

WPŁYW EGZOGENNEJ PROLINY NA ZAWARTOŚĆ ROZPUSZCZALNYCH FENOLI W HIPOKOTYLACH SIEWEK SOI (*Glycine max* (L.) MERR.) TRAKTOWANYCH CHŁODEM

Małgorzata M. Posmyk, Krystyna M. Janas, Katarzyna Szafrąńska

Katedra Regulacji Wzrostu Roślin, Uniwersytet Łódzki w Łodzi

Wstęp

Często rejestrowaną odpowiedzią rośliny na różne czynniki stresowe jest akumulacja związków fenolowych i proliny [DIXON, PAIVA 1995; BANDURSKA 1999; JANAS i in. 2000]. Podstawowymi substratami biosyntezy aminokwasów aromatycznych (fenyloalaniny, tyrozyny, tryptofanu) są erytrozo-4-fosforan (szlak fosforanów pentoz – OPPP) oraz fosfoenolopirogronian (glikoliza) powstające w wyniku przemian sacharydów.

Nieliczne dane dostępne w literaturze sugerują o powiązaniu metabolizmu proliny z metabolizmem fenoli poprzez dostarczanie prekursorów dla syntezy fenyloalaniny [YANG, SHETTY 1998]. Jeśli istnieje związek między OPPP, powiązany z proliną, a syntezą fenoli wówczas hodowla siewek w warunkach wzmożonej syntezy proliny (np. w czasie stresu chłodu) powinna spowodować zwiększenie poziomu fenoli w tkankach.

Celem pracy była analiza wpływu egzogennej proliny na zawartość fenoli rozpuszczalnych w hipokotylach siewek soi rosnących w warunkach optymalnych (25°C) i niskiej temperatury (5°C).

Material i metody

W doświadczeniach zastosowano soję (*Glycine max* (L.) MERR.) odm. Aldana (zbiór 1999 r.).

Część nasion kielkowano 3 dni w 25°C w plastikowych pojemnikach na wacie zwilżonej wodą destylowaną. Siewki o podobnej wielkości przenoszono do komory fitotronowej (5°C) na czas: od 1 do 5 dni. Część siewek pozostawiona w 25°C stanowiła kontrolę termiczną.

Drugą część nasion kielkowano przez dwa dni w 25°C. Następnie siewki przenoszono na szalki Petriego wyłożone bibułą Wht 2 zwilżoną wodnym roztworem proliny (5 mmol·dm⁻³) lub wodą destylowaną (kontrola). Po 24 godz. inkubacji z proliną część siewek przenoszono do 5°C, część pozostawiono w 25°C. Wszystkie etapy hodowli prowadzono w ciemności.

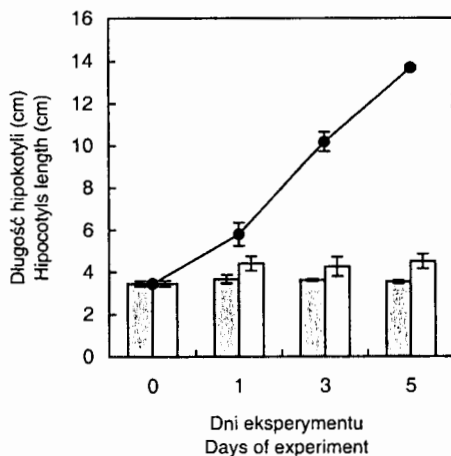
Fenole rozpuszczalne ekstrahowano z korzeni 80% etanolem a ich zawartość oznaczano metodą SINGELTON i ROSSI [1965].

Prolinę ekstrahowano z hipokotyli i korzeni 3% kwasem sulfosalicylowym i oznaczano kolorymetryczną metodą BATES i in. [1973].

Prezentowane wyniki stanowią średnią arytmetyczną z 3–4 powtórzeń. Dla poszczególnych średnich wyliczono odchylenie standardowe (\pm SD).

Wyniki i dyskusja

Prolina dodana do hodowli siewek w 25°C nie wpływała znacząco na wzrost elongacyjny hipokotyli, ich wzrost był zbliżony do kontroli (dane nieprzedstawione). Stres chłodu (5°C) powodował zahamowanie wzrostu wydłużeniowego hipokotyli. Dodanie proliny do siewek nieznacznie łagodziło skutki działania chłodu na wzrost (rys. 1). Wydaje się iż prolina działając jako antyutleniacz obniża działanie stresu chłodu na rośliny [KUSHAD, YELENOSKY 1987]. Podobny wpływ proliny na wzrost w warunkach stresu był obserwowany u wielu roślin [BANDURSKA 1999].



