

Žieminio rapso atsparumo šalčiui padidinimas egzogeninėmis aminorūgštimis

Remigijus Peleckis,

Natalija Burbulis,

Aušra Blinstrubienė

Aleksandro Stulginskio universitetas,
Studentų g. 11,
53361 Akademija, Kauno r.
El. paštas natalija.burbulis@asu.lt

Tyrimai atlikti 2014–2017 m. Aleksandro Stulginskio universiteto Bandydžių stotyje. Tirtas L-prolino ir L-glutamato rūgšties poveikis linijinės žieminio rapso (*Brassica napus* L. spp. *oleifera biennis* Metzg.) veislės 'Cult' atsparumui šalčiui. Dirvožemis – karbonatingas giliau glėjiškas išplautžemis (*Calc(ar)i-Endohypogleyic Luvisol*). Rudenį augalai purkšti L-prolinu ir L-glutamato rūgštimi vieną arba du kartus. Vertinti pasirususių žiemių augalų biometriniai rodikliai, endogeninio prolino kiekis ir rapsų peržiemojimas. Nustatyta, kad egzogeninės aminorūgštys L-prolinas ir L-glutamato rūgštis skatino žieminio rapso antžeminės dalies žaliosios masės prieaugį, sausos medžiagos kaupimąsi ir šaknies kaklelio skersmens padidėjimą rudens periodu. Tirtos L-prolino ir L-glutamato rūgšties koncentracijos pasirusimo žiemojimui metu skatino intensyvesnę endogeninio prolino sintezę žieminio rapso augaluose. Geriausiai peržiemojo žieminio rapso augalai, rudenį du kartus nupurkšti 30 mM l⁻¹ L-prolino arba 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalais.

Raktažodžiai: atsparumas šalčiui, egzogeninės aminorūgštys, endogeninis prolino, žieminis rapsas

ĮVADAS

Per visą gyvenimo ciklą augalai yra veikiami įvairių aplinkos veiksnių, tokių kaip druskingumas, vandens trūkumas, dideli temperatūros svyravimai, toksiška metalo jonų koncentracija ir UV spinduliuotė. Šie aplinkos veiksniai įvairiu mastu riboja augalų augimą ir produktyvumą, priklauso-
mai nuo streso stiprumo. Mokslininkai teigia, kad dėl įvairių abiotinių veiksnių poveikio, pavyzdžiui, sausros, šalčio, druskingumo ir kt., žemės ūkio augalų derlingumas gali sumažėti iki 50 % (Kunert et al., 2015), todėl būtina ieškoti priemonių žalingam aplinkos veiksnių poveikiui sumažinti. Kai kurie mokslininkai teigia, kad tai galima pasiekti naudojant egzogeninius augalų augimo reguliatorius (Kazan, 2015; Khan et al., 2015). Tačiau tyrimai parodė, kad hormoniniai augimo reguliatoriai vandens telkiniuose gali kelti grėsmę van-

dens ekosistemoms (Wang et al., 2011). Be to, netinkamas augimo reguliatorių naudojimas žemės ūkio augalams turi įtakos žinduolių reprodukcijos vaisingumui, gali padidinti estrogeninį aktyvumą (Sørensen, Danielsen, 2006), todėl labai svarbu parinkti netoksiškas žmonėms ir aplinkai priemones, didinančias atsparumą abiotiniams stresams.

Reaguodami į skirtingus stresinius veiksnius, pavyzdžiui, šaltį, augalai kaupia didelius įvairių tipų osmoprotektorių kiekius. Osmoprotektoriai – mažos molekulinės masės, itin tirpūs organiniai junginiai, kurie paprastai yra netoksiški esant didelėms koncentracijoms. Šie junginiai apsaugo augalus nuo streso, reguliuoja ląstelių osmosą, dalyvauja aktyviųjų deguonies junginių detoksikacijoje, užtikrina membranų vientisumą ir stabilizuoja fermentus / baltymus (Ashraf, Foolad, 2007).

Nustatyta, kad kai kurios aminorūgštys (pvz., serinas, prolino ir leucinas) veikia kaip signalinės

molekulės, o kitos yra fitohormonų ar kitų antrinių metabolitų, pasižyminčių signaline funkcija, sintezės pirmtakai (Häusler et al., 2014).

Prolinas yra svarbus augalų augimui ir vystymuisi, nes dalyvauja daugelyje ląstelių metabolizmo reakcijų: aktyvina kvėpavimą, reguliuoja deguonies asimiliaciją, yra NH_2 grupės donoras vykstant aminorūgščių sintezei (Wang et al., 2014; Biancucci et al., 2015). Reikšminga ir prolino apsauginė funkcija, augalui patekus į nepalankias arba stresą sukeliančias sąlygas (Dörffling et al., 2009; Pocięcha et al., 2009; Gothandam et al., 2010). Prolino kaupimasis yra bendra daugelio augalų fiziologinė atsakomoji reakcija į biotinį ir abiotinį stresą (Kavi Kishor et al., 2005; Hayat et al., 2012; Okumoto et al., 2016).

Daroma prielaida, kad glutamo rūgštis yra centrinė aminorūgščių metabolizmo molekulė aukštesniuose augaluose (Forde, Lea, 2007). Teigiama, kad glutamo rūgštis dalyvauja reguliuojant šaknų augimą ir vystymąsi (Walch-Liu et al., 2006; Walch-Liu, Forde 2008) bei yra susijusi su kalcio (Ca^{2+}) signalinėmis kaskadomis (Dennison, Spalding, 2000) ir abscizo rūgšties (ABR) kiekiu augaluose (Khan et al., 2004). Mokslininkai teigia, kad jonotropiniai glutamo rūgšties receptoriai dalyvauja augalų atsako į abiotinį stresą procesuose, reguliuoja azoto ir anglies metabolizmą bei slopina grybines infekcijas (Armstrong, Gouaux, 2000; Forde, Lea, 2007).

