Dominika KLIMEK
Katedra Fizjologii Roślin, Akademia Rolnicza w Szczecinie
ul. Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, astolarska@agro.ar.szczecin.pl

STRESZCZENIE

Przeprowadzono dwuczynnikowe doświadczenie hydroponiczne, gdzie stężenia pożywki wynosiły kolejno 0,068; 0,136; 0,170 mol/dm³. W pracy oznaczono zawartość proliny po upływie 12, 48 i 168 godzin od momentu zastosowania czynnika stresowego w liściach trzech klonów wierzby wiciowej metodą Batesa i wsp. [1]. Celem pracy było określenie wpływu zróżnicowanych stężeń NaCl w podłożu oraz czasu oddziaływania stresu na zawartość proliny w liściach klonów wierzby 'Bjor', 'Jorr', 'Tora'. Stwierdzono, że klon 'Bjor' charakteryzował się największą zawartością proliny, a jej koncentracja następowała przy jednoczesnym wzroście zasolenia pożywki oraz czasu oddziaływania zastosowanego stresu. Klon 'Jorr' charakteryzował się najmniejszą ilością proliny w świeżej masie liści, a jej maksymalną ilość stwierdzono po 48 godzinach oddziaływania stresu.

1. Wstęp

Wierzba wiciowa to jeden z najbardziej rozpowszechnionych gatunków z rodzaju *Salix*, wykorzystywana jest do celów energetycznych oraz ma zastosowanie w ochronie i zagospodarowaniu gleb, ochronie powietrza i wód [2]. Od wielu lat prowadzone są badania, które mają na celu uzyskanie międzygatunkowych genotypów wierzby o zwiększonej tolerancji na abiotyczne czynniki stresowe [3]. Pomimo szerokiego zastosowania wierzby wiciowej w rekultywacji terenów, brakuje doniesień odnośnie wskaźników biochemicznych. Badania biochemiczne zmierzają do znalezienia czułych wskaźników metabolicznych, które będą służyć w ocenie tolerancyjności roślin na różne abiotyczne czynniki stresowe środowiska. W ciągu ostatnich 10 lat ukazało się wiele prac dotyczących związku reakcji obronnej roślin ze zmianami metabolicznymi, w tym szczególnie wpływu oddziaływania stresu solnego na syntezę proliny. Spośród 400 zgromadzonych, żadna praca nie podejmowała tego problemu u wierzby wiciowej, pomimo jej szerokiego zastosowania ekologicznego.

2. Metodyka badawcza

Doświadczenie hydroponiczne przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Zrzesy wierzby wiciowej, do momentu wykształcenia odpowiedniego systemu korzeniowego i uzyskania wysokości 40 cm, rosły tylko w pełnej pożywce. Następnie do hydroponik umieszczono po 2 zrzesy badanych klonów wierzby i uzupełniono roztworami soli NaCl w odpowiednich stężeniach; hydroponiki były napowietrzane.

Oddzielnie dla każdego klonu przeprowadzono doświadczenie dwuczynnikowe, gdzie pierwszym czynnikiem był poziom zasolenia (0,068; 0,136; 0,170 mol/dm³) drugim czas (12, 48, 168 h). W tych terminach w materiale roślinnym (liście), oznaczono zawartość proliny metodą Batesa i wsp. [1] w przeliczeniu na mg/g ś.m, a także zawartość w liściach potasu i wapnia, magnezu i sodu [mg/kg] (metodą ASA).

Uzyskane wyniki zawartości proliny w liściach opracowano statystycznie, wykonując dwuczynnikową analizę wariancji, a istotność czynników testowano testem Tukeya na poziomie $\alpha = 0,05$. Chcąc zbadać zależność pomiędzy zawartością badanych pierwiastków a koncentracją proliny wykonano analizę regresji prostej