- siewki hodowane w 25°C bez proliny; seedlings grown without proline at 25°C
- siewki hodowane w 5°C bez proliny; seedlings grown without proline at 5°C
- siewki hodowane w 5°C z egzogenną prolina (5 mmol·dm⁻³) w podłożu; seedlings grown at 5°C with exogenous proline (5 mmol·dm⁻³) in medium

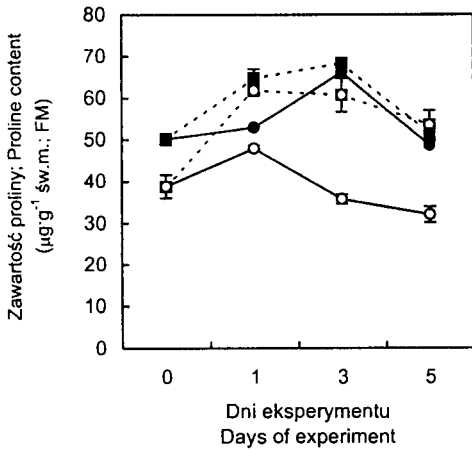
Rys. 1. Wpływ temperatury i egzogennej proliny na wzrost hipokotyli siewek soi. Średnie z 30 pomiarów \pm SD

Fig. 1. Effect of temperature and exogenous proline treatment on growth of soybean seedling hypocotyls. Means of 30 measurements \pm SD

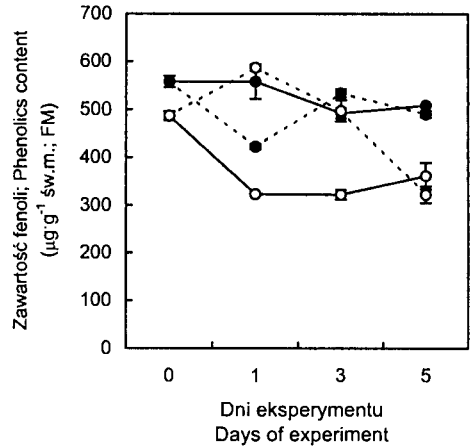
Poziom endogennej proliny w hipokotyloch oraz w korzeniach siewek hodowanych w obecności tego aminokwasu był wyższy niż w kombinacji kontrolnej, co może sugerować, iż prolina jest pobierana przez korzenie i transportowana w kierunku liści (rys. 2). W czasie trwania doświadczenia zawartość endogennej proliny w hipokotyloch siewek zarówno kontrolnych, jak i hodowanych w obecności proliny obniżył się 5 dnia (rys. 2), co może sugerować m.in. o jej wykorzystaniu jako materiału budulcowego i energetycznego [BANDURSKA 1999]

W czasie doświadczenia zawartość proliny w hipokotyloch siewek rosnących

w chłodzie (5°C) była zawsze wyższa w porównaniu z kontrolą w 25°C (rys. 2). O efekcie wzmożonej syntezy proliny w chłodzie donieśli KUSHAD i YELENOSKY [1987], a także JOUVE i in. [1993].



Rys. 2. Zmiany zawartości proliny w hipokotylach siewek soi hodowlanych w 25°C (—) i 5°C (---) w obecności egzogennej proliny (5 mol·dm⁻³) (●) i bez niej (○). Średnie z 3-4 powtórzeń ±SD



Rys. 3. Zmiany zawartości fenoli rozpuszczalnych w hipokotylach siewek soi hodowanych w 25°C (—) i 5°C (---) w obecności egzogennej proliny (5 mol·dm⁻³) (●) i bez niej (○). Średnie z 3-4 powtórzeń ±SD

Fig. 2. Changes in proline level in soybean seedling hypocotyls cultivated at 25°C (—) and 5°C (---) in presence of exogenous proline (5 mol·dm⁻³) (●) and without it (○). Means of 3-4 measurements ±SD

Fig. 3. Changes in soluble phenolics level in soybean seedling hypocotyls cultivated at 25°C (—) and 5°C (---) in presence of exogenous proline (5 mol·dm⁻³) (●) and without it (○). Means of 3-4 measurements ±SD

Zawartość fenoli rozpuszczalnych w hipokotylach siewek rosnących w chłodzie zwiększała się. Najwyższą wartość zanotowano po 24 godz., następnie obniżała się i w 5 dniu osiągnęła wartość podobną jak w kontroli (rys. 3). Podobny efekt obserwowali YANG i SHETTY [1998] u *Origanum vulgare* L. hodowanego *in vitro*.

Obniżenie po 24 godz. a następnie podwyższenie zawartości rozpuszczalnych fenoli do poziomu kontroli (25°C) obserwowano gdy siewki rosły w obecności proliny w chłodzie (rys. 3). Potrzebne są dodatkowe badania, m.in. oznaczenie aktywności dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, aby wyjaśnić ten efekt.

Egzogenna prolina podana do podłoża wpłynęła na podwyższenie zawartości związków fenolowych niezależnie od temperatury w której rosły siewki. W tym układzie eksperymentalnym wysoki poziom związków fenolowych utrzymał się do ostatniego dnia doświadczenia (rys. 3).