Tyrimų tikslas – įvertinti L-prolino ir L-glutamo rūgšties poveikį žieminio rapsų atsparumui šalčiui.

TYRIMŲ SĄLYGOS IR METODAI

Tyrimai atlikti 2014–2017 m. Aleksandro Stulginskio universiteto Bandymų stotyje ($54^{\circ}53'N$, $23^{\circ}50'E$). Dirvožemis – karbonatingas giliau glė-

jiškas išplautžemis (*Calc(ar)i-Endohypogleyic Luvisol*). Dirvožemio agrocheminės savybės (vidutiniai 2014–2016 m. duomenys): dirvožemio pH – 6,97, humuso – 2,51 %, judriųjų maisto medžiagų dirvožemyje: P_2O_5 – 242 mg kg^{-1} , K_2O – 124 mg kg^{-1} , suminio azoto – 1,52 %.

Auginta linijinė žieminio rapsų (*Brassica napus* L. spp. *oleifera biennis* Metzg.) veislė 'Cult'. Priešsėlis – žieminiai kviečiai. Tręšta $\text{N}_{185}\text{P}_{40}\text{K}_{60}$ (N_{14} rudenį prieš sėją, N_{171} pavasarį). 2014 m. žieminiai rapsai pasėti rugpjūčio 20 d., 2015 m. – rugpjūčio 25 d., 2016 m. – rugpjūčio 20 d. sėjama – MULTIDRILL M 300 (Vokietija). Sėklos norma – 5 kg ha^{-1} . Pradinio laukelio plotas – 36 m^2 , apskaitinio – 20 m^2 . Tyrimai atlikti keturiais pakartojimais. Eksperimento laukeliai išdėstyti laukelių skaidymo būdu. Po sėjos rapsai buvo purkšti herbicidu 'Sultan super' 2,0 l ha^{-1} , du kartus insekticidu 'Proteus' 0,8 l ha^{-1} ir 0,6 l ha^{-1} , du kartus fungicidu 'Folicur' 0,5 l ha^{-1} rudenį ir 1,0 l ha^{-1} vasarą. Egzogeninėmis aminorūgštimis žieminio rapsų augalai buvo purkšti 1,04–1,07 augimo tarpsniuose (Brazauskienė, Šidlauskas, 2001).

Dirvožemio agrocheminės savybės nustatytos prieš žieminį rapsų sėją. Tyrimams atlikti kiekviename eksperimento laukelyje dirvožemio grąžtu paimti ėminiai iš 0–25 cm dirvožemio sluoksnio. Dirvožemio pH nustatytas potenciometriškai 1 n KCl ištraukoje, judrieji fosforas P_2O_5 ir kalis K_2O (mg kg^{-1} dirvožemio) – Egnerio-Rimo-Domingo (A-L) metodu, organinė anglis – Heraeus aparatu deginant mėginius 900 °C temperatūroje. Humuso kiekis apskaičiuotas organinės anglies kiekį padauginus iš koeficiento 1,724. Tyrimai atlikti Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro (LAMMC) Agrocheminių tyrimų laboratorijoje.

Rapsų peržiemojimo procentas (E) apskaičiuotas pagal 1 formulę:

Purškimo aminorūgštimis schema:

Variantas	I purškimas (1,04–1,05 augimo tarpsnyje)	II purškimas (1,06–1,07 augimo tarpsnyje)
I kontrolė		
II 15 mM l ⁻¹ L-prolino	2014 09 30; 2015 10 09; 2016 09 28	
III 30 mM l ⁻¹ L-prolino	2014 09 30; 2015 10 09; 2016 09 28	
IV 30 mM l ⁻¹ L-prolino	2014 09 30; 2015 10 09; 2016 09 28	2014 10 17; 2015 10 26; 2016 10 18
V 1,0 M l ⁻¹ L-glutamo rūgšties	2014 09 30; 2015 10 09; 2016 09 28	
VI 1,5 M l ⁻¹ L-glutamo rūgšties	2014 09 30; 2015 10 09; 2016 09 28	
VII 1,5 M l ⁻¹ L-glutamo rūgšties	2014 09 30; 2015 10 09; 2016 09 28	2014 10 17; 2015 10 26; 2016 10 18

$$E = (RPT_2 / RTP_1) \times 100 \% \quad (1)$$

RPT_1 – rapsų pasėlio tankumas (vnt. m^{-2}) prieš žiemojimą;

RPT_2 – rapsų pasėlio tankumas (vnt. m^{-2}) atsinaujinus vegetacijai pavasarį.

Pasiruošusių žiemoti rapsų biometriniais rodikliams (vidutinei antžeminės dalies masei, šaknies kaklelio skersmeniui, viršūninio pumpuro aukščiui, lapų skaičiui ir plotui) įvertinti iš kiekvieno laukelio skirtingų vietų paimta po 10 augalų. Augalo žalioji masė nustatyta analitinėmis svarstyklėmis ABJ 120–4M (*KERN & Sohn GmbH*, Vokietija). Sausos medžiagos kiekis nustatytas drėgmės analizatoriumi KERN MLS_N (*KERN & Sohn GmbH*, Vokietija). Lapų plotas įvertintas analizatoriumi WinDIAS 3 Image Analysis System (*Delta-T Devices Ltd*, UK).

Prolino kiekis nustatytas taikant modifikuotą ninhydrino metodą (McClinchey, Kott, 2008). Iš augalų paimami aštuoni 7 mm skersmens lapo diskai, pasveriami ir patalpinami mėgintuvėlyje. Užpilami 2 ml distiliuoto vandens ir verdami vandens vonelėje 30 min., tada atvėsunami iki kambario temperatūros. Naujame mėgintuvėlyje sumaišoma 100 μ l mėginio, 400 μ l distiliuoto vandens ir 1 ml ninhydrino. Paruošiami du 1 mM L-prolino tirpalo standartai. Šie tirpalai verdami vandens vonelėje 20 min. ir atvėsunami ant ledo. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilama 3 ml tolueno ir gerai suplakama. Mėgintuvėliai laikomi tamsoje 2 val., susiformavęs chromoforas įpilamas į kvarco kiuvetę, absorbcija matuojama bangos ilgiui esant 520 nm spektrofotometru *Spectro UV-VIS Dual beam* (*Labomed*, Inc).

