

MAŁGORZATA GRUDKOWSKA¹**KRZYSZTOF WIŚNIEWSKI**¹**BARBARA ZAGDAŃSKA**^{1,2}¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie² Katedra Biochemii Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Aktywność endoproteinaz cysteinowych wskaźnikiem odporności pszenicy na mróz i suszę

Cysteine endoproteinases activity as an indicator of wheat resistance to frost and drought

Poziom mrozoodporności siewek pszenicy ozimej dwudziestu odmian i rodów zaaklimatyzowanych do niskiej temperatury jest silnie dodatnio skorelowany z poziomem tolerancji odwodnienia ($r = 0,862$) tych siewek. Aktywność endoproteinaz cysteinowych siewek kontrolnych, nie zaaklimatyzowanych do niskiej temperatury, nie wykazywała korelacji z poziomem odporności na mróz badanych siewek ($r = -0,0028$). Po 10-dniowym okresie aklimatyzacji, aktywność enzymów odmian odpornych nie ulegała zmianie lub obniżała się, a odmian nieodpornych zwiększała się i była wysoce negatywnie skorelowana z poziomem mrozoodporności badanych odmian ($r = -0,853$). Przeprowadzone doświadczenia wskazują, że poziom indukcji endoproteinaz cysteinowych odzwierciedla poziom odporności na mróz i suszę pszenicy ozimej w fazie siewki. Opisana metoda może służyć jako prosty test laboratoryjny do porównawczej oceny odporności materiałów hodowlanych pszenicy ozimej na te dwa powszechne stresy środowiskowe.

Słowa kluczowe: endoproteinyzazy cysteinowe, mrozoodporność, odporność na suszę, pszenica ozima

Frost resistance of seedlings of twenty cultivars and strains of winter wheat was significantly positively correlated with their dehydration tolerance ($r = 0.862$). Cysteine endoproteinase activity of control seedlings, non-acclimated to low temperature, was not correlated with the level of frost resistance ($r = -0.0028$). After 10 day acclimation period, cysteine endoproteinase activity in seedlings of frost resistant cultivars remained unchanged or even lowered, but increased in seedlings of susceptible cultivars and was significantly negatively correlated with the level of frost resistance ($r = -0.853$). The experiments showed that the extent of cysteine endoproteinase induction reflects the level of resistance of winter wheat to frost and water deficiency in the seedling phase. The described procedure seems to be useful as a simple laboratory test for comparative estimation of the resistance level of breeding materials of winter wheat to the both most common abiotic stresses.

Key words: cysteine endoproteinases, drought resistance, frost resistance, winter wheat

WSTĘP

Degradacja białek jest ważnym mechanizmem pozwalającym roślinie utrzymać homeostazę, szczególnie podczas rozwoju lub odpowiedzi na działanie niekorzystnych czynników środowiska. Odpowiedź metaboliczna rośliny wyraża się zmianami w ilości i składzie białek rozpuszczalnych (Callis, 1995). Rośliny potrafią syntetyzować aminokwasy *de novo*, ale znaczna część nowo powstających białek pochodzi z recyklicacji aminokwasów (Vierstra, 1993). Tak więc proteoliza wydaje się być podstawowym mechanizmem umożliwiającym roślinie przebudowę białek komórkowych. Chociaż stresy środowiskowe powodują obniżenie intensywności syntezy białek to równocześnie powodują zwiększenie syntezy różnorodnych białek stresowych umożliwiających roślinie przetrwać okres niesprzyjający wegetacji i zapobiegając powstawaniu nieodwracalnych uszkodzeń (Callis, 1995; Zhu, 2001). Proteoliza jest złożonym procesem, w który zaangażowanych jest wiele enzymów hydrolitycznych (Zagdańska, 2001). W świetle najnowszych badań najważniejszym typem endoproteinaz wydają się być endoproteinazy cysteinowe, gdyż enzymy te odpowiedzialne są, między innymi za aktywną odpowiedź roślin na działanie różnych stresów środowiskowych zarówno biotycznych, jak i abiotycznych (Grudkowska i Zagdańska, w druku).

