

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra botaniky a fyziologie rostlin



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv exogenní aplikace prolinu na obsah prolinu v
podmínkách vodního stresu**

Diplomová práce

Bc. Martin Zelený
Ekologické zemědělství AME

Ing. Helena Hniličková, Ph.D.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Vliv exogenní aplikace prolinu na obsah prolinu v podmínkách vodního stresu" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2021

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval všem, kteří mě při psaní této práce podporovali. Mé upřímné poděkování patří zejména Ing. Heleně Hniličkové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za její ochotu, vstřícný přístup a za veškerý čas, který mi věnovala. Dále děkuji své rodině, a svým nejbližším, kteří mě podporovali. Poslední poděkování patří KBFR, a jejím pracovníkům za poskytnutí prostor a pomůcek k provedení experimentu.

Vliv exogenní aplikace prolinu na obsah prolinu v podmínkách vodního stresu

Souhrn

Negativní vlivy vnějšího prostředí ovlivňující životní funkce rostlin jsou nazývány stresovými faktory. Stresové faktory zpomalují nejenom životní funkce rostlin, ale následně nepříznivě ovlivňují také výši a kvalitu získávaného produktu. Z celosvětového pohledu jsou nejvýznamnějšími limitujícími faktory rostlinné produkce tzv. abiotické stresory, zejména vodní deficit a sucho. Uvedené nebezpečí rizika půdního sucha či vodního deficitu se nevyhýbá ani České republice, neboť je známo, že srážky jsou nerovnoměrně rozdělené v průběhu roku na vegetaci rostlin, a že existují oblasti, kde hrozí dlouhodobější či trvalé sucho. Proto je cílem práce rozšířit poznatky o vlivech vodního deficitu na vybrané fyziologické charakteristiky polních plodin. Pšenice setá (*Triticum aestivum*), která byla vybrána jako modelová rostlina, byla vystavena stresu vlivem sucha a také exogenní aplikaci aminokyseliny prolin jako hypotetické protistresové složky.

Rostliny byly pěstovány za tepelně řízených podmínek a částečně řízených světelných podmínek v experimentálním skleníku katedry botaniky a fyziologie rostlin FAPPZ ČZU v Praze. Byly sledovány odlišné varianty rostlin z hlediska foliární aplikace kompatibilních solutů, rozdělené mezi stresované a zavlažované. Zavlažovaná varianta bez aplikace prolinu (K), zavlažovaná varianta s aplikací prolinu (KP). Varianta vystavena stresu suchem (S) a stresovaná varianta s aplikací prolinu (SP).

Ze získaných výsledků vyplývá, že je prokazatelný rozdíl v reakci na vodní stres mezi sledovanými parametry po exogenní aplikaci prolinu na obsah prolinu, vodní potenciál, rychlost asimilace CO₂, transpiraci a efektivitu využití vody WUE.

Klíčová slova: prolin, vodní stres, růst, pšenice setá, *Triticum aestivum*

Effect of exogenous application of proline in water stress conditions

Summary

The negative effects of the external environment which are affecting the vital functions of plants are called stress factors. Stress factors slow down not only the mentioned vital functions, but also negatively affect the amount and quality of the product obtained from the plant. From a global perspective, the crucial limiting factors of plant production are the so-called abiotic stressors, particularly water deficit and drought. This risk of soil drought or water deficit is not avoided in the Czech Republic either, as it is known that rainfall is unevenly distributed throughout the year and plant vegetation, and that there are areas where there is a risk of prolonged or even permanent drought. Therefore, the aim of this work is to expand knowledge about the effects of water deficit on selected physiological characteristics of field crops. Wheat (*Triticum aestivum*), which was selected as a model plant, was exposed to drought stress and exogenous application of the amino acid proline as a hypothetical anti-stress component.

The plants were grown under thermally controlled conditions and partially controlled light conditions in the experimental greenhouse of the Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Agrobiography, Food and Natural Resources, University of Life Sciences in Prague. Different variants of plants were observed in terms of foliar application of compatible solutes, divided between stressed and irrigated. Irrigated variant without proline application (K), irrigated variant with proline application (KP). The variant exposed to drought stress (S) and the stressed variant with proline application (SP),

The obtained results show that there is a demonstrable difference in the response to water stress between the monitored parameters after exogenous application of proline to proline content, leaf water potential, rate of CO₂ assimilation, transpiration and WUE water-use efficiency.

Keywords: proline, water stress, wheat, *Triticum aestivum*

1 Obsah

2 Úvod.....	8
3 Vědecká hypotéza a cíle práce.....	11
4 Literární rešerše.....	12
4.1 Stres.....	12
4.2 Vodní stres.....	12
4.2.1 Vliv vodního stresu na fotosyntézu	13
4.2.2 Adaptace rostlin na vodní stres	14
4.3 Prolin	15
4.3.1 Kompatibilní soluty.....	15
4.3.2 Metabolická adaptace prolinu u rostlin pod vlivem stresu.....	16
4.3.3 Biosyntéza prolinu	16
4.3.4 Degradace prolinu	21
4.3.5 Mechanismy obrany prolinu vůči stresu	23
4.3.6 Transport prolinu.....	24
4.3.7 Význam akumulace prolinu u rostlin.....	24
4.3.8 Vliv exogenní aplikace prolinu na rostliny.....	25
4.3.9 Vliv exogenního prolinu na vztahy mezi rostlinami, vodou a fotosyntézou ..	26
4.3.10 Vliv exogenního prolinu na oxidační stres a antioxidační systém.....	26
4.3.11 Vliv exogenního prolinu na rostliny vystavené stresu ze salinity.....	27
4.3.12 Vliv exogenního prolinu na rostliny vystavené stresu z radiace	28
4.3.13 Vliv exogenního prolinu na rostliny vystavené teplotnímu stresu	28
4.3.14 Vliv exogenního prolinu na ostatní metabolity a enzymy.....	29
4.3.15 Toxicita prolinu v rostlinách	30
5 Metodika	31
5.1 Stanovení obsahu volného prolinu	32
5.2 Listový vodní potenciál.....	32
5.3 Listová výměna plynů.....	32
5.4 Efektivita využití vody	33
5.5 Statistické analýzy.....	33
6 Výsledky.....	34
6.1 Obsah prolinu v biomase.....	34
6.2 Vodní potenciál.....	35
6.3 Čistá asimilace CO ₂	36
6.4 Stomatální vodivost	37
6.5 Transpirace	38

5.6 Efektivita využití vody	39
7 Diskuze	40
7.1 Obsah prolinu	40
7.2 Vodní potenciál	40
7.3 Výměna plynů	41
7.4 Efektivita využití vody.....	41
8 Závěr	43
9 Literatura.....	44

2 Úvod

Sucho a salinita jsou dva z hlavních faktorů prostředí, které určují primární produktivitu a distribuci rostlin. Sucho i salinita ovlivňují více než 10 procent orné půdy. V globálním měřítku míry dezertifikace a zasolení rychle rostou a snižují průměrné výnosy většiny široce využívaných plodin o více než 50 procent (Bray et al. 2000). Pochopení tolerance a odolnosti rostlin vůči suchu a salinitě má proto momentálně zásadní význam a tvoří jedno z hlavních výzkumných témat. Rostliny mohou zažívat abiotický stres, který u nich vyvolá vhodné reakce navázané na změnu metabolismu, růstu a vývoje. Genetické regulační obvody zahrnují stresové senzory, signalizační dráhy zahrnující síť protein-protein reakcí, transkripční faktory a také výstupní proteiny nebo metabolity. Klasické šlechtitelské přístupy odhalily, že znaky tolerance vůči stresu jsou hlavně kvantitativní znaky lokusů (QTL), které výrazně ztěžují genetický výběr znaků. Přesto vznikly plodiny odolné vůči stresu velice vysoké kvality, zejména zavedením znaků od planě rostoucích příbuzných, již přizpůsobených stresu.

Vzhledem k tomu, že vodní a solné stresy probíhají často a mohou ovlivnit většinu míst výskytu, rostliny vyvinuly několik strategií, jak se s těmito výzvami vyrovnat: buď adaptačními mechanismy, které jim umožňují přežít nepříznivé podmínky, nebo specifickými růstovými návyky, aby se stresovým podmínkám úplně vyhnuly. Rostliny již odolné vůči stresu mají vyvinuté určité adaptivní mechanismy, které vykazují různé stupně tolerance, jež jsou do značné míry určovány fenotypovou plasticitou. Diferenční toleranci stresu lze připsat rozdílům v reaktivitě rostlin, pokud jde o vnímání stresu, transdukcii signálu a vhodné programy genové exprese nebo jiné nové metabolické dráhy, které jsou omezeny na tolerantní rostliny. Hypotézu, že genetický program tolerance je alespoň do určité míry přítomen i u netolerantních rostlin, podporuje výsledek pozorování, že postupná aklimatizace citlivých rostlin vede do určité míry k získání tolerance. Tyto rostliny mohou potřebovat postupnou adaptaci pro správnou expresi genů odpovědných za získání tolerance (Zhu 2001).

Naše chápání toho, jak rostliny reagují na solný stres a vodní deficit pokročilo analýzou druhů již odolných vůči stresu, jako je rostlina odolná vůči vysychání *Cratesostigma plantagineum* (Bartels 2001) nebo rostlina odolná vůči soli kosmatec krystalový (*Mesembryanthemum crystallinum*) (Bohnert & Cushman 2000). Navzdory skutečnosti, že výzkum s rostlinou tolerantní k vysychání *C. plantagineum* odhalil další nové aspekty, jako je specifický metabolismus sacharidů a existence genu CDT-1, které nebyly známy u jiných netolerantních druhů rostlin (Bartels 2001), souvislost mezi těmito metabolity a tolerancí stále nejsou plně jasné. Byly provedeny molekulárně genetické studie s huseníčkem rolním (*Arabidopsis thaliana*), která dle nich nevykazuje extrémní toleranci vůči stresu, ale vykazuje mnoho stresových reakcí na molekulární úrovni, a proto byla úspěšně použita pro genetickou disekci drah stresové reakce (Zhu et al. 2002; Shinozaki et al. 2003). Ještě důležitější je zjištění vysoké pravděpodobnosti toho, že extrémně tolerantní modelové rostliny nezískaly jedinečné geny, protože v rostlinné říši jsou všudypřítomny geny relevantní pro stres. Konkrétní vzor genové exprese je často spojován s tolerantním fenotypem a dosud není známo, jak je tohoto dosaženo. To může zahrnovat další molekulární aspekty, jako je organizace chromatinu, které doposud nebyly řádně

prozkoumány. Nedávno byla rostlina tolerantní vůči soli *Thellungiella halophila* představena jako atraktivní modelová rostlina ke studiu molekulární genetiky solné tolerance, protože je blízká příbuzná s huseníčkem rolním (*Arabidopsis thaliana*) a je vhodná pro transformaci, na rozdíl od jiných tolerantních modelových rostlin (Bressan et al. 2001; Zhu 2001; Volkov et al. 2004). Je tedy možné kombinovat hluboké genetické znalosti s projevy extrémní tolerance.

Vystavení stresu vlivem sucha či solí spouští v rostlinách mnoho běžně pozorovaných reakcí. Oba tyto stresy vedou k buněčné dehydrataci, která způsobuje osmotický stres a odstranění vody z cytoplazmy do extracelulárního prostoru, což vede ke snížení objemu cytosolu a vakuol. Dalším důsledkem je produkce reaktivních forem kyslíku, což konsekvntně negativně ovlivňuje buněčné struktury a metabolismus. Včasné reakce na vodní a solný stres jsou do značné míry identické, s výjimkou iontové složky. Mezi tyto podobnosti patří metabolické procesy, jako je například pokles fotosyntézy nebo hormonální procesy, mj. zvyšování hladiny rostlinného hormonu ABA. Vysoké intracelulární koncentrace iontů sodíku a chloridu jsou dalšími problémy doprovázejícími solný stres.

Adaptace na salinitu a suchu je bezpochyby jedním ze složitých procesů, které zahrnují četné změny včetně oslabeného růstu, aktivace/zvýšené exprese nebo indukce genů, přechodného zvýšení hladin ABA, akumulace kompatibilních rozpuštěných látek a ochranných proteinů, zvýšené hladiny antioxidantů a potlačení energeticky náročných cest. Avšak nebylo dosaženo konsenzu při definování klíčových procesů určujících toleranci a sekundárních následných procesů. S rozvojem technologií s vysokou propustností DNA bylo identifikováno několik stovek stresem indukovaných nebo up-regulovaných genů. Hledání genů spojených se stresem mohlo být saturováno alespoň u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Je však známa funkce pouze omezeného počtu genových produktů (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki n.d.; Ingram & Bartels 1996; Bray 1997; Hasegawa et al. 2000; Ramanjulu & Bartels 2002). Bylo hodnoceno několik genů souvisejících se stresem a probíhá několik laboratorních studií týkající se jejich příspěvku k toleranci vůči suchu nebo soli. Pro možné využití těchto genů pro zlepšení tolerance vůči stresu v zemědělských rostlinách prostřednictvím biotechnologických přístupů jsou zapotřebí důkladnější a možná i terénní studie.

Pokud jsou rostliny vystaveny stresovým podmínkám, tak akumulují řadu metabolitů a zejména aminokyselin. Aminokyseliny jsou tradičně považovány za prekurzory a složky proteinů a hrají důležitou roli v metabolismu a vývoji rostlin. Velké množství údajů naznačuje pozitivní korelaci mezi akumulací prolinu a stresem rostlin. Aminokyselina prolin hraje velmi příznivou roli u rostlin, vystavených různým stresovým podmínkám. Kromě toho, že prolin působí jako vynikající osmolyt, má během stresu tři hlavní role, tj. jako chelátor kovu, antioxidantní obranná molekula a signální molekula. Přehled literatury naznačuje, že stresující prostředí vede k nadprodukci prolinu v rostlinách, což opět dodává toleranci vůči stresu udržováním buněčného turgoru nebo osmotické rovnováhy. Dále stabilizací membrán, čímž se zabrání úniku elektrolytu a v neposlední řadě uvedením koncentrací reaktivních forem kyslíku (ROS) do normálních rozmezí, čímž se zabrání oxidačnímu výbuchu v rostlinách. Zprávy naznačují zvýšenou toleranci vůči stresu,

v případě aplikace prolinu exogenně v nízkých koncentracích. Avšak některé zprávy naopak naznačují toxické účinky prolinu, v případě aplikace exogenně ve vyšších koncentracích (Hayat et al. 2012).

Posledních téměř čtyřicet let máme povědomí o prolinové metabolické dráze, o jejíž funkci se domníváme jako o regulační v oblasti oxidačně-redukční homeostázy a přežívání buněk. Nyní značné množství laboratoří ukázalo dopad aminokyseliny prolinu na velký rozsah buněčných procesů, zahrnující bioenergetiku, diferenciaci, růst, životnost a apoptózu (Cecchini et al. 2011b). Je dobře známo, že metabolismus prolinu vede ke zvýšené produkci mitochondriálně reaktivních forem kyslíku prostřednictvím elektronového transportního řetězce a že metabolismus prolinu ovlivňuje přežití buněk a buněčnou smrt u různých druhů (Cecchini et al. 2011b). U rostlin je zvláště dobře zdokumentován ochranný účinek prolinu během stresu (Szabados & Savouré 2010).

3 Vědecká hypotéza a cíle práce

Vodní deficit je v současné době velmi aktuální téma a nadále bude nabývat na významu. Vodní stres výrazně ovlivňuje fyziologické procesy a redukuje výnos. Prolin je významný osmoprotektant, který je schopen zadržovat vodu v buňkách a stabilizovat membrány v podmínkách osmotického stresu a dále je zdrojem uhlíku, dusíku a redukujících ekvivalentů po odeznění stresu. Cílem práce je sledovat vliv foliární aplikace prolinu na obsah metabolitů rostliny a základní fyziologické parametry v podmínkách vodního deficitu.

Hypotézou experimentu je, že prolin, jako osmoprotektant pozitivně ovlivňuje fyziologický stav rostlin v období stresu a snižuje tak jeho dopady na rostlinu.

4 Literární rešerše

4.1 Stres

Stres lze být u rostlin obecně definován jako nepříznivé působení environmentálních vlivů na rostlinu. Na toto působení lze nahlížet z několika směrů, kde první z nich vychází z jednoduché mechaniky. Čím větší silou (v tomto případě stresem) na rostlinu působíme, tím silnější odezvu zaznamenáme. Z tohoto vyplývá, že čím větší stres na rostlinu doléhá, tím se zvýší její poškození. Druhá teorie vypovídá, že stres označuje jakoukoliv změnu okolního prostředí, která může nepříznivě ovlivnit či zpomalit vývoj rostliny (Levitt 1980). Třetí směr na stres nahlíží jako na jakékoli biologické zatížení, které zpomalí či zcela zastaví biologický vývoj organismu (Selye 1973). Jako stresovou můžeme dále označit situaci, kdy se životní podmínky okamžitě významně odchytil od běžných optimálních podmínek k životu. Jedná se o stav či reakci na konkrétní situaci celého organismu (Larcher 2001).