Prolino kiekis apskaičiuojamas pagal 2 formulę:

$$P = \frac{\left(\frac{a}{0,2164}\right) \times 2}{m} \quad (2)$$

a – absorbcija esant bangos ilgiui 520 nm; m – augalinės medžiagos masė g; P – prolino kiekis μ M g^{-1} .

Tyrimų duomenys statistiškai įvertinti pagal Fisherio kriterijų ir LSD testą (Raudonius, 2017). Tyrimų duomenų statistinė analizė atlikta naudojantis kompiuterinėmis programomis SPLIT PLOT ir STAT iš programų paketo SELEKCIJA.

Meteorologinės sąlygos. 2014 m. rugpjūčio–rugsėjo mėn. vidutinė oro temperatūra buvo arti-

ma daugiamečiams vidurkiams. Rugpjūčio mėn. kritulių kiekis viršijo daugiametį vidurkį 32 mm, o rugsėjį kritulių iškrito 31,9 mm mažiau, palyginti su daugiamečiu vidurkiu. Spalio trečiojoje dekadėje vidutinė oro temperatūra keturias paras buvo žemesnė nei +2 °C, tačiau nuo spalio 27 d. orai vėl atšilo, kritulių per šį mėnesį iškrito 70,7 mm daugiau už daugiametį vidurkį. Rapsų vegetacija pasibaigė lapkričio antrosios dekadės pabaigoje. Gruodžio mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 4,2 °C aukštesnė nei vidutinė daugiametė. Kritulių šį mėnesį buvo 13,2 mm daugiau, palyginti su daugiamečiu vidurkiu, bet visi iškrito antroje mėnesio pusėje. 2015 m. sausio mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 4,4 °C aukštesnė nei vidutinė daugiametė. Žemiausia oro temperatūra buvo sausio 6 ir 7 d. (vidutinė paros temperatūra buvo atitinkamai –10,2 ir –12,3 °C). Neigiamų temperatūrų suma sudarė 41,9 °C, o teigiamų – 28,5 °C. Vasario mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 4,0 °C didesnė, palyginti su daugiamečiu vidurkiu, nuo vasario 19 d. įsivyravo teigiamos vidutinės paros temperatūros, ir prasidėjo rapsų vegetacija. 2015 m. rugpjūčio–rugsėjo mėn. vidutinė oro temperatūra buvo artima daugiamečiams vidurkiams. Rugpjūčio mėn. kritulių iškrito 73,4 mm mažiau, palyginti su daugiamečiu vidurkiu. Spalio paskutinėmis dienomis vidutinė oro temperatūra tris paras buvo žemesnė nei +2 °C, o kritulių kiekis per šį mėnesį buvo artimas daugiamečiams vidurkiams. Rapsų vegetacija pasibaigė lapkričio trečiosios dekadės pradžioje. Gruodžio mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 5,9 °C aukštesnė nei vidutinė daugiametė. Kritulių šį mėnesį buvo 25,2 mm daugiau, palyginti su daugiamečiu vidurkiu. 2016 m. sausio mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 2,3 °C žemesnė nei vidutinė daugiametė. Žemiausia oro temperatūra buvo sausio 5 ir 7 d. (vidutinė paros temperatūra buvo atitinkamai –17,5 ir –17,1 °C). Neigiamų temperatūrų suma sudarė 236,7 °C, o teigiamų – 22,5 °C. Vasario mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 4,9 °C didesnė, palyginti su daugiamečiu vidurkiu. Vasario pirmojoje dekadėje vidutinė oro temperatūra penkias paras buvo aukštesnė nei +2 °C, tačiau nuo vasario 12 d. orai vėl atšalo. 2016 m. rugpjūčio–rugsėjo mėn. vidutinė oro temperatūra buvo artima daugiamečiams vidurkiams. Rugpjūčio mėn. kritulių iškrito 34,6 mm daugiau, o rugsėjo mėn. – 30,1 mm mažiau, palyginti su daugiamečiu vidurkiu. Spalio mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 1,5 °C žemesnė nei vidutinė daugiametė,

o kritulių ši mėnesį iškrito 81,9 mm daugiau, palyginti su daugiamečiu vidurkiu. Rapsų vegetacija pasibaigė lapkričio pirmosios dekados pradžioje. Gruodžio mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 6,7 °C aukštesnė nei vidutinė daugiamečių. Kritulių ši mėnesį buvo 41,8 mm daugiau, palyginti su daugiamečiu vidurkiu. 2017 m. sausio mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 1,1 °C aukštesnė nei vidutinė daugiamečių. Žemiausia oro temperatūra buvo sausio 23 ir 24 d. (vidutinė paros temperatūra atitinkamai –15,5 ir –14,7 °C). Neigiamų temperatūrų suma sudarė 199,1 °C, o teigiamų – 36,5 °C. Vasario mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 3,2 °C didesnė, palyginti su daugiamečiu vidurkiu. Vasario antrojoje dekadėje vidutinė oro temperatūra penkias paras buvo aukštesnė nei +2 °C, tačiau nuo vasario 23 d. orai vėl atšalo. Kovo mėn. vidutinė oro temperatūra buvo 3,0 °C aukštesnė už daugiamečių vidutinę, kritulių iškrito 20,6 mm daugiau, palyginti su daugiamečiu vidurkiu.

TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

2014 m. vidutinė augalo antžeminės dalies žalioji masė varijavo nuo 29,3 iki 50,1 g (lentelė). Tirtos egzogeninės aminorūgštys augalo antžeminės dalies žaliają masę padidino nuo 17,5 % (nupurškus vieną kartą 15 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu) iki 41,5 % (nupurškus du kartus 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu), palyginti su kontrolinio varianto augalais.

Dėl L-prolino poveikio sausos medžiagos kiekis augalų antžeminėje dalyje mažėjo, tačiau, palyginti su kontroliniu variantu, skirtumai neesminiai ir statistiškai nepatikimi. Priešingai, dėl L-glutamato rūgšties poveikio sausos medžiagos kiekis augalų antžeminėje dalyje padidėjo nuo 3,6 % (nupurškus vieną kartą 1,0 M l⁻¹ tirpalu) iki 21,3 % (nupurškus du kartus 1,5 M l⁻¹ tirpalu). Rekomenduojamą lapų skaičių suformavo visų variantų augalai. Didinant egzogeninių aminorūgščių koncentraciją, šaknies kaklelio skersmuo nuosekliai didėjo. Viršutinio pumpuro aukštis esmingai padidėjo nupurškus vieną arba du kartus 30 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu. Kitais tirtais atvejais skirtumai, palyginti su kontrole, neesminiai ir statistiškai nepatikimi.

2015 m. dėl nepalankių meteorologinių sąlygų kontrolinio varianto vidutinė augalo antžeminės dalies žalioji masė buvo 11,7 karto mažesnė, palyginti su augalais, augintais 2014 metais. Tirtos egzogeninės aminorūgštys esmingai didino augalo antžeminės dalies žaliają masę. Daugiausia (5,2 g) žaliosios masės sukaupė augalai, du kartus nupurškšti 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu. Dėl L-prolino poveikio sausos medžiagos kiekis augalų antžeminėje dalyje padidėjo nuo 27,5 % iki 44,8 %, dėl L-glutamato rūgšties poveikio – nuo 24,5 % iki 42,2 %. Palyginti su kontroliniu variantu, skirtumai esminiai ir statistiškai patikimi. Dėl egzogeninių aminorūgščių poveikio šaknies kaklelio skersmuo padidėjo nuo 7,8 % (nupurškus vieną kartą

Lentelė. Pasiruošusių žiemoti žieminių rapsų biometriniai rodikliai 2014–2016 m. (tarp variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide (a, b), skirtumai yra esminiai ($P < 0,05$))

Table. Biometric parameters of winter oilseed rape prepared for wintering, 2014–2016 (means not sharing a common letter (a, b) are significantly different ($P < 0.05$))

Variantai Variants	Augalo antžeminės dalies žalioji masė g Fresh weight of the plant above-ground part, g	Antžeminės dalies sausos medžiagos kiekis % Amount of dry matter in the aboveground part of the plant, %	Augalo lapų skaičius vnt. Number of leaves per plant, units	Šaknies kaklelio skersmuo mm Diameter of root neck, mm	Viršutinio pumpuro aukštis cm Height of apical bud, cm
2014 metai					
I	29,3d	32,5bc	7,53b	7,92c	1,69b
II	35,6c	32,2bc	7,92b	7,98c	1,71ab
III	39,8bc	29,8c	8,38ab	8,63ab	1,75a
IV	42,4b	25,2c	8,79a	8,47b	1,74a
V	36,1c	33,7bc	7,95b	7,94c	1,68b
VI	38,4bc	36,9b	8,47ab	8,64ab	1,72ab
VII	50,1a	41,3a	8,81a	8,82a	1,71ab

Lentelė. (tęsinys)

Table. (continued)

Variantai Variants	Augalo antžeminės dalies žaliąji masė g Fresh weight of the plant above- ground part, g	Antžeminės dalies sau- sos medžiagos kiekis % Amount of dry matter in the aboveground part of the plant, %	Augalo lapų skaičius vnt. Number of leaves per plant, units	Šaknies kaklelio skersmuo mm Diameter of root neck, mm	Viršutinio pum- puro aukštis cm Height of apical bud, cm
2015 metai					
I	2,5c	3,7d	4,48c	4,12d	1,91b
II	3,6b	5,1c	5,12b	4,47cd	1,98ab
III	3,9b	5,8b	5,73ab	4,93b	2,05ab
IV	4,8ab	6,7a	6,34a	5,69a	1,96ab
V	4,1b	4,9c	5,14b	4,72c	1,84b
VI	4,6ab	5,9b	5,69ab	5,38ab	2,11a
VII	5,2a	6,4a	6,21a	5,85a	1,93b
2016 metai					
I	27,1c	25,4b	7,49b	7,84c	1,72a
II	31,3bc	25,6b	7,83b	7,91c	1,69a
III	35,7b	26,3b	8,31ab	8,44b	1,74a
IV	41,2ab	29,4ab	8,72a	8,61a	1,71a
V	32,1bc	26,1b	7,97b	7,99c	1,73a
VI	37,3b	31,2a	8,39ab	8,45b	1,68a
VII	45,5a	34,7a	8,77a	8,81a	1,72a