W odpowiedzi na deficyt wody aktywność endoproteinaz cysteinowych zwiększa się (Guerrero i in., 1990; Jones i Mullet, 1995; Zagdańska i Wiśniewski, 1996; Vincent i Brewin, 2000; Wiśniewski i Zagdańska, 2001). Podobną indukcję endoproteinaz cysteinowych obserwowano w przypadku niskiej (chłodowej) temperatury działającej na rośliny pomidora (Schaffer i Fisher, 1988, 1990). Zwiększenie ekspresji genu kodującego endoproteinazę cysteinową w owocach pomidora pod wpływem niskiej temperatury (Schaffer i Fischer, 1988, 1990), genów kodujących endoproteinazy cysteinowe u grochu pod wpływem zmniejszającego się turgoru (Guerrero i in., 1990) oraz zwiększenie aktywności endoproteinaz cysteinowych kodowanych przez geny *rd* przez wzrastający deficyt wody w pędach *Arabidopsis thaliana* (Koizumi i in., 1993) wskazują, że endoproteinazy mogą zmieniać metabolizm poprzez przyspieszenie obrotu białek (protein turnover) lub aktywować specyficzne białka. Ponadto przypuszcza się, że enzymy te mogą degradować białka występujące w wakuolach organów wegetatywnych, a zwiększone stężenie aminokwasów prowadzi do obniżania potencjału wody i tym samym ułatwia roślinie dostosowanie osmotyczne (Guerrero i in., 1990). Można też przypuszczać, że aminokwasy uzyskane z hydrolizy białek są wykorzystywane do syntezy wielu białek indukowanych przez stres, np. akwaporyn ułatwiających roślinie funkcjonowanie w warunkach stresu.

Dlatego celem obecnych doświadczeń było sprawdzenie na szerszym materiale roślinnym, czy stopień indukcji endoproteinaz cysteinowych odzwierciedla poziom odporności badanych genotypów pszenicy ozimej na suszę i czy inny stres środowiskowy, np. niska temperatura powoduje podobną indukcję endoproteinaz cysteinowych, zależną od poziomu tolerancji mrozowej.

MATERIAŁ I METODY

Materiał roślinny

Doświadczenia przeprowadzono na dwudziestu odmianach i rodach pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) rosnących w warunkach fitotronowych (kamery KTLK 1250 firmy Ilka). Ziarniaki (w czterech powtórzeniach po 25 szt.) wykładano na paski wilgotnej bibuły filtracyjnej jeden obok drugiego w odległości 1 cm od górnej krawędzi, zarodkami w dół. Nasiona przykrywano takimi samymi paskami bibuły, a następnie zwijano je w rulony i wstawiano pionowo w pudełka polistyrenowe zawierające wodę destylowaną. Po skiełkowaniu ziarniaków wodę zastępowano pożywką Knoppa wzbogaconą mikroelementami wg Hoaglanda. W ciągu pierwszych 10 dni wzrostu utrzymywano temperaturę 18° C w dzień i 14° C w nocy, przy 16 godzinnym fotoperiodzie i natężeniu światła ok. 120 W 1 m⁻² i wilgotności względnej powietrza 70–80%. Następne 10 dni wzrostu przebiegało w temperaturze +2° C, 24-godzinnym fotoperiodzie i przy natężeniu światła około 40 W m⁻² i wilgotności względnej powietrza 80%. (hartowanie).

Oznaczenie tolerancji odwodnienia

Deficyt wodny tkanki oznaczono na odciętych od rośliny blaszkach liściowych siewek pszenicy po okresie hartowania. Tkankę roślinną umieszczono nad bezwodnym CaCl₂ w eksykatorze próżniowym i odwadniano w próżni (2,7 x 10³ Pa) przez 2 i 4 godziny. Deficyt wody badanych liści określono metodą Stockera (1929). Wielkość deficytu wodnego wyliczono ze wzoru:

$$WSD = \frac{W_s - W_a}{W_s - D_w} \times 100\%,$$

W_s — zawartość wody w tkance przy pełnym turgorze,

W_a — aktualna zawartość wody w tkance,

D_w — sucha masa tkanki.

Uwadnianie liścia do pełnego turgoru prowadzono w ciemności przez 24 godziny w kamerze wysyczonej parą wodną w temperaturze 20–22° C. Obliczoną w ten sposób wartość deficytu wodnego wyrażono w procentach.

Ocenę uszkodzeń wywołanych deficytem wodnym przeprowadzono metodą konduktometryczną określając ilość elektrolitów wewnątrzkomórkowych uwolnionych z tkanki na skutek uszkodzenia komórek (Długokęcka i Kacperska-Palacz, 1978). Uszkodzoną tkankę (pod wpływem odwadniania w eksykatorze próżniowym) przetrzymywano w probówce z wodą destylowaną przez 24 godziny w temp. 5° C i wypłukiwano z niej elektrolity uwolnione z komórek. Następnie mierzono przewodnictwo elektrolityczne wycieku przy pomocy konduktometru i porównywano do ogólnej ilości elektrolitów zawartych w tkance. Ogólną ilość elektrolitów w tkance określono po zabiciu wszystkich komórek przez zagotowanie. Pomiar przewodnictwem otrzymanego roztworu przeprowadzono po schłodzeniu do temperatury pokojowej. Wskaźnik uszkodzenia tkanki (I_D) obliczono ze wzoru (Długokęcka i Kacperska-Palacz, 1978):

$$I_D = \frac{L_D - L_O}{1 - L_D} \times 100\%,$$

L_D — wyciek elektrolitów z tkanki poddanej desykacji w stosunku do ogólnej zawartości elektrolitów,

L_O — wyciek elektrolitów z tkanki kontrolnej w stosunku do ogólnej zawartości elektrolitów.