Stresory u rostlin lze krátce rozdělit na biotické a abiotické. Abiotické stresory rostlin ovlivňuje životní prostředí, a zahrnují nevhodné světlo, sucho, přemokření, živiny, teplo, zimu, salinitu apod. Zatímco biotické stresory, jak je již očividné z názvu, jsou biologického rázu, a způsobují je patogeny a býložravci (Zelený 2019).

Během svého životního cyklu jsou rostliny vystaveny různým druhům environmentálního stresu, mezi něž patří zasolení, nedostatek vody, teplotní extrém, koncentrace toxických kovových iontů a UV záření. Tyto faktory prostředí omezují růst a produktivitu rostlin v různé míře, v závislosti na závažnosti stresu. Jednou ze stresových reakcí v rostlinách je stimulovaná produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), např. $\text{OH} \cdot$, $\text{O}_2 \cdot$, H_2O_2 atd. Tyto druhy způsobují značné poškození peroxidací lipidových složek membrány a také přímou interakcí s různými makromolekulami. Buňky přizpůsobily různé mechanismy, aby udržovaly hladinu ROS pod kontrolou. Nízká koncentrace ROS se však podílí na mechanismu přenosu signálu (Foyer & Noctor 2005). Tyto ROS jsou zachycovány nízkomolekulárními antioxidačními metabolity, např. glutathionem, kyselinou askorbovou, α -tokoferolem a antioxidačními enzymy, např. katalázou, askorbátperoxidázou a superoxiddismutázou. Za různých stresových podmínek však tvorba volných radikálů převyšuje celkový buněčný antioxidační potenciál vedoucí k oxidačnímu stresu, který přispívá k nepříznivým účinkům na růst rostlin.

4.2 Vodní stres

Stres ze sucha neboli vodní stres, je primárně způsoben nulovými či malými srážkami v období sucha či dešťů, anebo odchylkou struktury srážek od svého běžného období (Alghabari et al. 2016). Je alarmující, že již na začátku 21. století trpí 10 % celkové půdy zátěží suchem, které lze do konce tohoto století zvýšit až na 40 % (Burke et al. 2006). Uložení sucha způsobilo u rostlin morfofyziologické, anatomické a molekulární změny. Podmínky vodního stresu vážně ovlivňují morfologii plodin tím, že inhibují klíčení semen a časný růst rostlin (Harris et al. 2002; Manivannan et al. 2007). Stres ze sucha snižuje hromadění a dělení rostlinné biomasy, index sklizně a produktivitu plodin (Challinor et al. 2004). Přibližně 70 % výnosu různých plodin bylo sníženo stresem ze sucha (Kaur et al. 2008; Akram et al. 2013). Různé fyziologické aktivity v rostlinách, jako je osmotická úprava, vztahy s vodou, fotosyntéza a dýchání, jsou

narušeny stresem ze sucha (Praba et al. 2009; Anjum et al. 2016). Mechanismus snižování výnosu za podmínek stresu z vody souvisí se sníženou absorpcí světla, nízkou rychlostí fotosyntézy, účinností využívání vody (WUE) a indexem sklizně (Earl & Davis 2003). Míra zranitelnosti plodiny vůči stresu ze sucha závisí na její závažnosti, genotypu rostlin a stupni růstu plodin (Saud et al. 2016). Rostliny přežívají při omezeném zásobování vodou prostřednictvím několika morfofyziologických a biochemických mechanismů, např. změnou jejich architektury, řízením rychlosti růstu, úpravou vodní bilance buněk a tkání a aktivací antioxidantních obranných systémů (Duan et al. 2007).

Vodní stres je jedním z hlavních faktorů omezujících růst rostlin a jejich produktivitu. Rostliny vystavené vodnímu deficitu podstupují četné fyziologické a metabolické změny. Jeden přístup k porozumění schopnosti rostlin snášet environmentální stres, je rozpoznat stresem indukované změny. Měření, týkající se odezvy rostlin na vodní stres, jsou považovány jako potencionální kritéria pro stanovení tolerance deficitu. Deficit vody prokázal indukci snížení osmotického potenciálu plodin za účelem udržení jejich turgoru. Tohoto poklesu osmotického potenciálu lze dosáhnout akumulací rozpuštěných látek (solutů), nebo snížením objemu buněk, který vede ke zvýšení koncentrace rozpuštěných látek, po snížení objemu vody v buňce (Taiz & Zeiger 1991; Rascio et al. 1994; Heuer 1995).

Vodní stres vyvolává degradaci sacharidů a zvyšuje akumulaci cukru ve stresovaných listových tkáních rostlin pšenice (Tan & Halloran 1982). Obsah neredukujícího cukru byl zvýšen v důsledku vystavení rostlin pšenice vodnímu stresu (Johnson et al. 1984). Na druhou stranu bylo zjištěno, že snižování cukru a dalších solutů (K a Cl^-) významně přispívá k osmotické úpravě u tří kultivarů pšenice tvrdé (Rascio et al. 1994).

4.2.1 Vliv vodního stresu na fotosyntézu

Vodní deficit je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem, který řídí výnosy plodin na celém světě, a to díky skutečnosti, že snížení výnosu je řízeno nižší fotosyntetickou aktivitou (Pejic et al. 2009) a následným snížením růstu listů (Canavar et al. 2014). Experimenty s nedostatkem vody se zaměřily na zlepšení genotypů plodin v oblastech náchylných k suchu. Mechanismy rezistence vůči suchu způsobené nedostatkem vody mění různé biochemické a fyziologické procesy od fotosyntézy po syntézu proteinů a akumulaci solutů (Hu & Schmidhalter 1998). Snížení osmotického potenciálu v reakci na vodní stres je dobře zavedený mechanismus, kterým se mnoho rostlin přizpůsobuje nízké dostupnosti půdní vody (Krizmanić et al. 2003). Podle Evanse a kol. (1994), změna anatomických charakteristik listů může změnit složky difúze vodivosti CO_2 ze substomatálních dutin do míst karboxylace, a tak přispět k udržení konkrétních fotosyntetických rychlostí, a to navzdory nízké vodivosti stomatu při zasažení stresem ze sucha (Evans et al. 1994). Podobně ukázaly měření fotosyntézy listů při vysoké koncentraci CO_2 v několika C_3 rostlinách při nasyceném světle, že fotosyntetická kapacita se významně nesnížila, dokud nedosáhl nedostatek listové vody kritické hodnoty. Tedy pokles čistého příjmu CO_2 listy při mírném stresu suchem je přisuzován zejména uzavření průduchů (Morgan 1984). Uzavřením průduchů rostliny snižují nejen ztrátu vody transpirací, ale také přísun CO_2 do listů (Baker 1993; Chaves et al. 2009). Jako indikátory stresu ze sucha se často používají redukce čisté asimilace CO_2 (ACO_2) v listech, vodivost stomatu (g_s) a

rychlost transpirace (E) (Baker & Rosenqvist 2004). Cechin a kol. (2010) poukázali na to, že vodní stres snížil fotosyntézu (Pn), gs a E u mladých i zralých listů. Rozsah snížení však závisel na věku listů. Koncentrace mezibuněčného CO₂ (Ci) vzrostla u zralých listů, avšak u mladých listů se nezměnila. Okamžitá účinnost využití vody (IWUE) u zralých stresovaných listů byla snížena ve srovnání s kontrolními listy, zatímco u mladých stresovaných listů ponechává udržovanou stejnou úroveň jako kontrola (Cechin et al. 2010). Zdá se, že aklimatizace fotosyntézy na nízké potenciály listové vody ve slunečnici (*Helianthus annuus*) zahrnuje změny především na úrovni chloroplastů (Sayed 2003).

Anorganické kationty, organické kyseliny, aminokyseliny a cukry jsou primární osmotika, vyvolávající osmotickou úpravu buď vnitřní syntézou, nebo absorpcí osmoticky aktivních látek (Rhodes et al. 1986; Pritchard et al. 2000). Není pochyb o tom, že rozpustné cukry mohou přispívat k osmotické úpravě. V agronomických plodinách tedy dochází ke zvýšení koncentrace rozpustného cukru v reakci na vodní stres v kořenech a listech (Premachandra et al. 1992; Shahbaz et al. 2011). Wingler a kol. (2005) uvedli, že signalizací vysoké dostupnosti uhlíku ve vztahu k dusíku ve starých listech by akumulace cukru mohla vyvolat stárnutí listů. Stárnutí vyvolané cukrem je proto zvláště důležité při nízké dostupnosti dusíku a může také hrát roli ve světelné signalizaci. Odolnost proti suchu a jeho složky (stomatální a nestomatální) jsou předefinovány, aby vyjádřily vynikající invenční schopnost terminologie (Wingler et al. 2005).

Chlorofyl je nepostradatelný katalyzátor fotosyntézy, který je vodním deficitem podstatně ovlivňován. S výjimkou odrůd pšenice, snášenlivých krátkodobý vodní deficit, způsobilo sucho celkový pokles obsahu pigmentů včetně chlorofylu na choulostivých odrůdách na sucho (Loggini et al. 1999). Regulátory růstu (retardanty) rostlin jsou široce používány u polních plodin k různým účelům. Ošetření kyselinou abscisovou (ABA) způsobilo akumulaci prolinu v listech ječmene (Stewart 1980). Relativní obsah vody, listová voda, obsah chlorofylu a výtěžek zrn byly zvýšeny ošetřením rostlin cycocolem (regulátor růstu a vývoje) u dešťově zalévané pšenice (Bhat et al. 1990).

4.2.2 Adaptace rostlin na vodní stres

Podle strategie hospodaření s vodou ve smyslu reakce na stres lze rostliny dělit na dvě skupiny. První skupinou jsou homoiohydričné rostliny, do kterých řadíme cévnaté rostliny. Jejich mechanismem je snaha udržet příznivý obsah vody v protoplazmě, zmírnit škodlivé vlivy stresu na buňky a docílit tak vysokého vodního potenciálu. Druhou skupinu představují poikilohydričné rostliny, do nichž zařazujeme mechorosty. Poikilohydrie značí neschopnost kontroly ztráty vody do okolního prostředí (Wood 2005)

Mezi mechanismy úniku prostředí, ohroženého vodním stresem, patří urychlený fenologický vývoj, dále prodloužená dormance a vývojová plasticita. Rychlý vývoj jednoletých rostlin je běžný u rostlin, rostoucích v oblastech s dlouhodobě nízkými srážkami, např. Středozeří. Tento mechanismus avoidance byl nalezen u mnoha případů jednoletých pouštních rostlin (Mulroy & Rundel 1977) Jiné druhy rostlin jsou schopny přežít nepříznivé období ve formě orgánu, přežívajícího v podzemí, a vyhnout se tak potenciálnímu poškození z vodního deficitu. Patří mezi ně bulvy a hlízy s velkou zásobní kapacitou vody. U vytrvalých rostlin

dochází při vodním deficitu k jevu opadu listů, tedy k vývojové plasticitě (Nilsen & Orcutt 1996).

Schopnost tolerance nízké dostupnosti vody umožňuje rostlině pokračovat v metabolických procesech i během období vodního deficitu. Dochází ke kombinaci způsobů ke zmírnění poklesu vodního potenciálu v pletivech, a tím k udržení metabolické aktivity. Mezi mechanismy udržení turgoru při nízkém vodním potenciálu patří osmotické přizpůsobení, změna elasticity buněčné stěny, pokles buněčného objemu a snížení podílu vody v symplastu. Další způsob tolerance nízkého vodního potenciálu vede k neudržení turgoru v rostlině, a následným vyschnutím buněk a rostliny celkově (Nilsen & Orcutt 1996).

V případě tolerance sucha rostliny s vysokým vodním potenciálem jde o způsob, kdy rostlina odolává stresům z nedostatku vody prostřednictvím udržování vysokého vodního potenciálu v pletivech. Tento způsob vyžaduje striktní hospodaření rostliny s objemem vody. To zahrnuje snížení listové plochy, jejich vodivosti či snahu o snížení jejich teploty. Toho rostlina dosáhne při vytvoření silné kutikuly, či funkcí průduchů. Zároveň je potřebné zvýšit akumulaci vody, čehož rostlina dosáhne zvětšením hustoty kořenů, či tvorbou sukulentních orgánů (Nilsen & Orcutt 1996).

4.3 Prolin

4.3.1 Kompatibilní soluty

V případě, že se rostliny setkají s nepříznivými environmentálními podmínkami spojenými s vysokými hladinami soli, suchem nebo nízkou teplotou, chrání se jejich buňky před stresem, vyvolaným vysokými koncentracemi intracelulárních solí, akumulací různých malých organických metabolitů, které jsou souhrnně označovány jako kompatibilní soluty (Bohnert et al. 1995). Kompatibilní soluty jsou definovány jako malé molekuly, které jsou velmi dobře rozpustné ve vodě a jsou rovněž jednotně neutrální, pokud se jedná o poruchy buněčných funkcí, i když jsou přítomny ve vysokých koncentracích (Yancey et al. 1982). Vlastnosti kompatibilních solutů umožňují udržovat tlak turgoru při vodním stresu, což je vnitřní vlastnost hlavních forem abiotického stresu, jako jsou například solný stres a stres nízkými teplotami. Kromě toho mohou některé kompatibilní soluty sloužit jako účinné ochranné látky, stabilizací struktur a funkcí určitých makromolekul (Santoro et al. 1992; Papageorgiou & Murata 1995).

V reakci na různé stresové podmínky, jsou rostliny schopné akumulovat velké množství různých typů kompatibilních solutů (Serraj & Sinclair 2002). Kompatibilní soluty jsou nízkomolekulární, vysoce rozpustné organické sloučeniny, které jsou obvykle při vysokých buněčných koncentracích netoxické. Tyto látky poskytují rostlinám ochranu před stresem tím, že přispívají k buněčné osmotické úpravě, detoxikaci ROS, ochraně integrity membrány a stabilizaci enzymů/proteinů (Yancey 1994; Bohnert & Jensen 1996; Ashraf & Foolad 2007). Patří mezi ně prolin, sacharóza, polyoly, trehalóza a kvartérní amoniové sloučeniny (QAC), jako je glycin betain, alinin betain, prolin betain a pipekolát betain (Rhodes & Hanson 1993; Ashraf & Harris 2004).

4.3.2 Metabolická adaptace prolinu u rostlin pod vlivem stresu

Akumulace prolinu je běžný jev, který pozorujeme v reakci na stres prostředí u bakterií, prvoků, řas, rostlin a mořských bezobratlých. (Csonka 1981; Matysik et al. 2002; Verbruggen & Hermans 2008; Szabados & Saviouré 2010). Konkrétně u rostlin bylo zjištěno, že hladiny intracelulárního prolinu se během stresu zvýšily až stokrát (Handa et al. 1983; Verbruggen & Hermans 2008). Akumulace prolinu v nich nastává během vystavení různým stresům, včetně soli (Yoshida et al. 1995), sucha (Barnett & Naylor 1966), UV záření (Saradhi et al. 1995b), iontů těžkých kovů (Chen et al. 2001), patogenů (Fabro et al. 2004) a v neposlední řadě oxidačního stresu (Yang et al. 2009). Akumulace prolinu a tolerance vůči stresu byly v rostlinách studovány exogenní a endogenní manipulací s hladinou prolinu (Hare et al. 1999). Za stresových podmínek zahrnuje akumulace prolinu v rostlinách i vzájemnou regulaci P5CS a PRODH (Hare & Cress 1997; Hare et al. 1999; Raymond 2002; Verbruggen & Hermans 2008). Např. v rostlině tabáku (*Nicotiana tabacum*) vede nadměrná exprese P5CS k vyšší hladině prolinu, kořenové biomase a rozvoji květů (Hare et al. 1999; Hong et al. 2000) a růstu tolerance k prostředí s vysokou osmotickou koncentrací.

4.3.3 Biosyntéza prolinu

Biosyntetická dráha prolinu byla popsána již v roce 1952 u bakterie *Escherichia coli* (Vogel & Davis 1952). V rostlinách je prolin syntetizován dvěma cestami, a to glutamát-dependentní a ornithin-dependentní drahou.