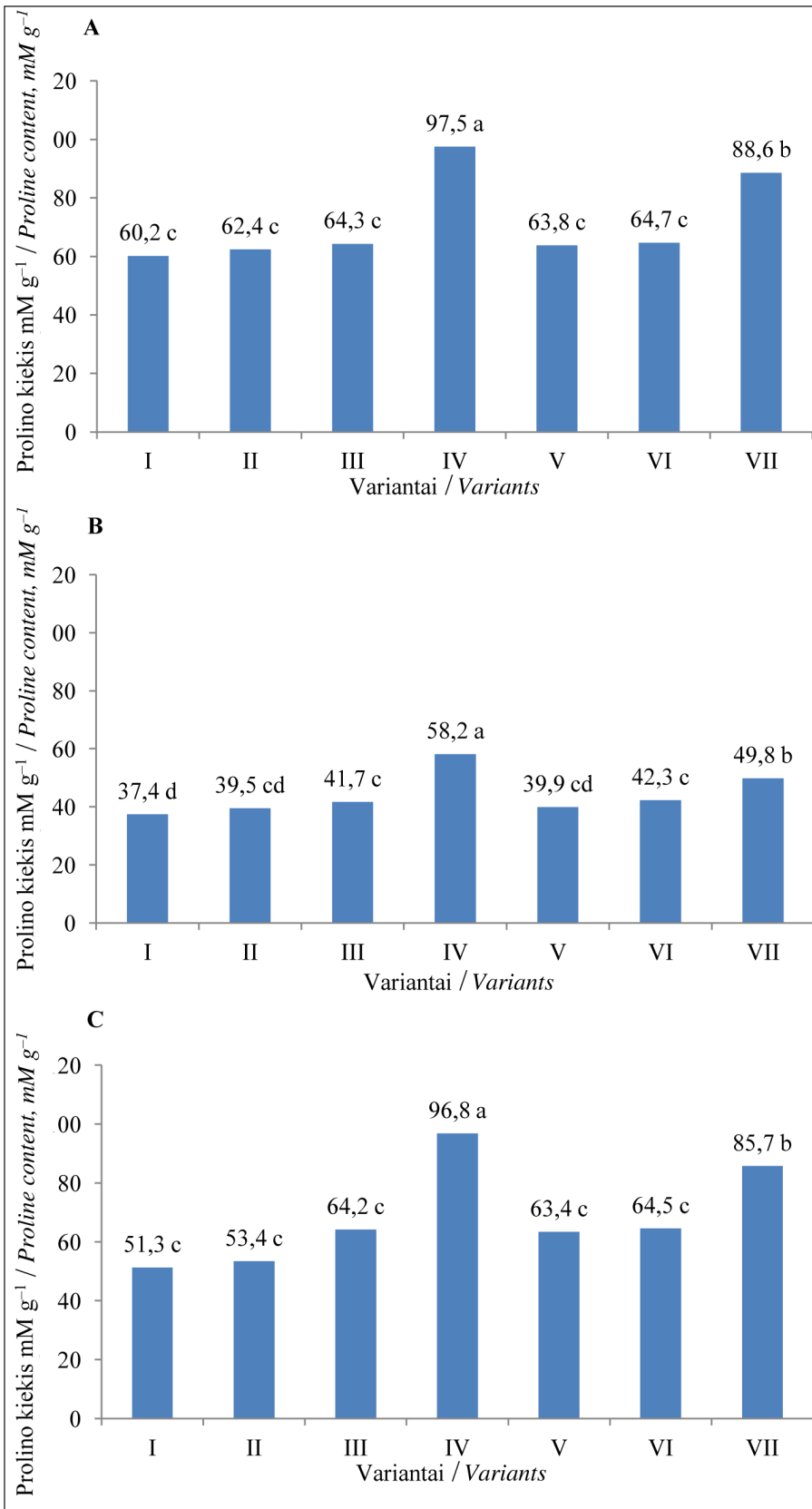
Pastaba / Note: I – kontrolė; II – purkšta 15 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu; III – purkšta 30 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu; IV – du kartus purkšta 30 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu; V – purkšta 1,0 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu; VI – purkšta 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu; VII – du kartus purkšta 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu. / I, control; II, sprayed with 15 mM l⁻¹ L-proline; III, sprayed with 30 mM l⁻¹ L-proline; IV, sprayed with 30 mM l⁻¹ L-proline two times; V, sprayed with 1.0 M l⁻¹ L-glutamic acid; VI, sprayed with 1.5 M l⁻¹ L-glutamic acid; VII, sprayed with 1.5 M l⁻¹ L-glutamic acid two times.

30 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu) iki 29,6 % (nupurškus du kartus 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu). Viršutinio pumpuro aukštis esmingai padidėjo dėl 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties poveikio. Kitais tirtais atvejais skirtumai, palyginti su kontrole, neesminiai ir statistiškai nepatikimi.

2016 m. 30 mM l⁻¹ L-prolino ir 1,0 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties neturėjo esminio poveikio augalo antžeminės dalies žaliajai masei ir šaknies kaklelio skersmeniui. Daugiausia (45,5 g) žaliosios masės antžeminėje dalyje sukaupė augalai, du kartus nupurškšti 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu. Sausos medžiagos kiekis esmingai padidėjo nupurškus vieną arba du kartus 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu. Viršutinio pumpuro aukščiui egzogeninės aminorūgštys esminio poveikio neturėjo.

Tyrimais nustatyta, kad endogeninio prolino kiekis pasirodusių žiemoti žieminių rapsų au-

galuose priklauso nuo meteorologinių sąlygų rudens periodu ir tirtų egzogeninių aminorūgščių panaudojimo. Kontrolinio varianto augalai daugiausia (60,2 μM g⁻¹) prolino sukaupė 2014 m. (1A pav.). Šiais tyrimo metais mažesnės egzogeninių L-prolino (15 mM l⁻¹ ir 30 mM l⁻¹) ir L-glutamato rūgšties (1,0 M l⁻¹ ir 1,5 M l⁻¹) koncentracijos endogeninio prolino kiekiui augaluose esminės įtakos neturėjo. Nupurškus du kartus 30 mM l⁻¹ L-prolino ir 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalais, endogeninio prolino kiekis padidėjo atitinkamai 1,6 ir 1,5 karto, palyginti su kontroliniais augalais. Didinant egzogeninių aminorūgščių koncentracijas 2015 m., endogeninio prolino kiekis nuosekliai didėjo ir daugiausia prolino nustatyta augaluose, nupurškštuose du kartus 30 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu (1B pav.). Analogiškos tendencijos nustatytos ir 2016 m. (1C pav.). Visais tyrimo metais endogeninio