Z wykresu przedstawiającego zależność stopnia uszkodzenia tkanki od wielkości deficytu wodnego odczytywano za pomocą interpolacji wartość deficytu wodnego powodującego 50% uszkodzeń tkanki (krytyczny deficyt wodny).

Oznaczenie poziomu mrozoodporności

Ocenę mrozoodporności badanych form pszenicy ozimej przeprowadzono metodą laboratoryjną (Zagdańska i Rybka, 1984).

Po 10-dniowym okresie hartowania rośliny przemrażano w temperaturze — 6° C przez 20 godzin przy spadku temperatury 1,5° C·godz⁻¹. Po rozmrożeniu roślin (z szybkością wzrostu temperatury 1,5° C·godz⁻¹) rośliny przetrzymywano przez 24 godziny w temperaturze +2° C, a następnie przez dalsze 24 godziny w temperaturze +10° C, przy natężeniu światła ok. 40 W 1 m⁻² i 24-godzinnym fotoperiodzie. Ocenę przeżywalności siewek prowadzono wizualnie, przyjmując za kryterium odrost liści i korzeni po 8–9 dniach po przemrożeniu. Wyniki podano w procentach przeżycia, porównując liczbę żywych roślin po przemrożeniu z liczbą zdrowych siewek przed przemrożeniem.

Oznaczenie aktywności endoproteinaz cysteinowych

Około 1 g liści homogenizowano w ciepłym azocie i enzymy ekstrahowano 5 ml oziębionego buforu ekstrakcyjnego (50 mM TRIS-HCl pH 7,2) zawierającego 0,2 g nierozpuszczalnego PVP i 5 mM merkaptetanol. Ekstrakt filtrowano i wirowano przez 10 min przy 15000 g w 4° C. Aktywność enzymatyczną oznaczano w supernatancie. Aby oznaczyć aktywność endoproteinaz cysteinowych, do 0,5 ml 0,25 M buforu cytrynianowego (pH 5,0) dodawano 0,1 ml ekstraktu enzymatycznego i 0,1 ml 1,0 mM jodooctanu (inhibitor endoproteinaz cysteinowych). Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37° C. Po godzinnej inkubacji, do mieszaniny dodawano 0,3 ml 0,5% azokazeiny. Po 2-godzinnej inkubacji w temperaturze 37° C, reakcję przerywano przez dodanie 2 ml 12% kwasu tróchlorooctowego (TCA). Całkowitą aktywność azokazeinolityczną mierzono następująco: do 0,6 ml 0,25 M buforu cytrynianowego dodawano 0,1 ml ekstraktu enzymatycznego oraz 0,3 ml 0,5% azokazeiny i mieszaninę inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 37° C. Aktywność proteolityczną mierzono spektrofotometrycznie przy 340 nm. Za jednostkę aktywności proteolitycznej przyjęto ilość enzymu powodującego 0,01 przyrost absorbancji. Zawartość białka w ekstrakcie oznaczano metodą Bradforda (1976).

Opracowanie statystyczne wyników

Wszystkie wyniki zostały poddane analizie statystycznej posługując się programem komputerowym Statistica 5.97.