Glutamát-dependentní dráha způsobuje významnou akumulaci prolinu během osmotického stresu a je predominantní (Bartels & Sunkar 2005). Prolin se syntetizuje z kyseliny glutamové přes meziprodukt Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylát (P5C). Reakce je katalyzována Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátsyntetázou (P5CS) a Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylátoreduktázou (P5CR). P5CS je kódován dvěma geny, zatímco P5CR je u většiny druhů rostlin kódován pouze genem jedním (Strizhov & Abrahám et al. 1997). Katabolismus prolinu se vyskytuje v mitochondriích pomocí chronologického působení prolin dehydrogenázy (PDH) nebo prolin oxidázy (POX) produkující P5C z prolinu a P5C dehydrogenáza (P5CDH) konvertuje P5C na glutamát. Dva geny kódují PDH, zatímco jediný gen P5CDH byl identifikován v huseníčku rolním (*Arabidopsis*) a tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Deuschle & Funck 2001). Transkripce PRODH je aktivována rehydratací a prolinem, ale je potlačena dehydratací, čímž se zabraňuje degradaci prolinu během abiotického stresu (Kiyosue & Yoshida 1996).

V alternativní ornithin-dependentní cestě může být prolin syntetizován z ornithinu, který je transaminován na P5C pomocí ornithin- δ -aminotransferázy ((Adams 1970); Verbruggen & Hermans 2008). Ornithin-dependentní dráha je důležitá u mladých rostlin, hlavně při vývoji sazenic a v některých rostlinách pro akumulaci prolinu indukovanou stresem. (Armengaud & Thiery 2004) Akumulace prolinu byla navržena tak, aby přispívala k toleranci stresu v mnoha ohledech. Jelikož prolin působí jako molekulární chaperon, je schopen udržovat integritu proteinu a zvyšovat aktivity různých enzymů. (Rajendrakumar & Suryanarayana 1997) Četné studie uvádějí prolin jako antioxidant, což naznačuje jeho úlohu jako lapače RFK a singletového zhášeného kyslíku (Matysik & Alia 2002).

Bylo zjištěno, že akumulace volného prolinu je jednou z nejrychlejších reakcí rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum*) na vodní deficit (Tan & Halloran 1982; Rascio et al.

1994). V kukuřici (*Zea mays*) byly hladiny prolinu zvýšeny až 100krát v reakci na vodní deficit (Voetberg & Sharp 1991), zatímco v čiroku (*Sorghum*) se volný prolin nijak významně nenaakumuloval, dokud rostliny nebyly vystaveny silnému vodnímu stresu a viditelně zvadlé (Waldern et al. 1974).

Konverze prolinu zpět na glutamát je katalyzována prolin dehydrogenázou (PRODH) a P5C dehydrogenázou (P5CDH).

Vnitřní obsah prolinu může být určen biosyntézou, katabolismem a transportem mezi buňkami a různými buněčnými kompartmenty. Předpokládá se, že biosyntetické enzymy (P5CS1, P5CS2 a P5CR) jsou lokalizovány v cytosolu, zatímco umístění v mitochondriích je předurčeno pro enzymy zapojené do katabolismu prolinu (jako jsou PRODH1/ERD5, PRODH2, P5KDH a OAT) (Szabados & Savouré 2010).

Glutamát se jeví jako hlavní prekurzor akumulace prolinu vyvolané stresem v rostlinách, zejména díky tomu, že ornithinová dráha usnadňuje recyklaci dusíku z argininu na glutamát (Funkc et al. 2008; Szabados & Savouré 2010). Enzymem omezujícím rychlost syntézy prolinu je P5CS, jehož zvýšená exprese koreluje s akumulací prolinů v huseníčku rolním (*Arabidopsis*) (Savouré et al. 1995). Zdá se, že změny ve stupních exprese P5CR (P5CR; At5g14800) jsou méně spojeny s akumulací prolinů, což je v souladu s tím, že P5CS katalyzuje nejpomalejší krok dráhy. Existuje však několik zpráv, že hladiny transkriptů P5CR jsou mírně zvýšeny v kořenech *Glycine max* a *Pisum sativum* a v listech *Arabidopsis* v reakci na osmotický stres (Delauney & Verma 1990; Williamson & Slocum 1992; Verbruggen et al. 1993). Kromě toho Cecchini a kol. (2011) nedávno dokázali, že P5CR byla up-regulována, tzn. zvýšení počtu receptorů na povrchu buněk, hypersenzitivní odpovědi (HR) u *Arabidopsis* po infekci avirulentním kmenem *Pseudomonas syringae* (Cecchini et al. 2011a). Dle všeho tedy P5CR může zaujímat důležitou roli ve stresové reakci, která ještě není plně uvědoměna.

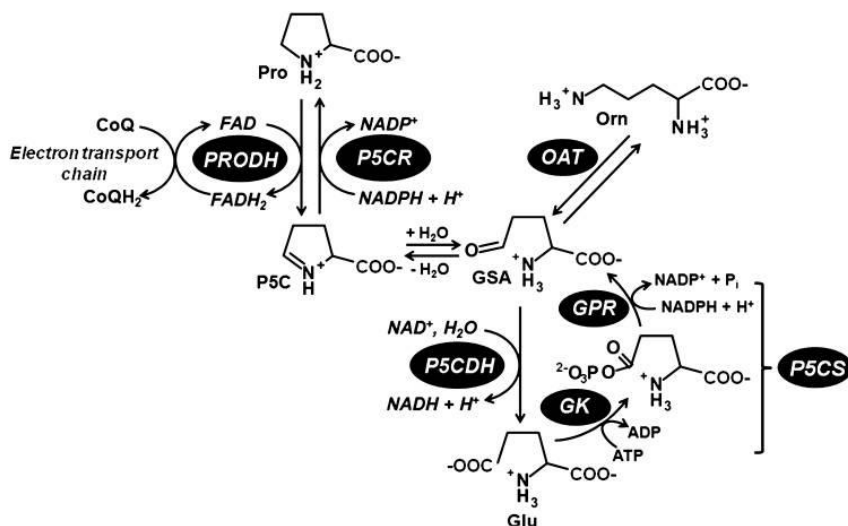
V rostlinách existují dvě izoformy P5CS. U huseníčku rolního (*Arabidopsis*) je izoforma 1 (P5CS1; At2g39800) lokalizována v chloroplastech a je nutná pro akumulaci prolinu vyvolanou stresem (Székely et al. 2008; Mattioli et al. 2009). Isoforma 2 (P5CS2; At3g55610) je lokalizována primárně v cytosolu a má vitální funkci pro vývoj embryí a semenáčků (Székely et al. 2008; Mattioli et al. 2009). Narušení P5CS1 inzercí T-DNA u huseníčku rolního (*Arabidopsis*) vede k významně nižší akumulaci prolinu v rostlinách během stresu, což konsekventně vede k precitlivělosti na solný stres a vysokým hladinám ROS (Székely et al. 2008). Narušení P5CS2 nemá významný vliv na akumulaci prolinu, ale narušuje vývoj sazenic a plodných rostlin (Székely et al. 2008). V korelaci s důležitou rolí v akumulaci prolinu je exprese P5CS1 up-regulována v reakci na sucho a stres solí (Yoshida et al. 1995; Strizhov et al. 1997; Ábrahám et al. 2003).

Nedávno Verslues et al. (2012) identifikoval sestřihovou variantu P5CS1 u huseníčku rolního (*Arabidopsis*), která vedla k nefunkčnímu přepisu. Alternativně sestřihaný transkript vedl ke snížení hladiny proteinu P5CS1 a akumulaci prolinu. V komplexní studii o tom, jak se obsah prolinů a četnost nefunkční varianty sestřihu lišily s prostředím, bylo zjištěno, že nefunkční transkript P5CS1 lépe koreloval s variabilitou prostředí než s obsahem prolinu. Tato zajímavá zjištění naznačují, že akumulace prolinu nemusí být jediným faktorem pro adaptaci na environmentální stres, ale spíše může pro adaptaci na prostředí hrát důležitou roli dráha biosyntézy prolinu, která dosud není plně prozkoumána (Kesari et al. 2012).

Signální mechanismy, kterými environmentální stres indukuje biosyntézu prolinu v rostlinách, zahrnují několik molekul, jako je kyselina abscisová (ABA) (Savouré et al. 1997; Strizhov et al. 1997), vápník a fosfolipáza C (Savouré et al. 1997; Yoo et al. 2005; Parre et al. 2007). Nedávno Sharma a kol. (2011) uvedli, že metabolismus prolinu je nezbytný pro ochranu růstu, zprostředkovanou ABA v rostlinách ve vodním deficitu (Sharma et al. 2011). Byly také nalezeny důkazy pro regulaci biosyntézy prolinu zprostředkovanou ROS (Fabro et al. 2004; Verslues et al. 2007; Yang et al. 2009). Fabro a kol. (2004) uvádí, že u huseníčku rolního (*Arabidopsis*) vede HR, vyvolaná nekompatibilní interakcí rostlinných patogenů, k akumulaci prolinu prostřednictvím up regulace P5CS2, ale nikoli P5CS1 v kyselině salicylové a způsobem závislým na ROS (Fabro et al. 2004). Později Verslues a kol. (2007) také uvedl, že peroxid vodíku (H_2O_2) může způsobit akumulaci prolinu nebo podporovat akumulaci prolinu indukovanou ABA (Verslues et al. 2007). Nedávno Yang a kol. (2009) naznačil, že H_2O_2 může indukovanou akumulaci prolinu zvýšenou regulací P5CS a sníženou aktivitou PRODH v coleoptilech a radikulách semen kukuřice (*Zea mays*) (Yang et al. 2009).

Kromě transkripční regulace je rostlinná P5CS zpětně inhibována prolinem (Zhang et al. 1995). Zpětná inhibice P5CS je podobná inhibici bakteriálních GK a zahrnuje kompetitivní inhibici prolinem s ohledem na glutamát (Pérez-Arellano et al. 2010b, 2010a). Strukturální analýza a místně řízená mutagenese bakteriálních GK naznačují, že když je prolin vázán na GK, částečně zabírá vazebné místo glutamátu, čímž interferuje s vazbou glutamátu a inhibuje aktivitu GK (Pérez-Arellano et al. 2010a). Začlenění GK varianty, která je necitlivá na inhibici prolinu, bylo použito k nadprodukcí prolinu v bakteriích (Smith 1985; Csonka et al. 1988) a kvasnicích (Takagi 2008). V rostlinách exprese varianty P5CS, postrádající inhibici prolinu, zvýšila hladiny prolinu dvojnásobně (Hong et al. 2000). V poměrně nedávné recenzi Pérez-Arellano *et al.* (2010) poznamenali, že za stresových podmínek akumulují některé bakterie a rostliny prolin v koncentraci (> 100 mM), která je výrazně vyšší než ta, která je potřebná k inhibici aktivity GK s hodnotami KI v rozmezí od $\sim 0,2$ do 1 mM prolinu pro bakteriální GK a rostlinné enzymy P5CS (Binzel et al. 1987; Delauney & Verma 1993; Kempf & Bremer 1998; Pérez-Arellano et al. 2010b, 2010a). Bylo navrženo, že za stresových podmínek je prolinová inhibice aktivity GK oslabena vysokými hladinami jiných solutů, jako je glutamát (Kempf & Bremer 1998; Pérez-Arellano et al. 2010b, 2010a).

Přehled prolinových metabolických enzymů uvádím dále na Obrázku 1.



Obrázek 1 - Reakce prolinové metabolické dráhy.

Zdroj: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763223/bin/fig-1.jpg>

Prolin (Pro) je syntetizován z glutamátu (Glu) počínaje enzymy glutamátkinázou (GK) a γ -glutamylfosfátreduktázou (GPR), které jsou v rostlinách a zvířatech fúzovány v bifunkčním enzymu P5C (P5K) syntetázy (P5CS). Meziprodukt, γ -glutamát-semialdehyd (GSA) spontánně cyklizuje na Δ^1 -pyrrolin-5-karboxylát (P5C), který je posléze P5C reduktázou (P5CR) redukován na prolin. Alternativně lze GSA/P5C vytvořit z ornithinu a ornithin- δ -aminotransferázy (OAT). Prolin je oxidován zpět na glutamát prolin dehydrogenázou (PROD) a P5C dehydrogenázou (P5CDH) v mitochondrii. PROD spojuje oxidaci prolinu na redukcí ubichinonu (CoQ) v transportním řetězci elektronů (ETC). U gramnegativních bakterií jsou domény PROD a P5CDH fúzovány v proteinu PutA.

3.3.3.1 P5C syntetáza

P5CS katalyzuje NADPH-dependentní redukci glutamátu na γ -glutamát-semialdehyd (GSA), který poté spontánně cyklizuje na P5C (Hu et al. 1992; Savouré et al. 1995). Kompletní cDNA kódující P5CS v mnohobuněčných eukaryotech byla poprvé klonována a charakterizována u rostlin (Hu et al. 1992). P5CS je bifunkční adenosintrifosfát (ATP) a NAD(P)H-dependentní enzym u vyšších eukaryot, který ukazuje aktivity glutamát kinázy (GK) a γ -glutamylfosfát reduktázy (GPR) (Hu et al. 1992; Savouré et al. 1995). U primitivních organismů jako jsou bakterie a kvasinky jsou GK a GPR pouze enzymy s jedinou funkcí (monofunkční) (Pérez-Arellano et al. 2010b; Arentson 2012). Struktura bifunkčního P5CS sice nebyla ještě zjištěna, avšak jednotlivé struktury GK a GPR jsou dostupné alespoň z bakterií (Page et al. 2003; Marco-Marín et al. 2007). Důležitá rezidua pro vazbu glutamátu v GK doméně jsou konzervována mezi GK různých druhů (Pérez-Arellano et al. 2010a; Pérez-Arellano et al. 2010b). Biosyntéza prolinu je zpětná vazba inhibovaná prolinem, vázaným na GK doménu a zasahujícím na vazebné místo glutamátu (Pérez-Arellano et al. 2010a).

Poměrně nedávno Engelhard et al. (2011) identifikoval lidský enzym P5CS jako potenciální cíl mitochondriálního thioredoxinu 2 za použití *in situ* kinetického odchyty (Engelhard et al. 2011). Toto zjištění naznačuje, že P5CS je v mitochondriálním matrix a podléhá redoxní regulaci.

3.3.3.2 P5C reduktáza

P5C, produkt P5CS reakce, je redukován na prolin díky P5CR užitím NAD(P)H jako elektronového donora (Adams 1970) P5CR se vyskytuje u bakterií, rostlin, hmyzu i u obratlovců (Meng et al. 2006). U rostlin se ukázalo, že P5CR se nenachází pouze v cytosolu, nýbrž je i expresována v chloroplastech (Szabados & Savouré 2010; Verbruggen & Hermans 2008). U lidí se vyskytují tři izoformy P5CR: PYCR1, PYCR2 a PYCRL. PYCR1 a PYCR2 nacházíme v mitochondriích, zatímco PYCRL v cytosolu (de Ingeniis et al. 2012). P5CR je nejen nezbytnou složkou syntézy prolinu, avšak má i rozhodující roli v cyklaci prolinu a P5C mezi buněčnými kompartmenty a při udržování správných úrovní NADP⁺/NADPH v cytosolu k řízení dráhy pentózy fosfátu (Phang 1985; Miller et al. 2009).

3.3.3.3 Ornithin- δ -aminotransferáza

OAT katalyzuje vzájemnou přeměnu ornithinu a GSA se směrem toku určeným nutričními potřebami, například u novorozenců, kde je upřednostňován celkový tok od prolinu k argininu (Wu et al. 2008; Phang et al. 2010). U kvasinek je OAT cytosolické (Jauniaux et al. 1978), zatímco u rostlin a lidí se nachází OAT v mitochondriích (Simmaco et al. 1986; Kobayashi et al. 1989).

3.3.3.5 Prolin dehydrogenáza/P5C dehydrogenáza

PRODH a P5CDH jsou dobře uchovány u eukaryot a bakterií, u nichž PRODH sdílejí oblast katalytického jádra zkráceného ($\alpha\beta$)₈ TIM (trióza fosfát isomeráza) můstku (Tanner 2008; Singh 2012). Je třeba poznamenat, že enzymy PRODH z *Archaea* mají strukturální záhyb, kterým se liší od enzymů PRODH eukaryot a bakterií (Kawakami et al. 2012); Tanner 2008). U eukaryot jsou PRODH a P5CDH lokalizovány v mitochondriální matrix s PRODH spojenou s vnitřní membránou mitochondrií. U grampozitivních bakterií se PRODH váže periferně na cytoplazmatickou membránu, zatímco P5CDH je cytosolická (White et al. 2007; Tanner 2008).