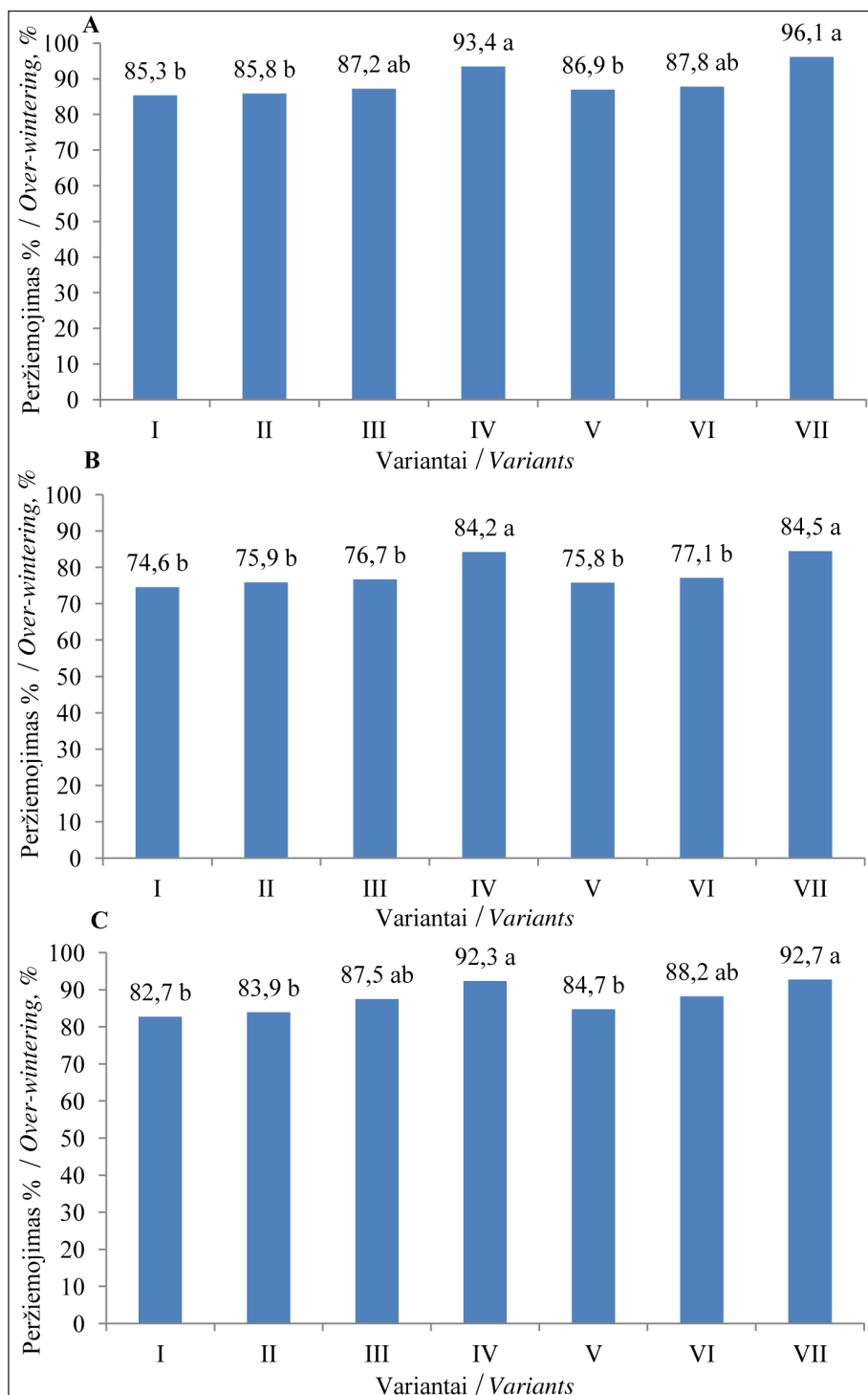
1 pav. Endogeninio prolino kiekis pasirusošusių žiemo-ti žieminių rapsų augaluose (A – 2014 m., B – 2015 m., C – 2016 m.) (tarp variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide (a, b), skirtumai yra esminiai ($P < 0,05$))

Fig. 1. The content of endogenous proline in winter oilseed rape prepared for wintering (A – 2014, B – 2015, C – 2016) (means not sharing a common letter (a, b) are significantly different ($P < 0.05$))

Pastaba / Note: I – kontrolė; II – purkšta 15 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu; III – purkšta 30 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu; IV – du kartus purkšta 30 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu; V – purkšta 1,0 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu; VI – purkšta 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu; VII – du kartus purkšta 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu. / I, control; II, sprayed with 15 mM l⁻¹ L-proline; III, sprayed with 30 mM l⁻¹ L-proline; IV, sprayed with 30 mM l⁻¹ L-proline two times; V, sprayed with 1.0 M l⁻¹ L-glutamic acid; VI, sprayed with 1.5 M l⁻¹ L-glutamic acid; VII, sprayed with 1.5 M l⁻¹ L-glutamic acid two times.

30 mM l⁻¹ L-prolino panaudojimas du kartus statistškai patikimai labiau didino endogeninio prolino kiekį, palyginti su du kartus panaudota 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgštimi.