WYNIKI

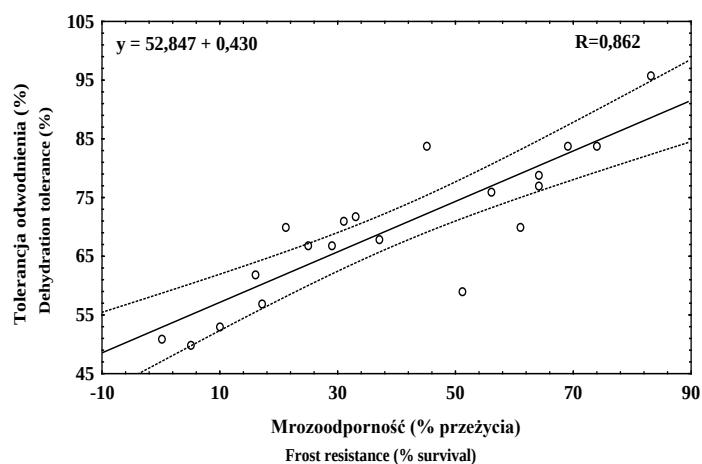
Spośród badanego materiału (18 rodów z doświadczeń i 2 odmiany) najwyższą mrozoodpornością ocenianą metodą laboratoryjną charakteryzował się ród OLH 9109 (tab. 1). Odmiana Kobra, stosowana jako jeden ze wzorców mrozoodporności w ocenie tej cechy charakteryzowała się poziomem mrozoodporności trochę wyższym od przeciętnej (64% przeżycia). Wśród rodów o niskiej mrozoodporności (przeżywalność siewek $\leq 20\%$) znalazły się cztery rody z Oleśnicy. Zdolność pszenicy do tolerowania odwodnienia, oznaczona również po 10-dniowym okresie hartowania tzn. w tej samej fazie rozwoju roślin była najwyższa dla rodu o najwyższej mrozoodporności (tab. 1). Podobnie odporność badanego materiału na odwodnienie była najniższa u rodów wykazujących najniższą mrozoodporność. Przeprowadzona analiza regresji wykazała, że istnieje ścisła zależność pomiędzy odpornością pszenicy ozimej na mróz i suszę (rys. 1). Wyliczony przy pomocy programu komputerowego współczynnik korelacji dla tych dwóch cech wyniósł 0,862.

Tabela 1

Mrozoodporność (przeżywalność roślin w %) i tolerancja odwodnienia (krytyczny deficyt wodny w %) odmian wzorcowych i rodów hodowlanych pszenicy ozimej
Frost resistance (plant survival in %) and dehydration tolerance (critical WSD in %) of standard cultivars and strains of winter wheat

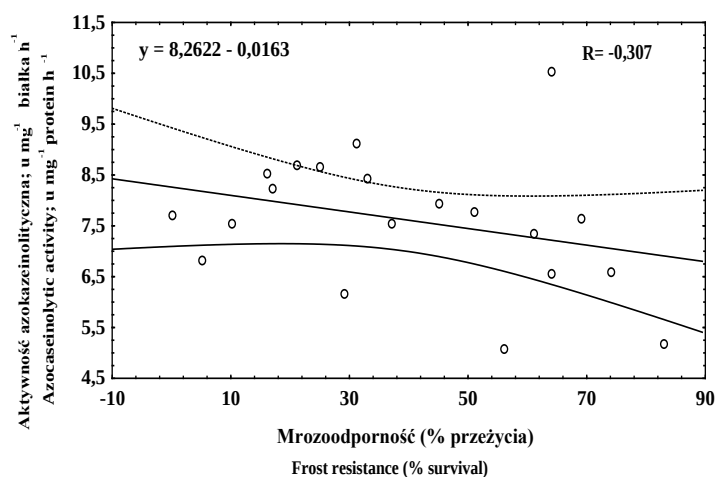
Odmiana / Ród Cultivar / Strain	Przeżywalność roślin Survival of plants (%)	Krytyczny WSD Critical WSD (%)	Odmiana / Ród Cultivar / Strain	Przeżywalność roślin Survival of plants (%)	Krytyczny WSD Critical WSD (%)
OLH 9109	83	96	OLH 9142	33	72
KOC 3473/94	74	84	Jawa	31	71
KOC 3473/94	69	84	STH 775	29	67
Kobra	64	79	STH 724	25	67
OLH 9173	64	77	SMH 5476	21	70
SOD 3387/92	61	70	SMH 3648	17	57
STH 572	56	76	OLH 9120	16	62
STH 731	51	59	OLH 9557	10	53
STH 152	45	84	OLH 9131	5	50
OLH 9558	37	68	OLH 9513	0	51

Intensywność proteolizy, mierzona jako aktywność azokazeinolityczna w ekstraktach otrzymanych z siewek badanych rodów i odmian, wahała się w granicach 5,0–10,5 u mg^{-1} białka·h⁻¹ w siewkach roślin kontrolnych tj. nie aklimatyzowanych do warunków mrozu (rys. 2). Ogólna aktywność proteolityczna tych siewek nie wykazywała żadnego związku z oznaczoną wcześniej mrozoodpornością ($r = -0,307$). Poddanie siewek roślin kontrolnych 10-dniowemu działaniu niskiej dodatniej temperatury nie spowodowało istotnych różnic w aktywności azokazeinolitycznej badanego materiału, która pozostawała na poziomie 5,5–10,5 u mg^{-1} białka·h⁻¹ (rys. 3). Współczynnik korelacji pomiędzy aktywnością proteolityczną badanych rodów i odmian a poziomem ich mrozoodporności zwiększył się tylko nieznacznie ($r = 0,356$) i pozostawał na niskim poziomie.