PRODH obsahuje nekovalentně vázaný flavin adenin dinukleotid (FAD) a je zodpovědný za katalýzu prvního kroku L-prolinové oxidace (Arentson 2012). Reakce katalyzovaná PRODH vede k přenosu dvou elektronů z prolinu do flavinového kofaktoru za vzniku P5C a redukováného flavinu. Dále PRODH přenáší dva elektrony z redukováného flavinu na příjemce elektronů, jako je ubiquinon ve vnitřní membráně mitochondrií (nebo cytoplazmatické membráně u prokaryot) (Wanduragala et al. 2010; Moxley et al. 2011). Poté, co se P5C spontánně přemění na GSA, se GSA oxiduje na L-glutamát pomocí P5C dehydrogenázy (P5CDH) za použití nikotinamid adenin dinukleotidu jako elektronového receptoru (Arentson 2012; Srivastava et al. 2012). Glutamát, vytvořený oxidací prolinu, vstupuje do cyklu

trikarboxylových kyselin po enzymatické přeměně na α -ketoglutarát. Oxidace jedné molekuly L-prolinu vyprodukuje přibližně 30 ekvivalentů adenosintrifosfátu, čímž poskytuje buňce důležitou energii zvláště za podmínek při vyčerpání živin (Hare & Cress 1997; Phang et al. 2008, 2010)

3.3.4 Degradace prolinu

Obecně se předpokládá, že během stresové reakce spolu s up regulací biosyntézy prolinu dochází k odpovídajícímu snížení v degradační dráze prolinu, které maximalizuje akumulaci prolinu. Podobně jako u biosyntézy prolinu je prvním krokem v cestě degradace prolinu, tj. PRODH, určující rychlost. *Arabidopsis* má dvě funkční izoformy PRODH, z nichž obě se nacházejí v mitochondriích: PRODH1 (PRODH1; At3g30775), také známá jako gen ERD5 (gen včasné reakce na dehydrataci) (Kiyosue et al. 1996; Funck et al. 2010) a PRODH2 (PRODH2; At5g38710) (Funck et al. 2010; Szabados & Savouré 2010). PRODH1 je široce expresována v rostlinách a je považována za převládající izoformu (Funck et al. 2010). Exprese PRODH2 je významně nižší než u PRODH1, jelikož PRODH2 je expresována hlavně ve vaskulatuře (Funck et al. 2010). PRODH1 a PRODH2 jsou nadměrně regulovány exogenním prolinem, ale překvapivě reagují odlišně na stres způsobený suchem a solí (Weltmeier et al. 2006; Verbruggen & Hermans 2008). Je dobře zdokumentováno, že exprese PRODH1 klesá v reakci na chlad, sucho a stres solí (Kiyosue et al. 1996; Kaplan et al. 2007). Bylo zjištěno, že kultivary pšenice tolerantní k suchu (*Triticum aestivum*) obsahují významně nižší aktivitu PRODH, než rostliny citlivé na sucho (Yang et al. 2011). Navíc, když byly sazenice vystaveny olovu ($Pb(NO_3)_2$), bylo zjištěno zvýšení aktivity PRODH u kultivarů pšenice citlivých na sucho (Ningchun), ale ne u kultivarů tolerantních k suchu (Xihan), což je v souladu s down regulací, degradací prolinu a poskytnutí výhody rostlinám během stresu (Yang et al. 2011).

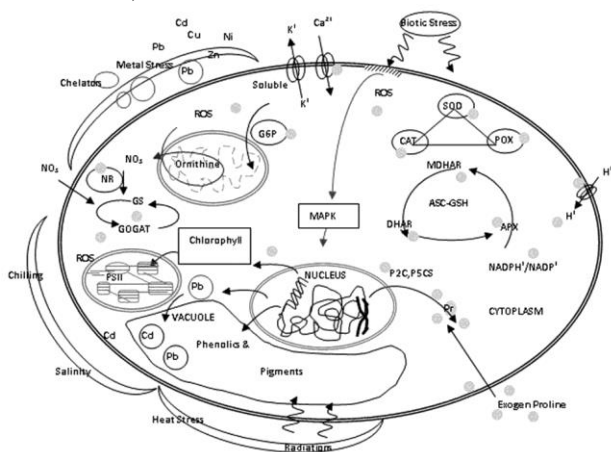
U huseníčku rolního (*Arabidopsis*) bylo prokázáno, že solný stres indukuje expresi PRODH2, zatímco exprese PRODH1 je významně snížena (Funck et al. 2010). Diferenciální regulace dvou izoform PRODH byla také zaznamenána u tabáku (Ribarits et al. 2007). Ukazuje se tedy, že PRODH1 a PRODH2 mají odlišné fyziologické role, což bude vyžadovat další zkoumání, aby bylo možné plně pochopit výhody prolinu v toleranci ke stresu. Funck a kol. (2010) naznačují, že degradace prolinu ve vaskulatuře může rostlině poskytnout důležitou energii během expozice stresu (Funck et al. 2010). Ve skutečnosti bylo zjištěno, že některé tkáně v rostlinách udržují oxidaci prolinu ve stresu. Při nízkém potenciálu vody (sucho) bylo zjištěno, že exprese PRODH1 zůstává vysoká v apexu kořene a v meridemu výhonků u huseníčku rolního (*Arabidopsis*), zatímco exprese PRODH1 byla snížena v objemu nadzemní části rostliny (Sharma et al. 2011). Mutant PRODH1 v huseníčku rolním (*Arabidopsis*) vykazoval významně nižší spotřebu kyslíku v apexu kořene, což naznačuje, že katabolismus prolinu je důležitou dráhou pro řízení oxidační fosforylace (Sharma et al. 2011). Navíc apikální oblast kořenů ječmene pod stresem NaCl měla méně volné akumulace prolinu, i když byly zvýšeny aktivity transportéru L-prolinu a P5CS (Ueda et al. 2007). Transport a využití prolinu se tedy může lišit v různých tkáních v závislosti na energetické náročnosti různých oblastí rostliny.

Druhý enzym katabolické dráhy prolinu u *Arabidopsis*, P5CDH (P5CDH; At5g62530), je up regulován exogenním prolinem, i když je indukce P5CDH mnohem pomalejší než indukce PRODH (Deuschle et al. 2008). Expres P5CDH z větší části zůstává konstantní i během stresu. Otázkou P5CDH bylo to, zda hladiny exprese P5CDH snižují toxicitu prolinu, která je běžně pozorována v rostlinách při jeho vysokých hladinách (Deuschle et al. 2008).

Předpokládá se, že negativní účinky exogenního prolinu jsou způsobeny hromaděním P5C / GSA v důsledku nízké aktivity P5CDH (Verbruggen & Hermans 2008; Szabados & Savouré 2010). Bylo dokázáno, že P5C / GSA zvyšuje intracelulární ROS (Nomura & Takagi 2004) a reaguje s dalšími metabolity (Farrant et al. 2001).

Vyřazení P5CDH u *Arabidopsis* ústí ve vznik mutantních rostlin, které jsou přecitlivělé na exogenní prolin, zatímco rostliny nadměrně exprimující P5CDH jsou tolerantnější k léčbě exogenním prolinem (Deuschle et al. 2004). *Arabidopsis* s omezenou aktivitou PRODH však stále vykazuje citlivost na exogenní prolin, což nám naznačuje, že k toxicitě prolinů přispívají další mechanismy, jako je inhibice endogenní syntézy prolinů (Hare & Cress 1997; Mani et al. 2002; Szabados & Savouré 2010; Cecchini et al. 2011a).

Během fáze zotavení po stresu je prolin považován za důležitý zdroj energie (Hare & Cress 1997; Szabados & Savouré 2010). Oxidační metabolismus prolinu v mitochondriích se podílí na oxidační fosforylaci a syntéze ATP v regenerujících se tkáních (Hare & Cress 1997). V souladu s tím se během rehydratace zvyšuje exprese PRODH a P5CDH (Kiyosue et al. 1996). Ukázalo se také, že během zotavení po stresu se v kultivovaných buňkách rajčat (*Lycopersicon esculentum* convar. VFNT-Cherry) naakumulovaný prolin rychle odbourává (Handa et al. 1986).



Obrázek 2: Prolinem zprostředkovaná intracelulární redoxní regulace jako mnohostranná konvergentní strategie různých stresů. Rovnováha exogenních/endogenních molekul nastavuje požadovanou vnitřní koncentraci prolinu.

Zdroj: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/psb.21949#>

3.3.5 Mechanismy obrany prolinu vůči stresu

Ačkoliv molekulární mechanismy toho, jak přesně prolin chrání buňky během stresu, nejsou zatím plně pochopeny, můžeme s jistotou vysledovat souvislost s jeho chemickými vlastnostmi a účinky na redoxní systémy, jako je glutathion (GSH). Funkce prolinu je při adaptaci na stres často vysvětlována jeho osmolytickými vlastnostmi a schopností vybalancovat vodní stres (Delauney & Verma 1993). Prostředí, a zejména to s nepříznivými podmínkami, však často narušuje intracelulární redoxní homeostázu, což vyžaduje mechanismy, které se mj. podílejí na vyrovnání oxidačního stresu. Proto byly také navrženo, aby se do ochranných mechanismů prolinu zahrnovaly také stabilizace proteinů a antioxidantních enzymů, přímé vychytávání ROS, balance rovnováhy intracelulární redoxní homeostázy (např. poměr $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ a GSH/GSSG) a buněčná signalizace, podporovaná metabolismem prolinu. Potenciální mechanismy, kterými prolin poskytuje ochranu proti stresu, jsou diskutovány dále.

3.3.5.1 Funkce osmolytu

Prolin je jednou z několika malých molekul klasifikovaných jako osmolyt nebo osmoprotektant (Csonka 1989). Další biologicky významné osmolyty jsou glycerol, trehalóza, sorbitol, sacharóza, taurin, sarkosin, glycin betain a trimethylamin N-oxid (Yancey et al. 1982). Tyto osmolyty se hromadí v reakci na podmínky sucha, soli a teplotních extrémů. Osmolyty pomáhají zmírňovat vodní stres a vyrovnávat tlak turgoru během stresu (Csonka 1989). Osmolyty jsou také vynikajícími kryoprotektory (Pemberton et al. 2012). Ukázalo se například, že prolin zvyšuje mrazuvzdornost kvasinek (Morita et al. 2002; Takagi 2008) a rostlin (Yoshida et al. 1997; Hare et al. 1999; Szabados & Savouré 2010) a že je užitečným kryoprotektorem proteinových krystalů (Pemberton et al. 2012), larev much (Košťál et al. 2011; Kostal et al. 2012), rostlinných buněk (Withers & King 1979) a lidských kmenových buněk (Freimark et al. 2011). Prolin je tedy jako osmolyt důležitou molekulou, kterou používají různé organismy k boji proti stresu.

3.3.5.2 Energetická homeostáza a $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$

Kromě dříve diskutovaných chemických vlastností prolinu mohou mít na toleranci stresu vliv také změny v metabolickém toku prolinu. Účinky metabolismu prolinu na intracelulární redoxní stav byly dobře studovány Phangem et al. (1985), kteří jako první navrhli, že cyklus prolin-P5C mohl pomoci udržovat správné hladiny $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ v cytosolu a řídit oxidační pentózo-fosfátovou dráhu (Phang 1985). Cyklování prolinu a P5C pomocí PRODH a P5CR vede k přenosu redukčních ekvivalentů z cytosolu do mitochondrií (Phang 1985; Miller et al. 2009). Elektrony jsou předávány do mitochondriálního ETC přímo z PRODH prostřednictvím ubiquinonu, což vede ke zvýšení oxidační fosforylace a produkce mitochondriální ROS. Proto se předpokládá, že cyklus prolin-P5C pomáhá udržovat správný poměr $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Phang 1985; Miller et al. 2009). Cyklus prolin-P5C může být obzvláště důležitý v případě, kdy zvýšená aktivita PRODH není vyvážena aktivitou P5CDH (Yoon et al. 2004; Miller et al. 2009). V současné době není známo, jak se P5C dopravuje do nitra mitochondrií a zpět. Dobrý přehled

cyklu prolin-P5C a širokých účinků metabolismu prolinu poskytl poměrně nedávno (2012) ve svém článku Phang (Phang et al. 2012).

3.3.6 Transport prolinu

Mezibuněčný transport prolinu se nachází mezi cytosolem, chloroplasty a mitochondriemi, jak vyplývá z kompartmentalizace metabolismu prolinu. Bylo popsáno, že příjem prolinu v mitochondriích je aktivním procesem, který naznačuje existenci specifických transportérů aminokyselin (Yu et al. 1983). Tyto transportéry byly identifikovány v *Arabidopsis thaliana* (Rentsch et al. 1996) a u pylu rajčat (Schwacke et al. 1999). Nejméně tři transportéry (Pro T1, Pro T2 a AAP6) prolinu byly identifikovány v *Arabidopsis thaliana* na základě technologie C-DNA (Rentsch et al. 1996). Tyto transportéry patří do rodiny aminokyselinových permeáz (AKP) a jsou expresovány za stresových podmínek. Transportér Pro T1 je expresován všudypřítomně, avšak u rostlin *Arabidopsis thaliana* vystavených solnému stresu, byly zaznamenány vyšší hladiny Pro T1 v kořenech, stoncích a květech. Mladé rostliny vykazovaly nejvyšší expresi Pro T1 zejména ve floému stonku. Při vodním a solném stresu byla zaznamenána silná exprese transportéru Pro T2, zatímco transkripty AAP6 byly detekovány převážně v absorbních pletivech (kořenech, kaulescentních listech) (Rentsch et al. 1996). U nestresovaných rostlin halofytového druhu *Limonium latifolium* byl prolin sekvestrován do vakuol, zatímco v cytosolu rostlin v solném stresu byl detekován vysoký obsah prolinu, což naznačuje nový význam prolinové biosyntézy, stejně tak jako transport pro akumulaci prolinu (Gagneul et al. 2007).

3.3.7 Význam akumulace prolinu u rostlin

Prolin se akumuluje v mnoha rostlinných druzích v reakci na environmentální stres. Ačkoli o jeho metabolismu je známo mnoho, některé aspekty jeho biologických funkcí jsou stále nejasné. Prolin může působit jako signální molekula pro modulaci mitochondriálních funkcí, ovlivňovat buněčnou proliferaci nebo buněčnou smrt a spouštět specifickou genovou expresi, která může být nezbytná pro obnovu rostlin ze stresu. Ačkoli regulace a funkce akumulace prolinu ještě nejsou zcela pochopeny, inženýrství metabolismu prolinu by mohlo vést k novým příležitostem ve zlepšení tolerance rostlin vůči environmentálním stresům (Szabados & Savouré 2010).

Je známo, že se prolin hromadí v reakci na několik abiotických stresů a zvýšená akumulace prolinu a glycin betainu může snížit poškození vyvolané stresem rostlinných buněk (Hasegawa et al. 2000). Předpokládá se, že tato akumulace je ochranným mechanismem proti mnoha nepříznivým environmentálním podnětům. Mnoho druhů rostlin přirozeně akumuluje glycin betain a prolin jako hlavní organické osmolyty, když jsou vystaveny různým abiotickým stresům, jako je sucho (van Heerden & Krüger 2002; Ashraf & Foolad 2007; Seki et al. 2007). Při výskytu vodního deficitu, salinity, nízké teploty, při vystavení těžkým kovům, UV záření apod. je známa akumulace prolinu (Hare & Cress 1998). Kromě toho, že působí jako osmolyt pro osmotickou úpravu, přispívá prolin také ke stabilizaci subcelulárních struktur (např. membrán a proteinů), zachycení volných radikálů a puffrování buněčného redoxního potenciálu

za podmínek vystavení stresu (Ashraf & Foolad 2007). Může také působit jako hydrotrop kompatibilní s proteinem, dále dokáže zmírnit cytoplazmatickou acidózu a udržet vhodné poměry NADP⁺/NADPH kompatibilní s metabolismem (Hare & Cress 1997). U mnoha druhů rostlin byla akumulace prolinu ve stresových podmínkách zasolením korelována se stresovou tolerancí a prokázalo se, že koncentrace prolinu je obecně vyšší v rostlinách tolerantnějších k soli, než v rostlinách na sůl citlivých (Fougère & Le Rudulier 1991). K akumulaci prolinu obvykle dochází v cytoplazmě, kde působí jako molekulární chaperon stabilizující strukturu proteinů a jejich akumulaci pufr cytosolického pH a udržuje redoxní stav buněk. Existuje také názor, že jeho akumulace může být součástí stresového signálu ovlivňujícího adaptivní reakce (Nainawatee & Chowdhury 1995).