Tirtos egzogeninės aminorūgštys didino žiemiųjų rapsų atsparumą šalčiui (2 pav.). Didinant egzogeninių aminorūgščių koncentraciją, peržiemojusių augalų procentas nuosekliai didėjo. Nupurškus



2 pav. Žiemiųjų rapsų pasėlio peržiemojimas (A – 2015 m., B – 2016 m., C – 2017 m.) (tarp variantų vidurkių, pažymėtų ne ta pačia raide (a, b), skirtumai yra esminiai ($P < 0,05$))

Fig. 2. Winter oilseed rape over-wintering percentage (A – 2015, B – 2016, C – 2017) (means not sharing a common letter (a, b) are significantly different ($P < 0.05$))

Pastaba / Note: I – kontrolė; II – purkšta 15 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu; III – purkšta 30 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu; IV – du kartus purkšta 30 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu; V – purkšta 1,0 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu; VI – purkšta 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu; VII – du kartus purkšta 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu. / I, control; II, sprayed with 15 mM l⁻¹ L-proline; III, sprayed with 30 mM l⁻¹ L-proline; IV, sprayed with 30 mM l⁻¹ L-proline two times; V, sprayed with 1.0 M l⁻¹ L-glutamic acid; VI, sprayed with 1.5 M l⁻¹ L-glutamic acid; VII, sprayed with 1.5 M l⁻¹ L-glutamic acid two times.

du kartus 30 mM l⁻¹ L-prolino tirpalu peržiemojo 8,1 % (2015 m.), 9,6 % (2016 m.) ir 9,6 % (2017 m.) daugiau augalų, palyginti su kontroliniu variantu. Visais tyrimo metais geriausiai peržiemojo augalai, kurie rudenį buvo nupurkšti 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalu du kartus. Nustatyta, kad egzogeninė L-glutamato rūgštis žieminių rapsų atsparumą šalčiui didina šiek tiek efektyviau, palyginti su L-prolinu, tačiau skirtumai neesminiai ir statistiškai nepatikimi.

Literatūroje nurodoma, kad lapų skaičius, sausų medžiagų kiekis antžeminėje dalyje, šaknies kaklelio skersmuo ir viršutinio pumpuro aukštis – pagrindiniai biometriniai rodikliai, lemiantys žieminių rapsų peržiemojimą (Velička et al., 2010). Mūsų tyrimais nustatyta, kad egzogeninių L-prolino ir L-glutamato rūgšties panaudojimas rudens periodu turi teigiamą poveikį žieminių rapsų pasiruošimui žiemėjimui, skatinant fiziologinius ir biocheminius procesus – antžeminės dalies žaliosios masės prieaugį, sausos medžiagos kaupimąsi, šaknies kaklelio skersmens padidėjimą, endogeninio prolino sintezę.

Mokslininkai teigia, kad prolino veikia ne tik kaip osmolitas, tačiau dalyvauja subląstelinių struktūrų (pvz., membranų ir baltymų) stabilizavime, laisvųjų radikalų šalinimo ir oksidacijos–redukcijos potencialo pastovumo palaikymo stresinėmis sąlygomis procesuose (Ashraf, Foolad, 2007). Teigiamas egzogeninio prolino poveikis nustatytas ir tyrimuose su kitais augalais (Verslues, Sharma, 2010). Anksčiau atlikti mūsų tyrimai rodo, kad L-glutamato rūgšties priedas maitinamojoje terpėje didina žieminio rapso ūglių atsparumą šalčiui *in vitro* (Peleckis ir kt., 2017). Mokslinėje literatūroje taip pat nurodoma, kad egzogeninė glutamo rūgštis taip pat didina kviečių atsparumą šalčiui (Mazzucotelli et al., 2006) bei ryžių daigų atsparumą žemoms temperatūroms (Jia et al., 2017).

IŠVADOS

1. Egzogeninės aminorūgštys L-prolinas ir L-glutamato rūgštis skatino žieminio rapso antžeminės dalies žaliosios masės prieaugį, sausos medžiagos kaupimąsi ir šaknies kaklelio skersmens padidėjimą rudens periodu.

2. Tirtos L-prolino ir L-glutamato rūgšties koncentracijos pasiruošimo žiemėjimui metu skatino intensyvesnę endogeninio prolino sintezę žieminio rapso augaluose.

3. Geriausiai peržiemojo žieminio rapso augalai, rudenį du kartus (1,04–1,05 augimo tarpsnyje bei

1,06–1,07 augimo tarpsnyje) nupurkšti 30 mM l⁻¹ L-prolino arba 1,5 M l⁻¹ L-glutamato rūgšties tirpalais.

Gauta 2018 08 02

Priimta 2018 09 28

LITERATŪRA

1. Armstrong N., Gouaux E. 2000. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*. Vol. 28. P. 165–181.
2. Ashraf M., Foolad M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*. Vol. 59. P. 206–216.
3. Biancucci M., Mattioli R., Moubayidin L., Sabatini S., Costantino P., Trovato M. 2015. Proline affects the size of the root meristematic zone in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*. Vol. 15. 14 p.
4. Brazauskienė I., Šidlauskas G. 2001. Žieminių ir vasarinių rapsų augimo tarpsnių analizė ir apibūdinimas. *Žemdirbystė*. T. 75. P. 50–64.
5. Dennison K. L., Spalding E. P. 2000. Glutamate-gated calcium fluxes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. Vol. 124. P. 1511–1514.
6. Dörffling K., Dörffling H., Luck E. 2009. Improved frost tolerance and winter hardiness in proline overaccumulating winter wheat mutants obtained by *in vitro*-selection is associated with increased carbohydrate, soluble protein and abscisic (ABA) levels. *Euphytica*. Vol. 165. P. 545–556.
7. Gothandam K. M., Nalini E., Karthikeyan S., Shin J. S. 2010. OsPRP3, a flower specific proline-rich protein of rice, determines extracellular matrix structure of floral organs and its overexpression confers cold-tolerance. *Plant Molecular Biology*. Vol. 72. P. 125–135.
8. Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M. N., Wani A. S., Pichtel J., Ahmad A. 2012. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior*. Vol. 7. P. 1456–1466.
9. Häusler R. E., Ludwig F., Krueger S. 2014. Amino acids – a life between metabolism and signaling. *Plant Science*. Vol. 229. P. 225–237.
10. Forde B. G., Lea P. J. 2007. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 58. No. 9. P. 2339–2358.
11. Jia Y., Zou D., Wang J., Sha H., Liu H., Inayat M. A., Sun J., Zheng H., Xia N., Zhao H. 2017. Effects of γ -aminobutyric acid, glutamic acid, and calcium chloride on rice (*Oryza sativa* L.) under cold stress during the early vegetative stage. *Journal of Plant Growth Regulation*. Vol. 36. P. 240–253.
12. Kavi Kishor P. B., Sangam S., Amrutha R. N., Laxmi P. S., Naidu K. R., Rao K. R. S. S., Rao S., Reddy K. J., Theriappan P., Sreenivasulu N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation,

- uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*. Vol. 88. No. 3. P. 424–438.
13. Kazan K. 2015. Diverse roles of jasmonates and ethylene in abiotic stress tolerance. *Trends in Plant Science*. Vol. 20. Issue 4. P. 219–229.
 14. Khan M. A., Gul B., Weber D. J. 2004. Action of plant growth regulators and salinity on seed germination of *Ceratoides lanata*. *Canadian Journal of Botany*. Vol. 82. P. 37–42.
 15. Khan M. I. R., Fatma M., Per T. S., Anjum N. A., Khan N. A. 2015. Salicylic acid induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Frontiers in Plant Science*. Vol. 6. 17 p.
 16. Kunert K. J., van Wyk S. G., Cullis C. A., Vorster B. J., Foyer C. H. 2015. Potential use of phytochemicals in crop improvement, with a particular focus on legumes. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 66. P. 3559–3570.
 17. Mazzucotelli E., Tartari A., Cattivelli L., Forlani G. 2006. Metabolism of gamma-aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 57. P. 3755–3766.
 18. McClinchey S. L., Kott L. S. 2008. Production of mutants with high cold tolerance in spring canola (*Brassica napus*). *Euphytica*. Vol. 162. P. 18–27.
 19. Okumoto S., Funck D., Trovato M., Forlani G. 2016. Editorial: Amino acids of the glutamate family: Functions beyond primary metabolism. *Frontiers in Plant Science*. Vol. 7. Article 318.
 20. Peleckis R., Burbulis N., Blinstrubienė A., Jonytienė V. 2017. Veiksniai, lemiantys žieminio rapso (*Brassica napus* L.) ūglių atsparumą šalčiui *in vitro*. *Žemės ūkio mokslai*. T. 24. Nr. 2. P. 37–43.
 21. Pociecha E., Płazek A., Janowiak F., Zwierzykowski Z. 2009. ABA level, proline and phenolic concentration, and PAL activity induced during cold acclimation in androgenic *Festulolium* forms with contrasting resistance to frost and pink snow mould (*Microdochium nivale*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol. 73. P. 126–132.
 22. Raudonius S. 2017. Application of statistics in plant and crop research: important issues. *Žemdirbystė–Agriculture*. Vol. 104. No. 4. P. 377–382.
 23. Sørensen M. T., Danielsen V. 2006. Effects of the plant growth regulator, chlormequat, on mammalian fertility. *International Journal of Andrology*. Vol. 29. P. 129–133.
 24. Velička R., Anisimovienė N., Pupalienė R., Janauskienė J., Butkevičienė L. M., Kriauciūnienė Z. 2010. Preparation of oilseed rape for over-wintering according to autumnal growth and cold acclimation period. *Žemdirbystė–Agriculture*. Vol. 97. No. 3. P. 69–76.
 25. Verslues P. E., Sharma S. 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book*. Vol. 8. 23 p. Available at: <https://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0140>
 26. Walch-Liu P., Liu L. H., Remans T., Tester M., Forde B. G. 2006. Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. Vol. 47. P. 1045–1057.
 27. Walch-Liu P., Forde B. G. 2008. Nitrate signalling mediated by the NRT1.1 nitrate transporter antagonises L-glutamate-induced changes in root architecture. *The Plant Journal*. Vol. 54. No. 5. P. 820–828.
 28. Wang K., Lu C., Chang S. 2011. Evaluation of acute toxicity and teratogenic effects of plant growth regulators by *Daphnia magna* embryo assay. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 190. Issues 1–3. P. 520–528.
 29. Wang G., Zhang J., Fan X., Sun X., Qin H., Xu N., Zhong M., Qiao Z., Tang Y., Song R. 2014. Proline responding1 plays a critical role in regulating general protein synthesis and the cell cycle in maize. *The Plant Cell*. Vol. 26. Issue 6. P. 2582–2600.

**Remigijus Peleckis, Natalija Burbulis,
Aušra Blinstrubienė**

IMPROVEMENT OF COLD TOLERANCE OF WINTER OILSEED RAPE BY EXOGENOUS AMINO ACIDS

Summary

Research was carried out at the Experimental Station of Aleksandras Stulginskis University on *Calc(ar)i-Endohypogleyic Luvisol (LVg-n-w-cc)* during 2014–2017. The effect of exogenous amino acids on the cold tolerance of the linear cultivar ‘Cult’ of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. spp. *oleifera biennis* Metzg.) was studied. In autumn the plants were sprayed with L-proline and L-glutamic acid one or two times. The biometric parameters of winter oilseed rape prepared for wintering, the amount of endogenous proline and over-wintering of plants were evaluated. It was determined that exogenous L-proline and L-glutamic acid stimulated the growth of green mass of the winter rape surface, accumulation of dry matter and increase of the root neck diameter in the autumn period. The investigated concentrations of L-proline and L-glutamic acid stimulated a more intensive synthesis of endogenous proline in winter oilseed rape plants during the preparation for wintering. The highest percentage of over-wintering has been determined in the variants where in the autumn plants were sprayed two times with 30 mM l⁻¹ L-proline or 1.5 M l⁻¹ L-glutamic acid.

Keywords: cold tolerance, exogenous amino acids, endogenous proline, winter oilseed rape