Rys. 1. Zależność pomiędzy mrozoodpornością (wyrażoną w % przeżywalności siewek) a tolerancją odwodnienia (wyrażoną w % jako krytyczny deficyt wody) w badanych odmianach i rodach pszenicy ozimej

Fig. 1. Relationship between frost resistance (expressed in % as seedling survival) and dehydration tolerance (expressed in % as critical WSD) of cultivars and strains of winter wheat

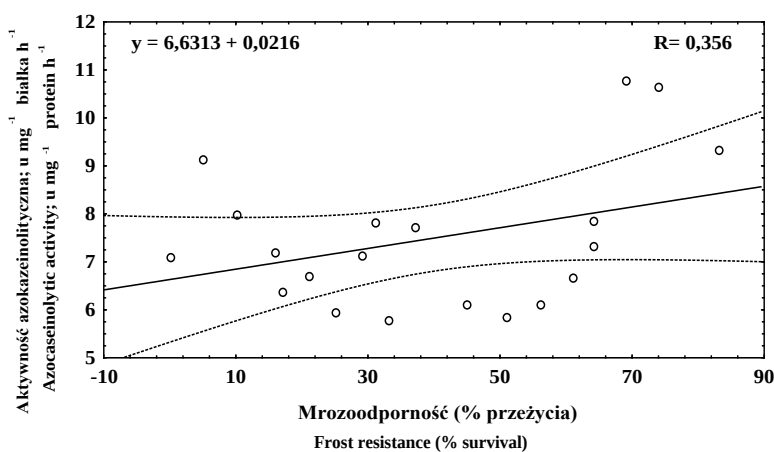


Rys. 2. Aktywność azokazeinolityczna (wyrażona w jednostkach aktywności na mg białka na godzinę) w siewkach roślin kontrolnych

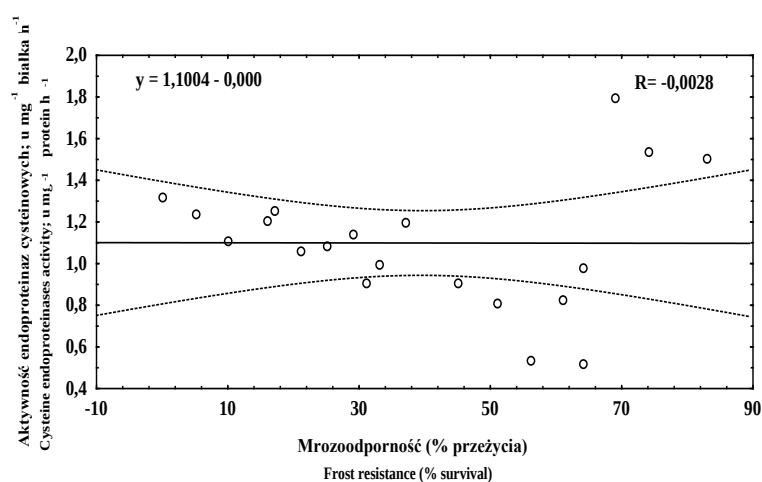
Fig. 2. Azocaseinolytic activity (expressed in units $\text{mg}^{-1} \text{protein h}^{-1}$) in control non-acclimated seedlings

Aktywność endoproteinaz cysteinowych wahała się w granicach $0,5\text{--}1,8 \text{ u mg}^{-1} \text{ białka} \cdot \text{h}^{-1}$ w siewkach roślin kontrolnych (rys. 4). Aktywność tych enzymów nie wykazywała żadnego związku z poziomem odporności na mróz i suszę badanego materiału. W wyniku natomiast harowania (aklimatyzacji), tj. zwiększenia odporności na mróz w aktywności endoproteinaz cysteinowych nastąpiły widoczne zmiany (rys. 5). U form