3. Wyniki i dyskusja

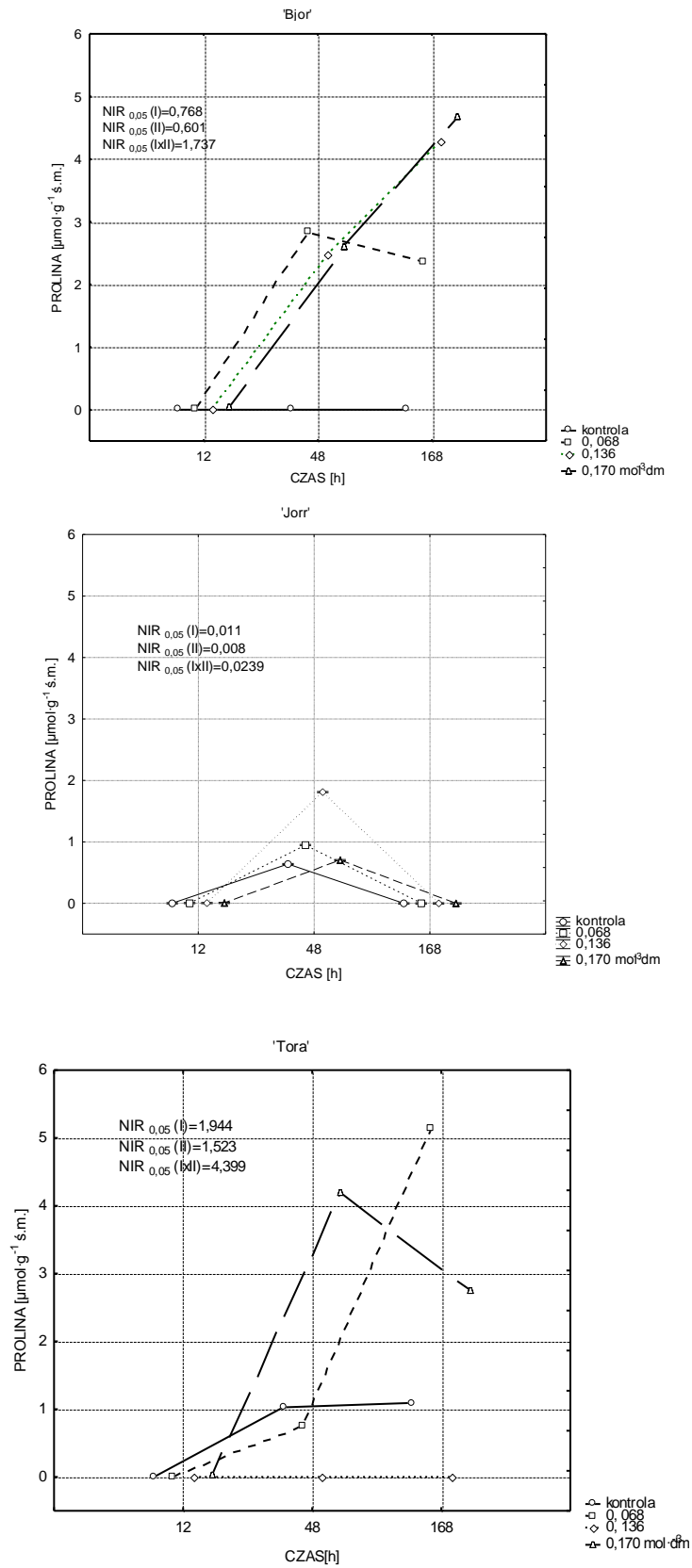
Liczne prace [4-6] wskazują, że akumulacja proliny w liściach roślin następuje głównie pod wpływem zasolenia, na które wierzba wiciowa jest szczególnie narażona, z racji nasadzeń wokół ciągów komunikacyjnych; likwidacja pokrywy lodowej przyczynia się do zwiększenia poziomu zasolenia podłoża w tych obszarach. W badaniach własnych zawartość proliny w wierzbie wiciowej oznaczana była w liściach, ponieważ największe zmiany pod wpływem czynnika następują właśnie w tych organach [7]. Analizując wyniki przedstawione na rys. 1 można stwierdzić, że spośród badanych klonów wierzby wiciowej klon 'Jorr' charakteryzował się najmniejszą średnią zawartością wolnej proliny, natomiast klon 'Bjor' największą. Zdaniem wielu autorów [8-10] akumulacja wolnej proliny jest wskaźnikiem natężenia stresu i czynnikiem decydującym o możliwościach naprawczych organizmu roślinnego. Na ogół jest ona większa u roślin charakteryzujących się większą odpornością na stres [11]. Zatem można sądzić, że 'Bjor' jest odporny na stres osmotyczny, przy zastosowanych powyżej stężeniach soli w hydroponice. Synteza tego osmoregulatora w 'Bjor' następowała wraz ze zwiększającym się stężeniem soli w podłożu. Podobne wyniki uzyskali Stolarska i in. [12]. Również Hollwarth zaobserwował w liściach kasztanowca *Aesculus hippocastanum* zbliżoną reakcję [13].

W przypadku klonu 'Jorr' stwierdzono, że maksymalna ilość proliny gromadziła się po 48 h oddziaływania stresu solnego, przy zasoleniu podłoża $0,136 \text{ mol/dm}^3$. Charakterystyczne jest to, że synteza proliny w liściach tego klonu po 168 h spadła do poziomu jaki odnotowano po 12 h od momentu zasolenia. W przypadku klonu Tora, nie zaobserwowano jednoznacznej tendencji zmian pod wpływem badanych czynników. Badania Bandurskiej sugerują, że poziom proliny w takich samych warunkach stresu może być zróżnicowany w obrębie różnych gatunków, także w obrębie odmian tych samych gatunków [14]. Wyniki badań świadczą o zróżnicowanej wrażliwości badanych klonów wierzby na natężenie bodźca stresowego.