Je schopen chránit buňky před poškozením, působením jako osmotické činidlo, tak i jako tzv. „lapač radikálů“. Prolin nahromaděný během stresové epizody je degradován, aby poskytl zdroj energie, který bude pohánět růst, jakmile se stres zmírní. Prolinová homeostáza je důležitá pro aktivní dělení buněk, jelikož napomáhá při dlouhodobém stresu udržovat růst. Podtrhuje také důležitost expanze prolinového kanálu během přechodu z vegetativního na reprodukční růst a zahájení vývoje semene. Jeho úlohou v reprodukční tkáni je stabilizovat soubor semen a produktivitu. K vyrovnání abiotického stresu, je důležitý vývin strategie pro zvýšení prolinového kanálu v reprodukční tkáni (Kavi Kishor & Sreenivasulu 2014).

Akumulace prolinu může snížit stresem indukovanou buněčnou acidifikaci nebo primární oxidační respiraci pro poskytnutí energie potřebné k regeneraci (Hare & Cress 1997).

3.3.8 Vliv exogenní aplikace prolinu na rostliny

Při vystavení rostlin abiotickému stresu dochází ke zpomalení či úplnému zastavení jejich růstu. Exogenní aplikace prolinu však poskytla rostlinám po vystavení solnému stresu osmotickou protekci a také zvýšila jejich růst (Csonka & Hanson 1991; Yancey 1994). Roy *et al.* (1993) uvedli, že exogenně aplikovaný prolin v nízké koncentraci zmírnil nepříznivé účinky solného stresu na rýži (*Oryza sativa*) (Rhodes & Hanson 1993). Po přidání prolinu do kultivačního média v nízkých koncentracích byl účinně zmírněn pokles čerstvé hmotnosti, vyvolaný solným stresem, a také bylo sníženo peroxidační poškození lipidových membrán v jádře podzemnice olejné (*Arachis hypogea*). Vyšší koncentrace prolinu se naopak neprokázaly být prospěšné (Jain *et al.* 2001). Studie od Ehsanpour & Fatahian (2003) uvedla, že exogenní aplikace prolinu na kultivační médium, které bylo vystaveno solnému stresu, vedla ke zvýšení suché hmotnosti a také ke zvýšení obsahu volného prolinu v buňkách kalusu vojtěšky (*Medicago sativa*). Ali *et al.* (2007) uvádějí, že exogenní prolin, aplikovaný jako postříkové ošetření v juvenilní nebo ve vegetativní fázi kukuřice (*Zea mays*), vedl ke zvýšenému růstu v prostředí vodního deficitu. Prolin, aplikovaný jako mořidlo semen před setím, zmírnil u pšenice seté (*Triticum aestivum*) nepříznivé účinky vyvolané stresem z důvodu sucha, což vedlo ke zvýšení charakteristik růstu a výnosu (Kamran *et al.* 2009). Exogenní aplikace prolinu zapříčinila zvýšení růstu a udržení stavu živin podporou příjmu K⁺, Ca⁺, P a N u rostlin kukuřice (*Zea mays*), které byly vystaveny stresu prostředí vodního deficitu (Ali *et al.* 2008).

3.3.9 Vliv exogenního prolinu na vztahy mezi rostlinami, vodou a fotosyntézou

Je známo, že stres obecně mění vztahy mezi vodou a rostlinou (Barceló & Poschenrieder 1990), což může ovlivnit absorpci vody, vzestup mízy, stomatální funkci (Poschenrieder & Barceló 1999) a zpomalení biosyntézy chlorofylu (Singh & Tewari 2003) a nakonec vést ke snížení fotosyntézy. Snížení vodního potenciálu v listech (LWP) je také spojeno se stresem. Poruchy vztahů mezi rostlinami a vodou v důsledku expozice těžkým kovům spouští akumulaci prolinu. Tento účinek byl pozorován například v reakci na Cd v salátu (*Lactuca sativa*) (Costa & Morel 1994). Exogenní aplikace prolinu na bob obecný (*Vicia faba*) významně zvýšila LWP během stresu ze zasolení (Gadallah 1999). Doplněný exogenní prolin zmírnil snížení fotosyntetické aktivity a vztahů LWP pod solným stresem v olivovníku (*Olea europaea L. cv Chemlali*) a zmírňující účinek prolinu byl závislý na jeho koncentraci (ben Ahmed et al. 2010). Je dobře prokázáno, že prolin chrání rostliny před stresem stabilizací mitochondriálního transportního elektronového komplexu II (Hamilton & Heckathorn 2001), membrán a proteinů (Paleg et al. 1984; Hare et al. 1998; Mansour 1998; McNeil et al. 1999; Holmström et al. 2000) a enzymů jako je RUBISCO (Allen et al. 1997). Ve srovnání s jinými osmolyty, jako je glycin betain, byl exogenně aplikovaný prolin vysoce účinný při zmírňování stresu generovaného NaCl v buňkách tabáku (*Nicotiana rustica*) (Ashraf & Foolad 2007). Horní i dolní stomata bobu obecného (*Vicia faba*) reagovaly na různé koncentrace prolinu dodávané exogenně buď na oddělené listy nebo neporušené listy (Rajagopal 1981). Stomata na abaxiálních površích vykazovaly větší odolnost než ta na adaxiálních površích při exogenním ošetření prolinem. Kromě toho byly nižší koncentrace exogenního prolinu při zvyšování stomatální rezistence ještě účinnější než u postřiku kyselinou abcisovou ABA (Rajagopal 1981). Ve studii Rajagopala a Sinhy (1980), si exogenně aplikovaný prolin udržel turgiditu v listech rostlin ječmene (*Hordeum vulgare*) a pšenice (*Triticum aestivum*), které byly vystavené stresu (Rajagopal & Sinha 1980).

3.3.10 Vliv exogenního prolinu na oxidační stres a antioxidační systém

Rostliny nepřetržitě syntetizují reaktivní formy kyslíku (ROS) jako vedlejší produkt různých metabolických drah (Foyer et al. 1994). ROS hrají významnou roli při zajišťování ochrany před škodlivými patogeny (Alvarez & Lamb 1997; Doke 1997; Bolwell 2002). Jsou také důležité při tvorbě vodivých pletiv, procesu dřevnatění a několika dalších vývojových procesech (Tevini et al. 1991; Jacobson 1996; Fath 2002). Nadměrné hladiny ROS však vedou k oxidačnímu poškození rostlin, např. poškození nukleových kyselin, oxidaci bílkovin nebo lipidů a degradaci chlorofylových pigmentů (Fridovich 1986; Davies 1987; Imlay & Linn 1988; Schutzendubel & Polle 2002). Generace ROS by proto měla zůstat v mezích kompatibilních s rostlinami. Za normálních podmínek jsou ROS lapány různými antioxidačními obrannými sloučeninami (Alscher et al. 1997). Pokud jsou však rostliny vystaveny různým biotickým a abiotickým stresům, dochází ke zvýšení tvorby ROS (Dat et al. 2000; Mano 2002; Mittler 2002a). Tato zvýšená hladina ROS kromě způsobení výše uvedeného poškození je také příčinou odtoku K^+ z buňky (Shabala 2006).

Výzkumy naznačují, že prolin je odpovědný za lapání ROS a dalších volných radikálů (Smirnoff & Cumbes 1989; Bohnert et al. 1995; Noctor & Foyer 1998; Niyogi 1999; Hong et al. 2000; Okuma et al. 2004; Chen & Dickman 2005). Prolin, pokud je aplikován exogenně na

kořeny huseníčku rolního (*Arabidopsis*), vede ke snížené hladině ROS, což naznačuje potenciál prolinu sbírat ROS (Cuin & Shabala 2007). Dále exogenní aplikace prolinu také snížila ROS indukovaný odtok K⁺ (Cuin & Shabala 2007). Hoque a kol. (2007) uvádějí, že aktivity antioxidantních enzymů viz. kataláza (CAT), peroxidáza (POX) a superoxiddismutáza (SOD) byly významně zvýšeny, když byl prolin exogenně aplikován v tabákových suspenzních kulturách vystavených solnému stresu.

Dalším důležitým obranným systémem rostlin na protekci buněk před destruktivním ROS (tj. těmi generovanými v reakci na stres) je cyklus askorbát-glutathion (ASC-GSH) (Noctor & Foyer 1998). Exogenní aplikace prolinu zvyšuje aktivitu enzymů v cyklu ASC-GSH. Aktivita enzymů APX (askorbátperoxidáza), MDHAR (monohydro askorbátreduktáza) a DHAR (dihydro askorbátreduktáza), které jsou složkami cyklu ASC-GSH, byla významně zvýšena exogenní aplikací prolinu v tabákových kulturách vystavených solnému stresu (Hoque et al. 2007). Kaul a kol. (2008) pomocí studií in vitro prokázali, že exogenně aplikovaný L-prolin se ukázal jako účinný lapač volných radikálů (zejména ROS). Hong a kol. (2000) dospěli k závěru, že role prolinu jako lapače volných radikálů je důležitější při zmiřování stresu než jeho role jako jednoduchého osmolytu. Islam a kol. (2009) prokázali, že prolin a betain propůjčují toleranci vůči stresu z kadmia v kultivovaných tabákových buňkách zvýšením aktivity SOD a CAT a také snižují rychlost peroxidace lipidů.

3.3.11 Vliv exogenního prolinu na rostliny vystavené stresu ze salinity

Vysoká salinita je hlavním problémem, kterému čelí rostliny po celém světě, což má za následek vážné metabolické poruchy, které snižují produktivitu a výnos plodiny. Stres ze salinity snížil růst a obsah bílkovin v líru přímořském (*Pancreatium maritimum*). Tento účinek se však významně zvrátil, když byl exogenně dodán prolin (Khedr 2003). Kromě toho bylo v líru přímořském (*Pancreatium maritimum*) při exogenním dodávání prolinu významně překonáno snížení obsahu konjugátu ubikvitinu a inhibice antioxidantních enzymů katalázy a peroxidázy (Khedr 2003). Ve studii provedené Gadalláhem (1999), exogenní aplikace prolinu zcela zmírnila poškození vyvolané salinitou u bobu obecného (*Vicia faba*). Poruchy membrány vyvolané salinitou byly exogenním prolinem u bobu obecného (*Vicia faba*) také zmírněny (Gadallah 1999). Ve stejné studii aplikace exogenního prolinu zvýšila obsah chlorofylu v listech, relativní obsah vody v listech a celkový růst rostlin. Exogenní aplikace prolinu také zvýšila procento klíčivosti a délku kořenů u hrachu setého (*Pisum sativum*), vystaveného solnému stresu (Bar-Nun & Poljakoff-Mayber 1977). Ve studii Ehsanpoura a Fatahiana (2003) na buňkách kalusu tollice vojtěšky (*Medicago sativa*) vedl prolin, dodávaný exogenně do kultivačního média vystaveného solnému stresu, ke zvýšení suché hmotnosti a také zvýšil obsah volného prolinu v buňkách kalusu (Ehsanpour & Fatahian 2003). Exogenní přidání prolinu do živného média drasticky snížilo oxidační poškození membrán způsobené salinitou v kosmatici krystalovém (*Mesembryanthemum crystallinum L.*), což má za následek sníženou hodnotu peroxidace lipidů, ale i zvýšený obsah chlorofylu v listech rostlin stresovaných salinitou (Shevyakova et al. 2009).

3.3.12 Vliv exogenního prolinu na rostliny vystavené stresu z radiace

Škodlivé záření, jako je UV-B (280–320 nm), je důležitým environmentálním faktorem, který na vyšších úrovních nepříznivě ovlivňuje fotosyntézu a další fyziologické procesy (Allen et al. 1997; Rajendiran & Ramanujam 2003). V reakci na UV-B záření rostliny vyvíjejí řadu ochranných mechanismů, např. produkci screeningových pigmentů UV-B a syntézu ochranných sloučenin včetně flavonoidů a prolinu (Tevini et al. 1991; Saradhi et al. 1995a; Day & Vogelmann 1995). Volné radikály vytvářené v reakci na expozici UV-B jsou prolinem zachyceny (Saradhi et al. 1995a; Arora & Saradhi 2002). Studii Arory a Saradhi (2002) dále podpořilo zjištění, že juvenilní rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*), předem ošetřené NaCl, byly odolnější vůči UV-B záření. Tato zvýšená tolerance vůči expozici UV-B byla pravděpodobně způsobena akumulací prolinu, vyvolanou podmínkami solného stresu (Fedina et al. 2002). Kromě toho exogenní aplikace prolinu na juvenilní rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*) následovaná expozicí UV-B měla za následek snížení poměru chlorofyl/karotenoid, hodnoty vývoje kyslíku a fotochemické účinnosti PS II a také zvýšila akumulaci prolinu (Fedina et al. 2003). Snížený poměr chlorofyl/karotenoid exogenní aplikací prolinu byl způsoben syntézou pigmentů, které poskytovaly ochranu buňkám před expozicí UV-B záření (Fedina et al. 2003).

3.3.13 Vliv exogenního prolinu na rostliny vystavené teplotnímu stresu

Odchylka od optimální teploty má za následek vážné narušení růstu a vývoje rostlin. Tyto poruchy zahrnují narušení membrán v důsledku peroxidace lipidů, metabolické modifikace, změny obsahu bílkovin, enzymatické aktivity a únik elektrolytů a aminokyselin z buněk. Aplikace chlazení na tropické a subtropické rostliny, jako jsou fazole mungo (*Vigna radiata*) a sója (*Glycine max*), vedla k vážným fyziologickým a biochemickým dysfunkcím, z nichž většina je zprostředkována aktivními druhy kyslíku (Mittler 2002b).

Ochlazení citlivých semen, která jsou náchylná k nízkým teplotám během rané fáze vstřebávání, má za následek snížení procenta klíčivosti (Bramlage et al. 1978; Leopold 1980; Larcher 1981); špatný růst juvenilních rostlin a sníženou produktivitu rostlin (Larcher 1981). Hare a kol. (2003) zjistili, že klíčivost semen u huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*) byla posílena exogenně aplikovaným prolinem (Hare et al. 2003). Když byl prolin aplikován exogenně za stresu chladem, bylo také pozorováno zvýšení růstu rostlin (Fedina et al. 1993) a produktivity plodin (Itai & Paleg 1982).

Studie odhalily, že oxidační pentózo-fosfátová dráha (OPPP) hraje klíčovou roli při spouštění klíčení semen u různých druhů rostlin. Botha a kol. (1992) a Shetty (2004) navrhli, že existuje souvislost mezi OPPP a biosyntézou prolinu (Botha et al. 1992; Shetty 2004). To dále potvrdili Posmyk & Janas (2007), kteří našli pozitivní korelaci při vystavení stresu chladem mezi obsahem endogenního prolinu v semenech a při klíčení (Posmyk & Janas 2007).

Potlačené klíčení semen mungo fazolí (*Vigna radiata*) působením stresu teplotou 5 °C, bylo překonáno, když byla semena mořena prolinem. Další exogenní aplikace prolinu měla stimulační účinek, závislý na dávce, na klíčení semen mungo fazolí (*Vigna radiata*) (Posmyk & Janas 2007). Tento účinek exogenního prolinu byl přičítán stabilizačnímu potenciálu membrány (Matysik et al. 2002), který byl změněn z porézního a propustného na stabilní a nepropustný (Webster & Leopold 1977).

Peroxidace lipidů, vyvolaná ochlazením (Parkin & Kuo 1989), byla účinně překonána aplikací exogenního prolinu u mungo fazolí (*Vigna radiata*) (Posmyk & Janas 2007). Exogenní prolin působil jako aktivní lapač kyslíku, čímž překonal oxidační stres, vyvolaný chlazením (Posmyk & Janas 2007). Swaaij a kol. (1985) určili, že aplikace exogenního prolinu vedla ke zvýšené toleranci chladu v listech lilku (*Solanum*) (Swaaij et al. 1985). Exogenní ošetření prolinem také zvýšilo obsah prolinu v listech, čímž zmírnilo stres vyvolaný chladem. Kromě toho, že exogenní prolin působil jako lapač volných radikálů a stabilizátor membrán, působil také jako zdroj dusíku a uhlíku, čímž zlepšil růst a regeneraci juvenilních rostlin mungo fazolí (*Vigna radiata*), vystavených stresu chladem (Posmyk & Janas 2007).

3.3.14 Vliv exogenního prolinu na ostatní metabolity a enzymy

Je známo, že exogenní aplikace prolinu kromě zvýšení aktivity antioxidantních enzymů (CAT, POX a SOD) zvyšuje aktivitu dalších enzymů (Hoque et al. 2007). Aktivita nitrogenázy ve hlízkách na kořenech sójových bobů (*Glycine max*) stresovaných suchem byla významně navýšena po exogenní aplikaci prolinu. Avšak když byly testovány i jiné osmolyty, jako je malát, nedošlo v hlízkách stresovaných suchem k žádnému významnému zvýšení aktivity nitrogenázy (Pedersen et al. 1996). Je známo, že prolin působí jako ochranný enzym během podmínek abiotického stresu (Okuma et al. 2000; Sharma & Shanker Dubey 2005). Tento účinek je dále podporován zjištěním, že exogenní aplikace prolinu zmírnila stres zasolením zvýšením regulace proteinů chránících proti stresu v líru přímořském (*Pancreatium maritimum*) (Khedr 2003) a snížením oxidace lipidových membrán v tabáku (Okuma et al. 2004).