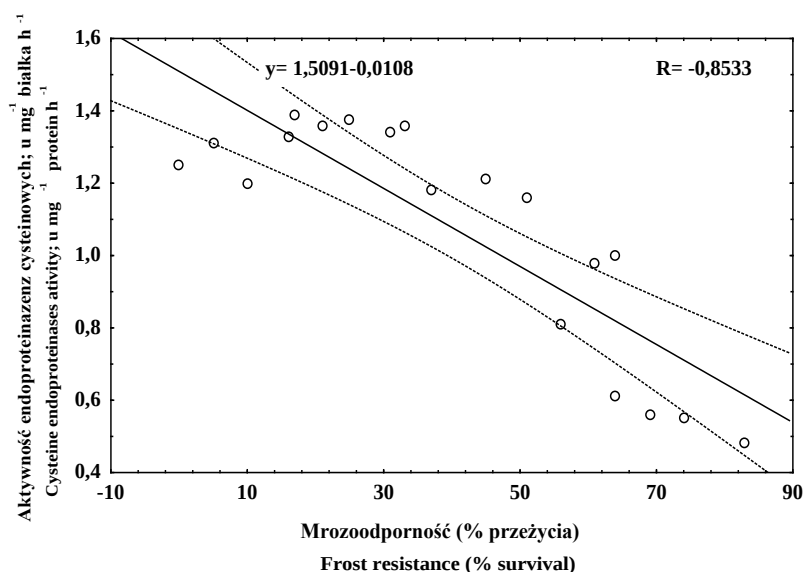
wrażliwych na mróz (przeżywalność do 30%) i suszę (krytyczny deficyt wody około 65%) aktywność enzymów nieznacznie zwiększyła się do $1,4 \text{ u mg}^{-1} \text{ białka} \cdot \text{h}^{-1}$, natomiast u rodów i odmian odpornych zmniejszyła się prawie trzykrotnie do około $0,4\text{--}0,6 \text{ u mg}^{-1} \text{ białka} \cdot \text{h}^{-1}$. Przeprowadzona analiza regresji wykazała, że istnieje ścisła ujemna korelacja pomiędzy aktywnością endoproteinaz cysteinowych a poziomem mrozoodpornością i odporności na suszę badanych odmian i rodów pszenicy ozimej zaaklimatyzowanych do niskiej temperatury ($r = -0,853$).



Rys. 3. Aktywność azokazeinolityczna w hartowanych siewkach pszenicy
Fig. 3. Azocaseinolytic activity in acclimated wheat seedlings



Rys. 4. Aktywność endoproteinaz cysteinowych w siewkach roślin kontrolnych
Fig. 4. Cysteine endoproteinases activity in control non-acclimated seedlings



Rys. 5. Aktywność endoproteinaz cysteinowych w hartowanych siewkach pszenicy
Fig. 5. Cysteine endoproteinases activity in acclimated wheat seedlings

DYSKUSJA

Mrozoodporność nie jest cechą konstytutywną roślin, ale indukowaną w odpowiedzi na niską dodatnią temperaturę. Takie przystosowanie do przeżycia mrozu, określane jako hartowanie (zabieg doświadczalny) lub aklimatyzacja (zachodząca w warunkach naturalnych) jest nieodłącznym elementem testów przeprowadzanych dla oceny mrozoodporności (Zagdańska i Rybka, 1984; Gut i Witkowski, 1987; Rybka, 1992). Porównanie różnych metod oceny mrozoodporności wykazało, że różnice w ocenie wynikają jedynie z warunków w jakich zachodzi aklimatyzacja roślin (Rybka i in., 1994). W przypadku laboratoryjnej metody oceny mrozoodporności ten problem jest pominięty, gdyż hartowanie zachodzi w takich samych warunkach dla wszystkich badanych form pszenicy ozimej. Odporność na suszę zależy głównie od zdolności rośliny do tolerowania odwodnienia czyli od możliwości znoszenia skutków deficytu wody albo od efektywności naprawy uszkodzeń powstałych wskutek odwodnienia. Jednym z kryteriów oceny zdolności tkanki do tolerowania odwodnienia jest wielkość tzw. krytycznego deficytu wody, tj. takiego deficytu (wyrażonego w procentowej utracie wody przez badaną tkankę w stosunku do całkowitej ilości wody w tkance w pełnym turgorze), który powoduje 50% uszkodzeń tkanki ocenianych poziomem wycieku elektrolitów wewnątrzkomórkowych uwalnianych do środowiska (woda redestylowana) w wyniku powstania uszkodzeń dehydracyjnych (Zagdańska, 1992). Taka ocena zdolności tkanki do tolerowania odwodnienia wydaje się być najbardziej znaczącym wskaźnikiem aktywności metabolicznej rośliny i możliwości przeżycia w warunkach suszy. Wielkość krytycznego deficytu wody wykazuje

dużą zgodność ze spadkiem plonu pszenicy jarej (Kozhushko, 1976; Zagdańska i Pacanowska, 1976; Blum, 1988).