Z prezentowanych wstępnych danych wynika, że zarówno w warunkach stresu (wzmoczona synteza proliny) ale również w hipokotylach siewek rosnących w obecności proliny w 25°C wzrasta zawartość endogennej proliny i rozpuszczalnych fenoli. Potrzebne są dalsze badania, m.in. oznaczenie aktywności dehydro-

genazy glukozy-6-fosforanowej, kluczowego enzymu wiążącego szlak OPPP z syntezą związków fenolowych, aby wnioskować o powiązaniu obu szlaków. Wyjaśnienie powiązania zwiększonej syntezy proliny w warunkach stresu z metabolizmem związków fenolowych będzie tematem przyszłych badań zcspołu.

Wnioski

1. Prolina dodana do hodowli siewek soi zmniejszała hamujący wpływ chłodu na wzrost elongacyjny hipokotyli.
2. Chłód stymulował gromadzenie się proliny i rozpuszczalnych fenoli w pierwszych dniach działania.
3. Niezależnie od temperatury, dodanie proliny do hodowli siewek wpływa na zwiększenie zawartości endogennej proliny i fenoli, oprócz siewek rosnących w 24 godz. w chłodzie.

Literatura

- BANDURSKA H. 1999.** *Rola proliny w reagowaniu roślin na stres deficytu wody w świetle dotychczasowych wyników badań.* Zesz. Probl. Post. Nauk Rol. 469: 31–42.
- BATES L.S., WALDREN R.P., TEARE I.D. 1973.** *Rapid determination of free proline for water stress studies.* Plant Soil 39: 205–207.
- DIXON R.A., PAIVA N.L. 1995.** *Stress-induced phenylpropanoid metabolism.* Plant Cell 7: 1085–1097.
- JANAS K.M., CVIKROVÁ M., PAŁĄGIEWICZ A., EDER J. 2000.** *Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation.* Plant Physiol. Plant 38: 587–593.
- JOUBE L., ENGELMANN F., NOIROT M., CHARRIER A. 1993.** *Evaluation of biochemical markers (sugar, proline, malondialdehyde and ethylene) for cold sensitivity in micro-cuttings of two coffee species.* Plant Sci. 91: 109–116.
- KUSHAD N.M., YELENOSKY G. 1987.** *Evaluation of polyamine and proline levels during low temperature acclimation of citrus.* Plant Physiol. 84: 692–695.
- SINGELTON V.I., ROSSI J.A. 1965.** *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent.* Am. J. Enol. Vitic. 16: 144–158.
- YANG R., SHETTY K. 1998.** *Stimulation of rosmarinic acid in shoot cultures of oregano (Origanum vulgare) clonal line in response to proline, proline analogue, and proline precursors.* J. Agric. Food Chem. 46: 2888–2893.

Słowa kluczowe: chłód, fenole, prolina, soja

Streszczenie

W doświadczeniach prowadzonych z 3-dniowymi, etiolowanymi siewkami soi (*Glycine max* (L.) MERR. odmiany Aldana) badano wpływ proliny dodanej do

hodowli w stresie niskiej temperatury (5°C) i w warunkach optymalnych termicznie (25°C) na wzrost elongacyjny i poziom rozpuszczalnych fenoli. Stwierdzono, że egzogenna prolina obniża hamujący efekt chłodu na wzrost hipokotyli. Chłód stymulował gromadzenie się proliny w tkankach i w pierwszych dniach działania również akumulację związków fenolowych.

Podwyższony poziom proliny powoduje zwiększenie zawartości fenoli rozpuszczalnych w hypocotyloch niezależnie od temperatury.

INFLUENCE OF EXOGENOUS PROLINE ON SOLUBLE
PHENOLICS LEVEL IN HYPOCOTYLS
OF SOYBEAN (*Glycine max* (L.) MERR.)
SEEDLINGS AT CHILLING CONDITIONS

Małgorzata M. Posmyk, Krystyna M. Janas, Katarzyna Szafrąńska
Department of Plant Growth Regulation, University of Lodz, Łódź

Słowa kluczowe: chilling, phenolics, proline, soybean

Summary

The effect of exogenous proline on growth and soluble phenolics level in hypocotyls of 3-days old, etiolated seedlings of soybean (*Glycine max* (L.) MERR.) cultivated at optimal (25°C) and low (5°C) temperature were investigated. Chilling (5°C) restrained elongation of hypocotyls, whereas proline treatment reduced this unfavourable effect of low temperature.

Chilling (5°C) stimulated proline accumulation in tissue and, in the beginning of experiment phenolic compounds accumulation too. Higher level of proline content caused soluble phenolics accumulation in hypocotyls, regardless of temperature.

Dr Małgorzata M. **Posmyk**
Katedra Regulacji Wzrostu Roślin
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16
90-237 ŁÓDŹ
e-mail: posmyk@biol.uni.lodz.pl