Je dobře známo, že stres vede ke zvýšené akumulaci prolinu v kořenových hlízkách. Kohl a kol. uvádějí, že stres z vodního deficitu vyvolal aktivitu enzymů prolinového metabolismu, jako je prolin dehydrogenáza (PRODH) v bakterioidech, což naznačuje, že prolin může být importován do symbiosomů jako substrát pro bakteroidy během období stresu (Kohl et al. 1991). Toto zjištění bylo dále potvrzeno pozorováním, kdy poté co byl prolin aplikován exogenně na sójové (*Glycine max*) hlízky stresované suchem, byl relativně rychlejší tempem importován přes symbiosomovou membránu a dále metabolizován bakteroidy a použit ke zvýšení aktivity nitrosázy v hlízkách (Pedersen et al. 1996). Kromě toho prolin chránil enzymy před teplem, salinitou nebo stresem z chladu za podmínek in vitro (Paleg et al. 1981; Krall et al. 1989). Je to způsobeno skutečností, že trojrozměrná struktura proteinů je řízena hydrofobními a hydrofilními iontovými interakcemi a interakcemi mezi postranními řetězci složky aminokyselin. Prolin by mohl zasahovat do těchto vazeb postranních řetězců a vyvolat konformační změny v enzymovém proteinu, a tak ovlivnit jejich aktivitu (Schobert 1977; Paleg et al. 1981).

Gadallah (1999) uvedl, že obsah rozpustných cukrů, hydrolyzovatelných cukrů a rozpustných proteinů v bobu obecném (*Vicia faba*), který byl stresován zasolením, významně vzrostl, když byl prolin dodáván exogenně. Posmyk & Janas (2007) uvedli, že juvenilní rostliny mungo fazolí (*Vigna radiata*) vystavené stresu chladem, vedly ke zvýšení obsahu fenolických látek po dodání exogenního prolinu. Fenolika jako endogenní prolin působí jako lapač volných radikálů, čímž překonává oxidační stres (Janas et al. 2000; Shetty et al. 2001).

3.3.15 Toxicita prolinu v rostlinách

Navzdory příznivým účinkům exogenní aplikace má prolin toxické účinky v případě, že je nadměrně akumulován či aplikován v nadměrných koncentracích. Takové negativní účinky exogenního prolinu byly pozorovány u rajčat (*Solanum*), kde byla pozorována nerovnováha v anorganických iontech (Heuer 2003). Pokud byl prolin v nízké koncentraci (např. 30 mM) aplikován exogenně, zmírnil účinky stresu ze zasolení na časný růst semen rýže seté (*Oryza sativa*), zatímco při vyšších koncentracích (40–50 mM) prolin vedl k toxickým účinkům a špatnému růstu rostlin (Roy et al. 1993). Ve studii Hare a kol. (2001) bylo prokázáno, že prolin aplikovaný exogenně v nízké koncentraci zvyšoval in vitro organogenezi u explantátů hypokotylů huseníčku rolního (*Arabidopsis*) zatímco jeho růst byl při vyšších koncentracích inhibován. Vysvětlení tohoto toxického účinku exogenního prolinu je přičítáno skutečnosti, že nižší koncentrace aktivovaly cyklus syntézy cytosolického prolinu z glutamátu a mitochondriální degradace prolinu, který současně poskytoval NADP⁺ k řízení biosyntézy cytosolického purinu a snižování ekvivalentů mitochondriální fosforylace ADP (Hare et al. 2003). Indukce exogenním prolinem genu huseníčku rolního (*Arabidopsis*), který kóduje prolin dehydrogenázu (PRODH) (Kiyosue et al. 1996), je v souladu s touto hypotézou. Při vyšších hladinách exogenního prolinu však zpětnovazebná inhibice Δ 1-pyrolin-5-karboxylát syntetázy (P5CS) (Zhang et al. 1995; Garcia-Rios et al. 1997) blokovala biosyntetickou část tohoto cyklu, a tím inhibovala organogenezi, jako u huseníčku rolního (*Arabidopsis*) (Hare et al. 2001). Byly také pozorovány toxické účinky exogenního prolinu, kde byl inhibován růst suspenzní kultury slané trávy (*Distichlis spicata*), když byl exogenně aplikován prolin ve vysoké koncentraci. Toto ošetření také snížilo biosyntézu prolinu (Rodriguez & Heyser 1988).

Chen & Kao (1995) naznačili, že vysoké koncentrace prolinu napodobují toxické účinky kadmia u juvenilních rostlin rýže seté (*Oryza sativa*). Nanjo a kol. (2003) hodnotili toxicitu prolinu u mutantní pdh značené T-DNA v huseníčku rolním (*Arabidopsis*), která byla defektní v prolin dehydrogenáze (At PRODH), zodpovědné za katalyzaci prvního kroku katabolismu prolinu. Tato mutace pdh byla přecitlivělá na exogenní L-prolin v koncentracích <10 mM, zatímco planá varianta při těchto koncentracích rostla normálně (Nanjo et al. 2003).

Kromě výše uvedených toxických účinků exogenního prolinu bylo prokázáno, že pokud je dodáván ve vysokých koncentracích destabilizuje DNA helix, snižuje bod tání DNA, zvyšuje citlivost na nukleázu S1 a zvyšuje necitlivost na DNA-ázu1 (Rajendrakumar et al. 1997)

5 Metodika

V rámci pokusu byl sledován vliv vodního deficitu a souběžný vliv exogenní aplikace prolinu u rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum*) odrůdy Bohemia na obsah volného prolinu v rostlinných pletivech, s předpokladem možnosti využití této látky proti stresu z vodního deficitu.

U modelových rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum*) byla uskutečněna foliární aplikace prolinu a simulován vodní stres. Byl hodnocen obsah metabolitů rostliny (prolin) a sledovány vybrané fyziologické parametry.

Během experimentu byly rostliny pšenice seté „*Triticum aestivum*“ pěstovány za tepleně řízených podmínek a částečně řízených světelných podmínek v experimentálním skleníku katedry botaniky a fyziologie rostlin FAPPZ ČZU v Praze. V denních hodinách byla teplota nastavena na 25 °C a v nočních hodinách na 18 °C. Rostliny byly pěstovány v PVC boxech o rozměru 37 cm x 27 cm x 14 cm. Výsev proběhl 17.8.2020 do zahradního substrátu A (maximálně 10 % částic nad 10 mm), pH ve vodném roztoku 5,5 – 6,5, substrát byl prostý plevelů a škůdců, obsah spalitelných látek ve vysušeném vzorku byl 55%, obsah živin: N: 80 – 120 mg.l⁻¹, P₂O₅: 50 – 100 mg.l⁻¹, K₂O: 100 – 150 mg.l⁻¹. obsah rizikových prvků podle zákonného limitu v mg.kg⁻¹ sušiny: Cd 1; Pb 100; Hg 1; As 10; Cr 100; Cu 100; Ni 50; Zn 200. V průběhu celého experimentu byla snaha o simulaci průběhu jednotlivých agrotechnických postupů, které jsou používány i v praxi. Po výsevu jednotlivých semen do 18 pěstebních nádob ve sponu (4 řady x 7 sloupců x 2 semena), byly rostliny pravidelně zavlažovány a dohnojovány na výnosový potenciál. Ve fázi BBCH 27 proběhlo krácení rostlin přípravkem CCC a zároveň tato aplikace ve skleníkových podmínkách měla podpořit odnožování rostlin. Před zahájením pokusu, kterým byla exogenní aplikace prolinu, proběhlo dohnojení substrátů na přibližný odběrový normativ pšenice seté, na výnosový potenciál 5 t N, P, K a Mg. Poté následovalo rozdělení rostlin do jednotlivých skupin podle stresu a aplikace účinné látky: jednotlivé varianty, zavlažovaná varianta bez aplikace prolinu (K), zavlažovaná varianta s aplikací prolinu (KP), Varianta vystavena stresu suchem (S), stresovaná varianta s aplikací prolinu (SP). V průběhu pokusu byly stresované varianty v některých termínech zavlažovány, a to proto, aby se pro zkoumané rostliny nestalo příliš vysoké sucho letálním. Cílem bylo rostliny dopěstovat do fáze metání.

Časový harmonogram pokusu:

Výsev 17.8.2020

27.8.2020 - Aplikace CCC (3,75 g/1 l), močoviny (70 g/1 l), MgSO₄ (50 g/1 l)

10.9.2020 - Foliární aplikace mikroelementy prolinu (0,0115 g/100 ml = 1 mM roztok)

17.9.2020 - Ø zálivka

24.9.2020 - 1. odběr 7 dní dehydratace

1.10.2020 – 2. odběr 14 dní dehydratace

2.10.2020 – 1 den rehydratace

8.10.2020 - 3. odběr 7 dní rehydratace

5.1 Stanovení obsahu volného prolinu

Použitá metodika pro stanovení koncentrace prolinu v rostlinném pletivu byla upravena z původní metodiky podle Batese (1973). Volný prolin je z rostlinného pletiva získán pomocí 3% kyseliny sulfosalicylové. Tato bezbarvá kyselina působí jako efektivní proteinové srážedlo ve vodném roztoku, do něhož jsou vložena rostlinná pletiva a následně jsou drcena. Pro detekci prolinu je využita reakce s ninhydrinem, jelikož společně vyvíjí barevnou látku schopnou absorbovat elektromagnetické záření tzv. chromofor. K extrakci prolin-ninhydrinového chromoforu se používá toluen, do kterého tato sloučenina velmi ochotně přechází. Spektrum daného chromoforu je zjištěno ve spektrofotometru (Bates et al. 1973).

Vzorek listového pletiva (bez střední žilky) o hmotnosti 0,5 g byl nejprve rozetřen v 10 ml 3% kyseliny sulfosalicylové v třecí misce. Homogenizovaná směs byla přefiltrována přes Bychnerovu nálevku s filtračním papírem. Dále byla vytvářena analytická směs z 1 ml filtrátu, 1 ml ninhydrinu a 1 ml kyseliny octové ve třech opakováních, ta byla dále promísena na třepačce po dobu 10 minut a posléze vařena při 80 až 90 °C po dobu 30 minut. Po uplynulé době, která byla nezbytná pro dostatečný vývoj barvy, jsme nechali vzorky zchladnout. Po vychladnutí bylo do každé zkumavky se vzorkem přidáno adekvátní množství toluenu. To činilo 3 ml a směs byla opět protřepána na třepačce. Po oddělení fází (cca 20 minut) byla proměřena absorbance horní vrstvy vzorků při 520 nm na spektrofotometru UV-Vis, Evolution 210 a srovnána s kalibrační křivkou.

5.2 Listový vodní potenciál

Vzorky listů pro stanovení potenciálu listové vody (yw) byly umístěny do injekční stříkačky, utěsněny Para filmem a zmrazeny na teplotu -24 °C. Před samotným měřením byly injekční stříkačky udržovány na laboratorní teplotě, dokud se tkáň zcela nerozmrazila. Vodní potenciál (MPa) byl stanoven na základě několika kapek buněk na terče filtračního papíru Whatman Grade 1 o průměru 1,5 cm a měřen pomocí přístroje WP 4C Dew Point PotentialMeter (Decagon Devices, Inc., USA). Měření těchto parametrů probíhalo během tří opakování pěti vzorků rostlin.

5.3 Listová výměna plynů

Čistá asimilace CO₂ (A; $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), stomatální vodivost (gs; $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a transpirace (E; $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) byly měřeny na 4. nebo 5. plně vzrostlých listech *in situ* pomocí přenosného systému pro výměnu plynů LCi Portable Photosynthesis System (ADC BioScientific Ltd., Hoddesdon, Velká Británie). Výměna plynu byla měřena od 9:00 do 11:00 středoevropského času. Ozáření bylo 450 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fotosynteticky aktivního záření (PAR), teplota v měřicí komoře byla 23 °C a doba měření každého vzorku byl 15minutový interval po stanovení podmínek v ustáleném stavu uvnitř měřicí komory. Měření těchto parametrů proběhlo vždy na jednom listu z výběru tří rostlin.

5.4 Efektivita využití vody

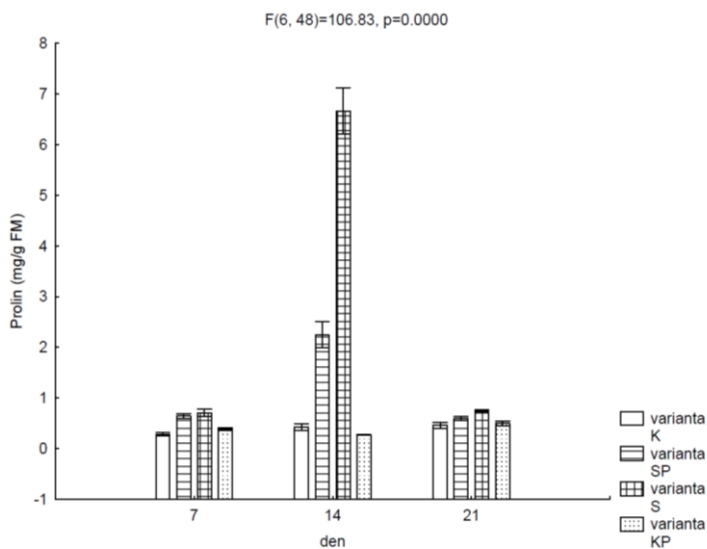
Definice účinnosti využívání vody (WUE) je poměr mezi efektivním využitím vody a skutečným odběrem vody neboli účinnost využití vody (WUE) označuje poměr vody použité v metabolismu rostlin k vodě ztracené rostlinou při transpiraci. Charakterizuje v konkrétním procesu, jak efektivní je použití vody. Pro výpočet WUE byl použit poměr čisté asimilace CO₂ (fotosyntézy) a transpirace.

5.5 Statistické analýzy

Pro analýzu rozptylu vodního deficitu u sledovaných variant rostlin byla provedena ANOVA. Hodnoty ANOVA a HSD pro každou proměnnou byly analyzovány pomocí rozptylu vodního režimu. Analýza byla provedena pomocí statistického programu STATISTICA 12 (StatSoft CR, s.r.o.) Významné rozdíly mezi průměrem opakování byly testovány pomocí Tukeyho HSD testu.

6 Výsledky

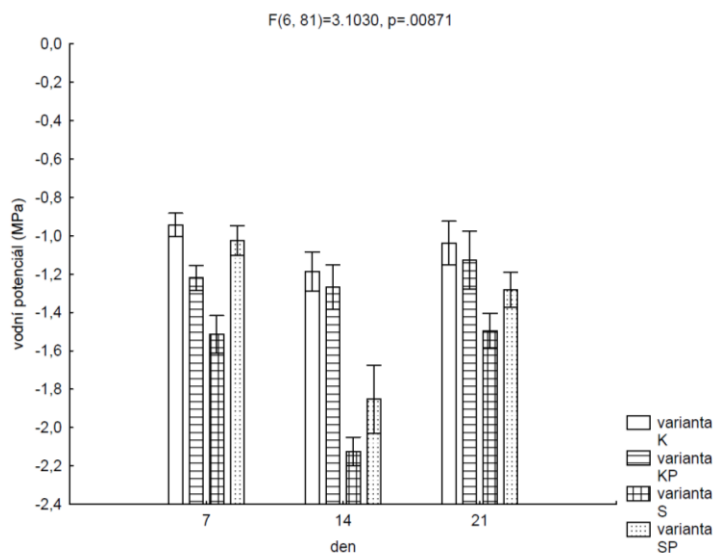
6.1 Obsah prolinu v biomase



Graf 1: Obsah prolinu (mg. g⁻¹ FM) v biomase sledovaných rostlin: varianta K – kontrola, v. SP – stresovaná varianta s aplikací prolinu, v. S – stresovaná varianta bez aplikace prolinu, v. KP – kontrola s aplikací prolinu

V grafu 1 je zobrazen dopad vodního deficitu na obsah prolinu (mg. g⁻¹ FM) v listech sledovaných rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum*). Z grafu jsou viditelné patrné rozdíly v obsahu prolinu mezi jednotlivými variantami vystavenými vodnímu deficitu vůči variantám kontrolním. V počátku pokusu (při prvním odběru rostlin) byl u všech variant po 7 dnech dehydratace rozdíl v hodnotách obsahu prolinu mezi jednotlivými variantami neprůkazný. S postupným působením vodního deficitu došlo k nárůstu obsahu prolinu u stresovaných variant. Při druhém odběru, tj. po 14 dnech dehydratace, došlo ke statisticky významnému nárůstu obsahu prolinu u obou stresovaných variant. Varianta SP obsahovala až 8násobek hodnoty obsahu prolinu oproti kontrolní variantě KP a varianta S obsahovala až 15násobek hodnoty obsahu prolinu v listech oproti kontrolní variantě K. Po následujících 7 dnech rehydratace se naměřený obsah prolinu v listech všech sledovaných variant navrátil k obdobným hodnotám, které byly naměřeny při prvním odběru.