Wysoki stopień korelacji pomiędzy poziomem mrozoodporności badanych form pszenicy ozimej zaaklimatyzowanych do warunków niskiej temperatury a odpornością na suszę (tolerancja odwodnienia) jest potwierdzeniem wcześniejszych obserwacji (Levitt, 1980; Wiśniewski i in., 1997; Thomashow, 1998). Obniżanie się temperatury otoczenia powoduje silne odwodnienie protoplastu, którego wynikiem może być denaturacja białek prowadząca do nieodwracalnych uszkodzeń komórki (Callis, 1995; Thomashow, 1998; 1999). Zwiększona ekspresja genów regulowanych przez czynnik transkrypcyjny CBF (C-repeat/dehydration-responsive element binding factor) wpłynęła na podwyższenie tolerancji mrozowej i tolerancji odwodnienia *Arabidopsis thaliana* (Jaglo-Ottosen i in., 1998; Liu i in., 1998; Kasuga i in., 1999; Gilmour i in., 2000) oraz rzepaku (Jaglo i in., 2001). Podobnie badania przeprowadzone w wielu laboratoriach wykazują, że zarówno mróz jak i susza powodują praktycznie takie same zmiany w ekspresji genów i jak dotąd nie znaleziono genów, których zmieniona ekspresja różnicuje odpowiedź rośliny na oba stresy (Ingram i Bartels, 1996; Thomashow, 1999).

Prezentowane wyniki jednoznacznie wykazały, że stopień indukcji endoproteinaz cysteinowych odzwierciedla poziom odporności pszenicy ozimej na deficyt wody i poziom tolerancji mrozowej. Obserwacje te, przeprowadzone na życzenie hodowców dla pełniejszego uwiarygodnienia przeprowadzonego testu, zostały potwierdzone na 35 odmianach pszenicy ozimej pochodzących z kolekcji roboczej Zakładu Roślin Zbożowych IHAR w Krakowie (sprawozdanie za 2001 rok)). Wiadomo, że dehydratacja komórki, spowodowana zarówno działaniem niskiej temperatury na roślinę, suszą glebową lub atmosferyczną, a także zasoleniem zazwyczaj prowadzi do zmian w natywnej konformacji białek lub do utraty ich aktywności. Dlatego zdolność rośliny do tolerowania odwodnienia musi być związana z efektywnymi mechanizmami reperującymi uszkodzone białka, usuwającymi zdenaturowane białka i w ten sposób zapobiegającymi powstawaniu uszkodzeń metabolicznych oraz usuwającymi białka zbędne tzn. takie, które w określonej sytuacji metabolicznej przestają odgrywać swoją specyficzną rolę (Ingram i Bartels, 1996). Odpowiedzią metaboliczną rośliny na stresy środowiskowe jest więc indukcja endoproteinaz cysteinowych. Jednakże badania przeprowadzone na dziesięciu odmianach pszenicy jarej różniących się zdolnością do tolerowania odwodnienia i do aklimatyzacji wykazują, że wysoka tolerancja odwodnienia pszenicy zarówno w fazie strzelania w źdźbło, jak i kłoszenia wiąże się ze zmniejszoną, a nie ze zwiększoną aktywnością endoproteinaz cysteinowych (Wiśniewski i Zagdańska, 2001). Cytowane wyniki są dodatkowo potwierdzone przez obserwacje, że odmiany pszenicy ozimej o najwyższej mrozoodporności i odporności na suszę charakteryzowały się trzykrotnie niższą aktywnością endoproteinaz cysteinowych. Mechanizm obserwowanych zmian dla rośliny nie jest w pełni wyjaśniony.

Przeprowadzone badania na znacznej liczbie (65 odmian i rodów pszenicy ozimej i jarej) o różnej tolerancji na suszę i na oba stresy jednocześnie (55 odmian i rodów pszenicy ozimej) mogą wskazywać na udział innych niż endoproteinazy cysteinowe układów proteolitycznych współdziałających i kompensujących obniżoną aktywność endoproteinaz

cysteinowych u odmian odpornych. Może nimi być szlak degradacji białek zależny od ATP (Wiśniewski i Zagdańska, 2001; Zagdańska, 2001). Nie jest jednak wykluczone, że odmiany tolerancyjne nie wymagają tak głębokiej przebudowy swoich białek (Fukuda, 1996). Jakkolwiek jednak proponowany test oparty jest na negatywnej korelacji z tolerancją pszenicy na stresy abiotyczne to niewątpliwie jest on bardzo przydatny dla hodowców, gdyż umożliwia szybką selekcję materiałów hodowlanych pszenicy odpornych w fazie siewki zarówno na mróz jak i suszę. Zaletą proponowanej metody jest stosunkowo niski koszt oznaczeń, szybkość i nieskomplikowany, niezbyt kosztowny sprzęt laboratoryjny.