W oparciu o wyniki badań zawarte w tabeli 1 stwierdzono również, że w przypadku klonu 'Bjor' poziom zawartości proliny w liściach był wyraźnie dodatnio skorelowany z zawartością jonów K^+ i Ca^+ , co mogło wpływać na odpowiednią stabilizację struktur białkowych i membran plazmy u klonu 'Bjor', a to wskazuje na wyraźną jego strategię obronną na zasolenie.

Tabela 1. Współczynniki korelacji dla zależności pomiędzy zawartością proliny a zawartością Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} [g/kg]

y	x	Współczynniki korelacji r		
		Bjor	Jorr	Tora
Prolina	Na	0,55	-0,28	0,31
	K	0,76*	-0,38	-0,21
	Ca	0,63*	-0,40	-0,17
	Mg	0,23	-0,70	-0,19



Rys. 1. Wpływ zróżnicowanego zasolenia podłoża i czasu oddziaływania stresu osmotycznego na zawartość proliny w wierzbie wiciowej *Salix viminalis*

4. Wnioski

Spośród przebadanych klonów wierzby wiciowej, klon 'Bjor' charakteryzował się największą zawartością proliny (1,60 $\mu\text{mol/g}$ ś.m); koncentracja tego aminokwasu następowała przy jednoczesnym wzroście zasolenia podłoża oraz czasu oddziaływania stresu osmotycznego. Zawartość proliny była proporcjonalna do zawartości K^+ i Ca^{++} w liściach. Klon ten charakteryzował się największą odpornością na stres osmotyczny, wywołany nadmierną ilością chlorku sodu w podłożu.

W klonie 'Jorr' maksymalną zawartość tego osmoregulatora odnotowano po 48 h dla wszystkich analizowanych stężeń chlorku sodu. Po 168 h od momentu zadania stresu osmotycznego poziom proliny spadał do poziomu, jaki odnotowano po 12 h.

Literatura

1. Bates L.S.: Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*. 1973, vol. 39, 205–207.
2. Szczukowski S., Tworkowski J. Stolarski M.: Biomasa krzewiastych wierzby wiciowych *Salix* ssp. pozyskiwana na gruntach ornym odnawialnym źródłem energii. *Pam. Puł.* 2000, vol.120, 421-427.
3. Szczukowski S., Tworkowski J.: Gospodarcze i przyrodnicze znaczenie krzewiastych wierzby *Salix* sp. *Zesz. Prob. Post. Nauk Rol.*, 1999, vol. 468, 69-77.
4. Misra N, Gupta A.K.: Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram, *Plant Science* 2005, vol. 169, 331-339.
5. Kumar S.G. Reddy A.M. Shudhakar C.: NaCl effect on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Plant Science*, 2003, vol.165, 1245-1251.
6. Watanabe S, Katsumi K. Yuji I., Satohiko S.. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* in vitro *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2000, vol. 63,199–206.
7. Karolewski P.: Rola proliny u roślin wyższych w warunkach stresu abiotycznego. *Wiad. Bot.*, 1996, vol. 40, 67-81.
8. Cassab G.I., Varner J.F.: Cell wall proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 1988, vol. 39, 321-353.
9. Showalter A.M.: Structure and function of plants cell proteins. *Plant Cell*. 1993, vol. 5; 9-23.
10. Hernandez S., Deleu C., Larher F.: Accumulation de proline dans les tissus foliaires de tomate en reponse a la salinite, *Life Scien. Plant Biolog. Patholog*, 2000, 551-557.
11. Chen W .P., Li. I P.H: Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea Mays* L.) cultured cells, *Plant Cell Environ.* 2002, vol. 25, 955.
12. Stolarska A., Wróbel J, Przybulewska K.: Free proline content in leaves of *Salix viminalis* as an indicator of their resistance against substrate salinity, *Chem. Inż. Ekol.* (w druku).
13. Hollwarth M.: Physiologische reactionen in pflanzem stadtischer stonorte unterschiedlicher immissionsbelastung, *Angew. Botanik.*, 1981, vol. 55, 21-27.
14. Bandurska H. Proline accumulation during hardening and its involvement in reducing membrane injuries in leaves subjected to severe osmotic stress, *Acta Physiol. Plant.*, 2001, vol. 4, 483-488.