5.2 Vodní potenciál

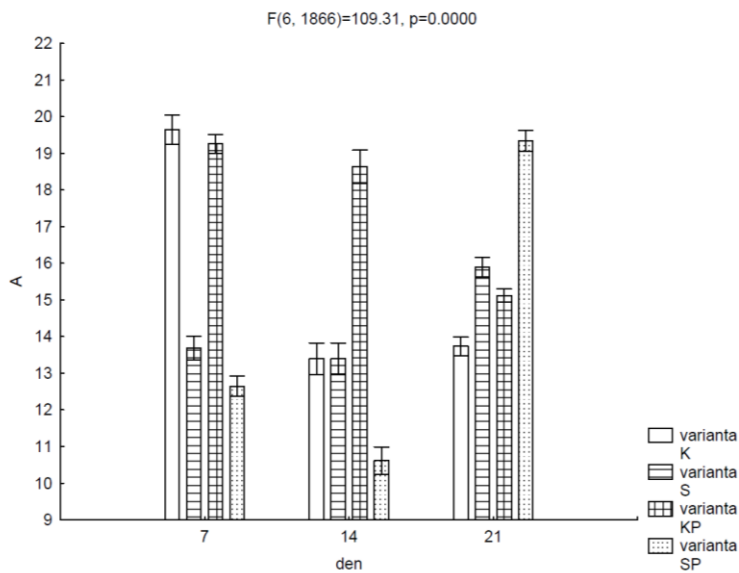


Graf 2: Vodní potenciál (MPa) sledovaných variant rostlin: varianta K – kontrola, v. SP – stresovaná varianta s aplikací prolinu, v. S – stresovaná varianta bez aplikace prolinu, v. KP – kontrola s aplikací prolinu

V grafu 2 je zobrazen dopad vodního deficitu na vodní potenciál (MPa) v listech sledovaných rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum*). Z grafu jsou viditelné patrné rozdíly v hodnotách vodního potenciálu (MPa) mezi jednotlivými variantami vystavenými vodnímu deficitu vůči variantám kontrolním. V počátku pokusu (při prvním odběru rostlin) došlo k průkaznému snížení vodního potenciálu u stresované varianty. U ostatních variant nebyl po 7 dnech dehydratace statisticky významný rozdíl v hodnotách vodního potenciálu. S postupným působením vodního deficitu došlo při druhém odběru, tj. po 14 dnech dehydratace k výraznému snížení vodního potenciálu u stresovaných variant. U varianty SP došlo ke snížení vodního potenciálu o polovinu oproti kontrolní variantě KP a u varianty S došlo k poklesu téměř o dvojnásobek hodnoty vodního potenciálu v listech oproti kontrolní variantě K. Po následujících 7 dnech rehydratace se naměřené hodnoty vodního potenciálu v listech všech sledovaných variant navrátily k obdobným, statisticky rozdílně nevýznamným hodnotám, které byly naměřeny při prvním odběru.

Okomentoval(a): [F1]: Prostudujte ten vodní potenciál, ať víte oč se jedná

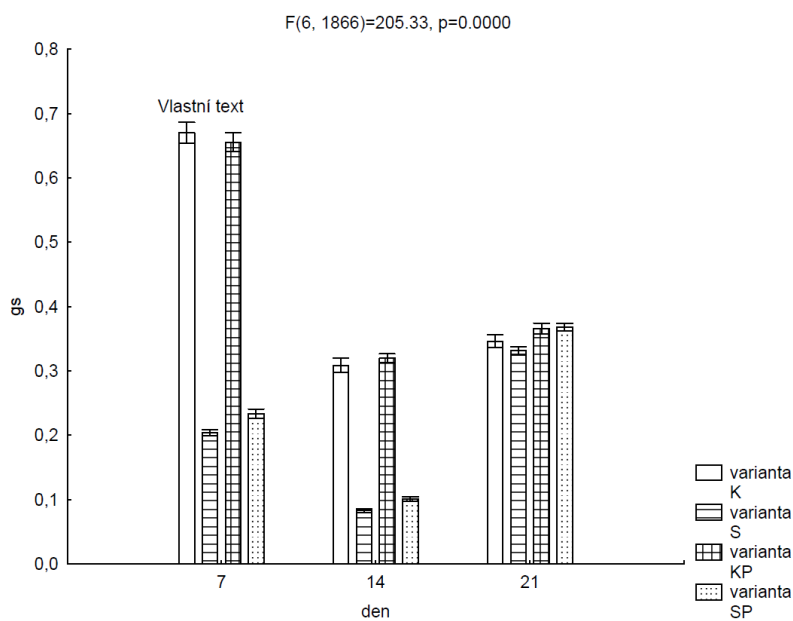
5.3 Čistá asimilace CO₂



Graf 3: Čistá asimilace CO₂ (A; μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) sledovaných variant rostlin: varianta K – kontrola, v. SP – stresovaná varianta s aplikací prolinu, v. S – stresovaná varianta bez aplikace prolinu, v. KP – kontrola s aplikací prolinu

V grafu 3 je zobrazen dopad vodního deficitu na čistou asimilaci CO₂ (A; μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) v listech sledovaných rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum*). Z grafu jsou viditelné patrné rozdíly v hodnotách A mezi všemi jednotlivými variantami. V počátku pokusu (při prvním odběru rostlin) po 7 dnech dehydratace byl naměřen statisticky významný rozdíl v hodnotách asimilace CO₂ mezi variantami kontrolními a variantami stresovanými. S postupným působením vodního deficitu došlo k významnému snížení hodnoty čisté asimilace CO₂ stresované varianty SP. Při druhém odběru, tj. po 14 dnech dehydratace, došlo ke statisticky významnému snížení čisté asimilace CO₂ u variant K a SP (o 17 %). Po následujících 7 dnech rehydratace se hodnota čisté asimilace CO₂ výrazně statisticky zvýšila u varianty SP a dále se zvýšila u varianty S. Naopak u varianty KP se hodnota čisté asimilace CO₂ výrazně po 7 dnech rehydratace snížila. K snížení rychlosti fotosyntézy došlo rovněž u kontrolní varianty při druhém a třetím měření.

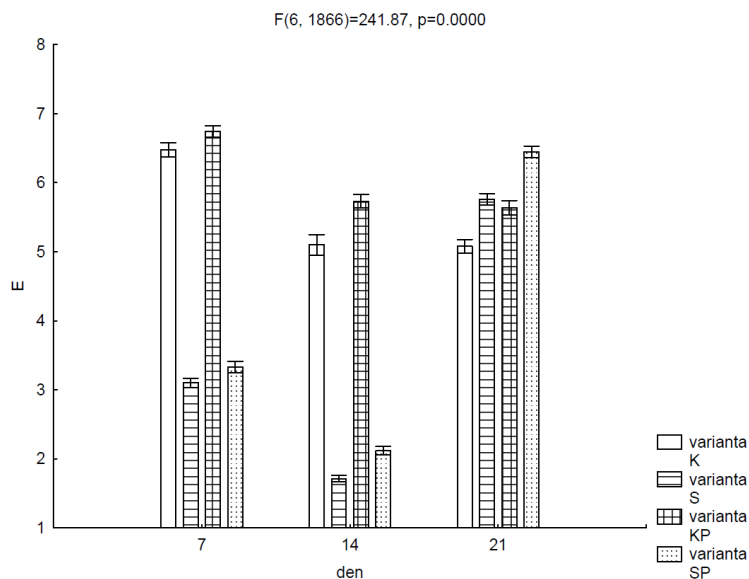
5.4 Stomatální vodivost



Graf 4: Stomatální vodivost sledovaných variant rostlin (gs; mol m⁻² s⁻¹): varianta K – kontrola, v. SP – stresovaná varianta s aplikací prolinu, v. S – stresovaná varianta bez aplikace prolinu, v. KP – kontrola s aplikací prolinu

V grafu 4 je zobrazen dopad vodního deficitu na stomatální vodivost (gs; mol m⁻² s⁻¹) v listech sledovaných rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum*). Z grafu jsou viditelné patrné rozdíly ve stomatální vodivosti mezi jednotlivými variantami vystavenými vodnímu deficitu vůči variantám kontrolním. V počátku pokusu (při prvním odběru rostlin) byl po 7 dnech dehydratace statisticky významný rozdíl v hodnotách stomatální vodivosti mezi kontrolními a stresovanými variantami, kdy stresované varianty měly o cca 70% nižší hodnotu gs oproti kontrolním variantám. S postupným působením vodního deficitu došlo po 14 dnech dehydratace (při druhém odběru) ke snížení rozdílu mezi těmito variantami, avšak hodnoty gs u všech variant se statisticky snížily. Po následujících 7 dnech rehydratace se při třetím odběru rostlin hodnoty gs stresovaných variant statisticky významně, oproti hodnotám z druhého odběru, zvýšily. Hodnoty gs kontrolních variant se na obdobné hodnoty taktéž zvýšily.

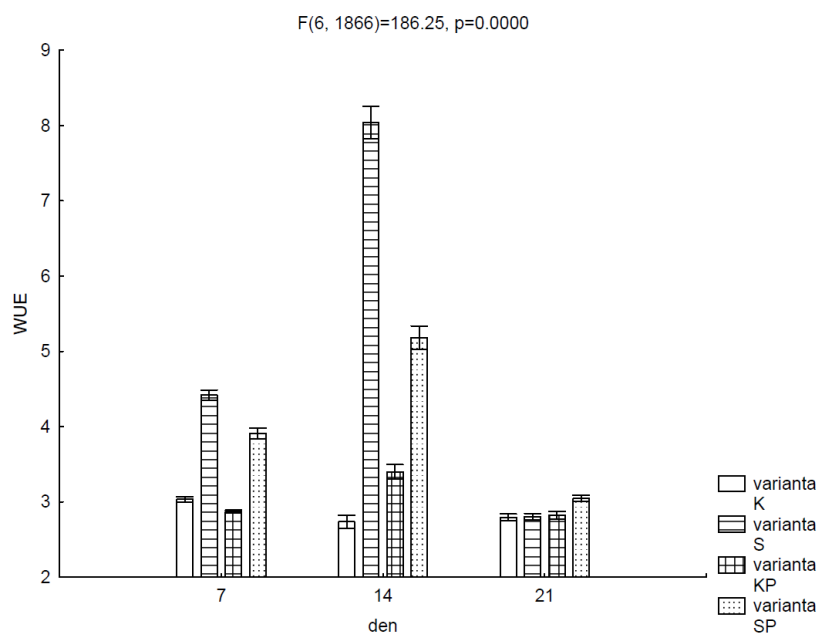
5.5 Transpirace



Graf 5: Transpirace sledovaných variant rostlin (E ; $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$): varianta K – kontrola, v. SP – stresovaná varianta s aplikací prolinu, v. S – stresovaná varianta bez aplikace prolinu, v. KP – kontrola s aplikací prolinu

V grafu 5 je zobrazen dopad vodního deficitu na transpiraci (E ; $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) v listech sledovaných rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum*). Z grafu jsou viditelné patrné rozdíly v transpiraci mezi jednotlivými variantami vystavenými vodnímu deficitu vůči variantám kontrolním. V počátku pokusu (při prvním odběru rostlin) byl po 7 dnech dehydratace statisticky významný rozdíl v hodnotách transpirace mezi kontrolními a stresovanými variantami, kdy stresované varianty měly cca o 50% nižší hodnotu E oproti kontrolním variantám. S postupným působením vodního deficitu došlo po 14 dnech dehydratace (při třetím odběru) ke zvětšení rozdílu mezi těmito variantami, avšak hodnoty E u všech variant se statisticky snížily. Po následujících 7 dnech rehydratace se při třetím odběru rostlin hodnoty E stresovaných variant statisticky významně, oproti hodnotám z druhého odběru, zvýšily. Hodnoty E kontrolních variant mezi 2. a 3. odběrem víceméně stagnovaly.

5.6 Efektivita využití vody



Graf 6: Efektivita využití vody (WUE) sledovanými variantami rostlin: varianta K – kontrola, v. SP – stresovaná varianta s aplikací prolinu, v. S – stresovaná varianta bez aplikace prolinu, v. KP – kontrola s aplikací prolinu

V grafu 6 je zobrazen dopad vodního deficitu na efektivitu využití vody (WUE) v listech sledovaných rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum*). Z grafu jsou viditelné patrné rozdíly v hodnotách WUE mezi jednotlivými variantami vystavenými vodnímu deficitu vůči variantám kontrolním. V počátku pokusu (při 1. odběru rostlin) byl po 7 dnech dehydratace statisticky významný rozdíl v hodnotách WUE mezi kontrolními a stresovanými variantami, kdy stresované varianty měly o 45 % (S) a 39 % (SP) větší hodnotu WUE oproti kontrolním variantám. S postupným působením vodního deficitu došlo po 14 dnech dehydratace (při 2. odběru) ke statisticky významnému rozdílu mezi stresovanými variantami. Došlo ke zvětšení rozdílu mezi těmito variantami, kdy byla hodnota WUE varianty S o 55 % vyšší, než byla hodnota SP. Po následujících 7 dnech rehydratace se při 4. odběru rostlin hodnoty WUE všech variant ustálily na obdobné, statisticky nevýznamně rozdílné hodnoty. U stresovaných variant tohoto bylo docíleno statisticky významným poklesem hodnot WUE.

Okomentoval(a): [F2]: Bezrozměrné, je to poměr fotosyntéza ku transpiraci, je třeba doplnit do metodiky jak bylo vypočítáno

7 Diskuze

Při experimentu byl sledován vliv foliární aplikace prolinu na rostliny pšenice seté (*Triticum aestivum*) v podmínkách vodního deficitu. Bylo pozorováno několik parametrů, na které mohl mít obsah prolinu z teoretického hlediska určitý vliv.

Výskyt sucha a jeho rozšiřování související se změnou klimatu (Sourour 2017) a neefektivním využíváním vodních zdrojů po celé Zemi vytvořilo současnou problematiku pozorování vlivu abiotických stresů – hlavně vodního deficitu, na metabolismus rostlin a jejich obranné mechanismy proti stresovým podmínkám (Farooq et al. 2009). Bylo zjištěno, že rostliny v rámci odpovědi na vodní deficit akumulují mimo jiné právě prolin, jehož vlastností je osmoprotekce rostlinných buněk (Kavi Kishor & Sreenivasulu 2014).

7.1 Obsah prolinu

Schopnost prolinu chránit různé organismy během stresu zahrnuje celou řadu molekulárních mechanismů, z nichž každý této schopnosti přispívá odlišně v závislosti na fyziologických a metabolických souvislostech. Rozpoznávání mechanismů, jak prolin ovlivňuje reakci na stres a redoxní homeostázu, je také komplikováno skutečností, že je prolin proteinogenní aminokyselina. Je tedy třeba pečlivě odlišit účinky metabolismu prolinu během stresu od potenciálních dopadů na syntézu bílkovin, které mohou narušovat běžné buněčné procesy a přežití buněk (Kavi Kishor 2015).

Akumulace prolinu je běžnou fyziologickou reakcí na různé stresy. Transgenní přístupy potvrdily příznivý účinek nadprodukce prolinu během stresu. Nebylo však dosaženo shodného názoru ohledně přesných rolí akumulace prolinu (Bandurska & Józwiak 2011). Rovnováha mezi biosyntézou a degradací prolinu je navíc považována za nezbytnou pro stanovení osmoprotektivních funkcí prolinu (Fedina et al. 2002).