LITERATURA

- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248—254.
- Blum A. 1988. *Plant Breeding for Stress Environments*. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Callis J. 1995. Regulation of protein degradation. *The Plant Cell* 7: 845—857.
- Długokęcka E., Kacperska-Palacz A. 1978. Re-examination of electrical conductivity method for estimation of drought injuries. *Biol. Plant.* 20: 262—267.
- Fukuda H. 1996. Xylogenesis: initiation, progression and cell death. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 299—325.
- Gilmour S.J., Sebolt A.M., Salazar M.P., Everard J.D., Thomashow M.F. 2000. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activators mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.* 124: 1854 — 1865.
- Gut M., Witkowski E. 1987. Badania nad mrozoodpornością rodów hodowlanych pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) w latach 1982–85. *Cz. I. Biul. IHAR* 161: 3 — 10.
- Grudkowska M., Zagdańska B. Roślinne endoproteiny cysteinowe i ich różnorodne funkcje fizjologiczne. *Biul. IHAR* 223/224:
- Guerrero F. D., Jones J. T., Mullet J. E. 1990. Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes. *Plant Mol. Biol.* 15: 11 — 26.
- Ingram J., Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377 — 403.
- Jaglo-Ottosen K. R., Gilmour S. J., Zarka D. G., Schabenberger O., Thomashow M. F. 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104 — 106.
- Jaglo K. R., Kleff S., Amundsen K. L., Zhang X., Haake V., Zhang J. Z., Deits T., Thomashow M. F. 2001. Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.* 127: 910 — 917.
- Jones J. T., Mullet J. E. 1995. A salt and dehydration- inducible pea gene, *Cyp15a*, encodes a cell-wall protein with sequence similarity to cysteine proteases. *Plant Mol. Biol.* 28: 1055 — 1065.
- Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *New Biotechnol.* 17: 287 — 291.
- Koizumi M., Yamaguchi- Shinozaki K., Tsuji H., Shinozaki K. 1993. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 129: 175 — 182.
- Kozhushko N. N. 1976. Metody ocenki ustoicivosti rastienii k nieblagoprijatnym usloviam sriedy. Udovenko N.Z., ed. Kolos, Leningrad.
- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. 2nd ed., Academic Press, New York.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two

- cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*: 10: 1391 — 1406.
- Rybka Z. 1992. Fizjologiczno-biochemiczne kryteria oceny mrozoodporności roślin uprawnych. *Biul. IHAR* 183: 31— 36.
- Rybka Z., Zagdańska B., Gut M., Witkowski E. 1994. Przydatność metod oceny mrozoodporności materiałów hodowlanych pszenicy ozimej. *Biul. IHAR* 192: 59— 68.
- Schaffer M. A., Fischer R. L. 1988. Analysis of mRNAs that accumulate in response to low temperature identifies a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiol.* 87: 431— 436.
- Schaffer M. A., Fischer R. L. 1990 Transcriptional activation by heat and cold of a thiol protease gene in tomato. *Plant Physiol.* 93: 1486 — 1491.
- Stocker O. 1929. Das Wasserdefizit von Gefasspflanzen in versiednen Klimazonen. *Planta* 7: 382 — 387.
- Thomashow M. F. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 118: 1 — 7.
- Thomashow M. F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 575— 599.
- Vierstra R. D. 1993. Protein degradation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 385 — 410.
- Wiśniewski K., Zagdańska B., Prończuk M. 1997. Interrelationship between frost tolerance, drought and resistance to snow mould (*Microdochium nivale*). *Acta Agron. Hung.* 45: 311 — 316.
- Wiśniewski K., Zagdańska B. 2001. Genotype — dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency. *J. Exp. Bot.* 52: 1455 — 1463.
- Zagdańska B., Pacanowska A. 1976. Dehydration tolerance of spring wheat and its relation to plant growth and productivity under soil drought conditions. *Biol. Plant.* 21: 452 — 461.
- Zagdańska B., Rybka Z. 1984. Laboratoryjna metoda oceny mrozoodporności jęczmienia ozimego metodą przemrażania siewek. *Biul. IHAR* 155: 51 — 55.
- Zagdańska B. 1992. Fizjologiczno-biochemiczne kryteria odporności roślin na suszę. *Biul. IHAR* 183: 11 — 19.
- Zagdańska B., Wiśniewski K. 1996. Endoproteinase activities in wheat leaves upon water deficits. *Acta Biochem. Polon.* 43: 512 — 520.
- Zagdańska B. 2001. Mechanizmy degradacji białek i ich znaczenie w odporności roślin na mróz i suszę. *Biul. IHAR* 218/219: 15— 28.
- Zhu J. K. 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion Plant Biol.* 4: 401— 406.