Řada autorů se ve svých na sobě navzájem nezávislých studiích shoduje na tom, že v případě vystavení rostlin nepříznivým environmentálním podmínkám v sobě akumulují prolin (Bohnert et al. 1995; Hasegawa et al. 2000; Heerden & Krüger 2002; Ashraf & Foolad 2007; Seki et al. 2007). Námi provedený experiment toto tvrzení potvrzuje, viz Graf 1. Bylo však pozorováno snížení akumulace prolinu u stresované varianty pšenice SP oproti variantě S, která byla ošetřena exogenně prolinem, což může souviset s aktivací enzymů degradujících prolin. Externě dodaný prolin k transgenní *Arabidopsis* však inhiboval enzym P5CS, který může blokovat biosyntézu prolinu (Szabados & Saviouré 2010)

7.2 Vodní potenciál

Při vystavení abiotickým stresům si rostliny vyvinou různé adaptivní mechanismy pro udržení tlaku buněčného turgoru (Zhang et al. 2017). Jedním z nejúčinnějších mechanismů je osmotická regulace hromaděním značného množství osmoprotektantů, jako je prolin (Qayyum et al. 2011).

Aminokyselina prolin byla označena jako osmolyt, který se hromadí během nedostatku vody, přispívá jako osmoregulant a umožňuje rostlinám bojovat proti tomuto stresu (Csonka 1989)

Snížení osmotického potenciálu v reakci na vodní stres je dobře zavedený mechanismus, kterým se mnoho rostlin přizpůsobuje nízké dostupnosti půdní vody (Krizmanić et al. 2003).

Z Grafu 2 vyplývá, že vodní potenciál variant sledovaných stresovaných rostlin S a SP byl vodním deficitem ovlivněn. Varianta SP v průběhu pokusu oproti stresované variantě nenabývala tak nízkých hodnot osmotického potenciálu jako varianta S. Tento trend může být zapříčiněn exogenní aplikací prolinu u varianty SP, která způsobila přivření průduchů v počáteční fázi pokusu a tím umožnila rostlině efektivněji využívat vodu, díky čemuž nedošlo k tak velkému snížení osmotického potenciálu jako ve variantě S. Kahlaoui a kol. (2018) došel u lilku rajčete k podobným závěrům.

7.3 Výměna plynů

Podle Evanse a kol. (1994), změna anatomických charakteristik listů může změnit složky difúze vodivosti CO₂ ze substomatálních dutin do míst karboxylace, a tak přispět k udržení konkrétních fotosyntetických rychlostí, a to navzdory nízké vodivosti stomatu při zasažení stresem ze sucha. Podobně ukázaly měření fotosyntézy listů při vysoké koncentraci CO₂ v několika C₃ rostlinách při nasyceném světle, kdy se fotosyntetická kapacita významně nesnížila, dokud nedosáhl nedostatek listové vody kritické hodnoty. Tedy pokles čistého příjmu CO₂ listy při mírném stresu suchem je přisuzován zejména uzavření průduchů (Morgan 1984).

Z výše uvedených poznatků můžeme usuzovat, že v našem experimentu (viz Graf 3) obě stresované varianty rostlin uzavřely své průduchy již při prvním odběru, a proto se mezi nimi nevyskytovaly žádné markantní rozdíly v jejich čisté asimilaci CO₂. Naopak významný nárůst rychlosti asimilace CO₂ se dostavil při třetím odběru u varianty SP. Dá se soudit, že tento signifikantní nárůst byl podpořen z důvodu foliární aplikace prolinu. Dawood a kol. (2014) sledoval podobný vliv exogenní aplikace prolinu.

Vliv aplikace prolinu na stomatální vodivost gs nebyl prokázán, jelikož se hodnoty gs mezi stresovanými variantami S a SP nijak významně nelišily, viz Graf 4. Jiné studie poukazují na trend zvyšování stomatální vodivosti u variant s exogenní aplikací prolinu např. u rajčete (Heuer 2003) a fazolu (Dawood et al. 2014).

Mírného rozdílu u stresovaných variant se dostalo transpiraci E, kdy po třetím odběru byla naměřena hodnota vyšší u varianty SP nežli u varianty S, viz Graf 5. Benešová a kol. (2012) dosáhla ve své studii podobných výsledků. Klimešová a kol. (2017) ve své práci konstatuje, že rostliny stimulované i nestimulované, jež byly po celou dobu ve vláhové jistotě, měly celkově stabilnější hodnoty transpirace než rostliny pod vlivem vodního deficitu.

7.4 Efektivita využití vody

Efektivita využití vody (WUE) na úrovni listů, je dána souhrou mezi přechodnou aktivitou fotosystému, koncentrací CO₂ v substomatální dutině a stomatální aktivitou (Farquhar et al. 1989). Množství vody transpirované na danou jednotku asimilace CO₂ je zajímavým fyziologickým měřítkem. WUE měříme jako poměr čisté fotosyntézy a transpirace listu (A/E)

= WUE. Poměr veličiny fotosyntéza (A) ku transpiraci (E) nám udává hodnotu, kolik uhlíku byla rostlina schopna vyvázat na množství odpařené vody a tato veličina se nazývá efektivita využití vody WUE (Šantrůček, 2010). V našem zájmu bylo pozorovat asimilaci CO₂ a transpiraci při stresu suchem na rostliny a zároveň vliv aplikace prolinu na sledované rostliny. Uzavření průduchů, které je obecně negativní reakcí (bez ohledu na přežití za silného sucha), může být řízeno řadou determinantů, jako je vnitřní koncentrace CO₂ v listu, buněčné rozpustné látky, specifické ionty, pH a kyselina abscisová, produkovaná v listech (Araus et al. 2002). Z Grafu 6 je patrné, že v našem experimentu dosáhla největší hodnoty efektivity využití vody varianta S, čehož dosáhla největším poměrem asimilace CO₂ a transpirace. Tento výsledek se dá pravděpodobně vysvětlit nejefektivnějším uzavřením průduchů a tím i nejmenší ztrátou vody. Benešová (2012) se ve své studii dopracovala obdobných výsledků. Hejnák a kol. (2003) ve své studii uvedli, že intenzita WUE by se s vyšší zatížení rostlin stresem měla snižovat. Ovšem z výsledků v této práci je patrné, že intenzita WUE spíše narůstala.

8 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo sledovat vliv vodního deficitu a exogenní aplikace prolinu u rostlin pšenice seté (*Triticum aestivum*), odrůdy *Bohemia*, na obsah volného prolinu v listech a na základní fyziologické parametry.

1. V experimentu bylo dokázáno, že rostliny po exogenní aplikaci prolinu v podmínkách vodního deficitu akumulují prolin. K nižší akumulaci prolinu došlo u stresované varianty pšenice s exogenní aplikací prolinu (SP), naopak u varianty stresované bez aplikace prolinu došlo k vyšší akumulaci prolinu (S).

2. Působením vodního deficitu dochází k snižování vodního potenciálu v listech. Rostliny vystavené stresu po exogenní aplikaci prolinu dosahovaly vyšších hodnot vodního potenciálu oproti stresovaným rostlinám.

3. Exogenní aplikace prolinu zvýšila rychlost fotosyntetické asimilace CO₂ u stresovaných rostlin během opětovné rehydratace a regenerace následující po působení vodního deficitu. Obdobný trend byl pozorován rovněž u transpirace. Vliv aplikace prolinu na stomatální vodivost gs nebyl prokázán, jelikož se hodnoty gs mezi stresovanými variantami S a SP nijak významně nelišily. V experimentu dosáhla největší hodnoty efektivity využití vody (WUE) varianta S, což bylo způsobeno největším poměrem asimilace CO₂ a transpirace.

4. Na základě stanovení obsahu prolinu v listech a vyhodnocení základních fyziologických parametrů lze konstatovat, že exogenní aplikace prolinu pozitivně ovlivňuje fyziologický stav rostliny během působení vodního stresu a následné regenerace a snižuje tak jeho dopady na rostlinu, což je v souladu se stanovenou hypotézou experimentu.

9 Literatura

- Ábrahám E, Rigó G, Székely G, Nagy R, Koncz C, Szabados L. 2003. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **51**.
- Adams E. 1970. Metabolism of Proline and of Hydroxyproline.
- Akram HM, Ali A, Sattar A, Rehman HSU, Bibi A. 2013. Impact of water deficit stress on various physiological and agronomic traits of three basmati rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *J Anim Plant Sci* **23**:1415–1423. Citeseer.
- Alghabari F, Ihsan MZ, Khaliq A, Hussain S, Daur I, Fahad S, Nasim W. 2016. Gibberellin-sensitive Rht alleles confer tolerance to heat and drought stresses in wheat at booting stage. *Journal of Cereal Science* **70**.
- Ali Q, Ashraf M, Athar H-U-R. 2007. Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions. *Pakistan Journal of Botany* **39**:1133–1144.
- Ali Q, Ashraf M, Shahbaz M, Humera H. 2008. Ameliorating effect of foliar applied proline on nutrient uptake in water stressed maize (*Zea mays* L.) plants. *Pak. J. Bot* **40**:211–219.
- Allen DJ, McKee IF, Farage PK, Baker NR. 1997. Analysis of limitations to CO₂ assimilation on exposure of leaves of two *Brassica napus* cultivars to UV-B. *Plant, Cell and Environment* **20**.
- Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* **100**:224–233. Wiley Online Library.
- Alvarez ME, Lamb C. 1997. Oxidative burst-mediated defense responses in plant disease resistance. *COLD SPRING HARBOR MONOGRAPH SERIES* **34**:815–840. CSH COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS.
- Anjum SA, Tanveer M, Ashraf U, Hussain S, Shahzad B, Khan I, Wang L. 2016. Effect of progressive drought stress on growth, leaf gas exchange, and antioxidant production in two maize cultivars. *Environmental Science and Pollution Research* **23**.
- Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C. 2002. Plant breeding and water relations in C3 cereals: what to breed for. *Annals of Botany* **89**:925–940.
- Arentson BW. 2012. Substrate channeling in proline metabolism. *Frontiers in Bioscience* **17**.
- Arora S, Saradhi PP. 2002. Light Induced Enhancement in Proline Levels Under Stress is Regulated by Non-Photosynthetic Events. *Biologia plantarum* **45**.
- Ashraf M, Foolad MR. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**.
- Ashraf M, Harris PJC. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* **166**.
- Baker NR. 1993. Light-use efficiency and photoinhibition of photosynthesis in plants under environmental stress. *Smith JAC* **8**:221–236.
- Baker NR, Rosenqvist E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of experimental botany* **55**:1607–1621. Oxford University Press.
- Bandurska H, Józwiak W. 2011. A comparison of the effects of drought on proline accumulation and peroxidases activity in leaves of *Festuca rubra* L. and *Lolium perenne* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **79**.

- Barceló J, Poschenrieder Ch. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *Journal of Plant Nutrition* **13**.
- Barnett NM, Naylor AW. 1966. Amino Acid and Protein Metabolism in Bermuda Grass During Water Stress. *Plant Physiology* **41**.
- Bar-Nun N, Poljakoff-Mayber A. 1977. Salinity stress and the content of proline in roots of *Pisum sativum* and *Tamarix tetragyna*. *Annals of Botany* **41**:173–179. Oxford University Press.
- Bartels D. 2001. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends in plant science* **6**:284–286. Elsevier.
- ben Ahmed C, ben Rouina B, Sensoy S, Boukhriss M, ben Abdullah F. 2010. Exogenous Proline Effects on Photosynthetic Performance and Antioxidant Defense System of Young Olive Tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**.
- Benešová M et al. 2012. The Physiology and Proteomics of Drought Tolerance in Maize: Early Stomatal Closure as a Cause of Lower Tolerance to Short-Term Dehydration? *PLoS ONE* **7**.
- Bhat, M.L., Sen, A. and Misra, N.M. 1990. Rainfed Wheat as Affected by Cycocel, Ascorbic Acid, and Gibberlic Acid Seed Treatments. *Rachis.*, 9: 17-20.
- Binzel ML, Hasegawa PM, Rhodes D, Handa S, Handa AK, Bressan RA. 1987. Solute Accumulation in Tobacco Cells Adapted to NaCl. *Plant Physiology* **84**.
- Bohnert HJ, Cushman JC. 2000. The ice plant cometh: lessons in abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**:334–346. Springer.
- Bohnert HJ, Jensen RG. 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* **14**.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptations to environmental stresses. *The plant cell* **7**:1099. American Society of Plant Biologists.
- Bolwell GP. 2002. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* **53**.
- Botha FC, Potgieter GP, Botha A-M. 1992. Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regulation* **11**.
- Bramlage WJ, Leopold AC, Parrish DJ. 1978. Chilling Stress to Soybeans during Imhibition. *PLANT PHYSIOLOGY* **61**.
- Bray EA. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends in plant science* **2**:48–54. Elsevier.
- Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists:1158–1203.
- Bressan RA, Zhang C, Zhang H, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Zhu J-K. 2001. Learning from the Arabidopsis experience. The next gene search paradigm. *Plant physiology* **127**:1354–1360. *Am Soc Plant Biol*.
- Burke EJ, Brown SJ, Christidis N. 2006. Modeling the Recent Evolution of Global Drought and Projections for the Twenty-First Century with the Hadley Centre Climate Model. *Journal of Hydrometeorology* **7**.
- Canavar O, Gotz K-P, Ellmer F, Chmielewski F-M, Kaynak MA. 2014. Determination of the relationship between water use efficiency, carbon isotope discrimination and proline in sunflower genotypes under drought stress. *Australian Journal of Crop Science* **8**:232–242.
- Cecchini NM, Monteoliva MI, Alvarez ME. 2011a. Proline Dehydrogenase Contributes to Pathogen Defense in Arabidopsis. *Plant Physiology* **155**.

- Cecchini NM, Monteoliva MI, Alvarez ME. 2011b. Proline dehydrogenase is a positive regulator of cell death in different kingdoms. *Plant Signaling & Behavior* **6**.
- Cechin I, Corniani N, Fumis T de F, Cataneo AC. 2010. Differential responses between mature and young leaves of sunflower plants to oxidative stress caused by water deficit. *Ciência Rural* **40**:1290–1294. SciELO Brasil.
- Challinor AJ, Wheeler TR, Craufurd PQ, Slingo JM, Grimes DIF. 2004. Design and optimisation of a large-area process-based model for annual crops. *Agricultural and Forest Meteorology* **124**.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany* **103**:551–560. Oxford University Press.
- Chen C, Dickman MB. 2005. From The Cover: Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**.
- Chen CT, Chen L-M, Lin CC, Kao CH. 2001. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Science* **160**.
- Chen SL, Kao CH. 1995. Cd induced changes in proline level and peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **17**:67–71. Springer.
- Costa G, Morel J-L. 1994. Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant physiology and biochemistry (Paris)* **32**:561–570.
- Csonka LN. 1981. Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Molecular and General Genetics MGG* **182**.
- Csonka LN. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological reviews* **53**:121–147. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2651863>.
- Csonka LN, Gelvin SB, Goodner BW, Orser CS, Siemieniak D, Slightom JL. 1988. Nucleotide sequence of a mutation in the *proB* gene of *Escherichia coli* that confers proline overproduction and enhanced tolerance to osmotic stress. *Gene* **64**.
- Csonka LN, Hanson AD. 1991. Prokaryotic Osmoregulation: Genetics and Physiology. *Annual Review of Microbiology* **45**.
- Cuin TA, Shabala S. 2007. Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. *Plant, cell & environment* **30**:875–885. Wiley Online Library.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, van Montagu M, Inzé D, van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **57**:779–795. Springer.
- Davies KJ. 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry* **262**:9895–9901. Elsevier.
- Dawood MG, Taie HAA, Nassar RMA, Abdelhamid MT, Schmidhalter U. 2014. The changes induced in the physiological, biochemical and anatomical characteristics of *Vicia faba* by the exogenous application of proline under seawater stress. *South African Journal of Botany* **93**.
- Day TA, Vogelmann TC. 1995. Alterations in photosynthesis and pigment distributions in pea leaves following UV-B exposure. *Physiologia Plantarum* **94**.
- de Ingeniis J et al. 2012. Functional Specialization in Proline Biosynthesis of Melanoma. *PLoS ONE* **7**.

- Delauney AJ, Verma DPS. 1990. A soybean gene encoding Δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductase was isolated by functional complementation in *Escherichia coli* and is found to be osmoregulated. *Molecular and General Genetics MGG* **221**.
- Delauney AJ, Verma DPS. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* **4**:215–223. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x>.
- Deuschle K, Funck D, Forlani G, Stransky H, Biehl A, Leister D, van der Graaff E, Kunze R, Frommer WB. 2004. The Role of Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase in Proline Degradation[W]. *The Plant Cell* **16**.
- Deuschle K, Funck D, Hellmann H, Däschner K, Binder S, Frommer WB. 2008. A nuclear gene encoding mitochondrial Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The Plant Journal* **27**.
- Doke N. 1997. The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Duan B, Yang Y, Lu Y, Korpelainen H, Berninger F, Li C. 2007. Interactions between water deficit, ABA, and provenances in *Picea asperata*. *Journal of Experimental Botany* **58**.
- Earl HJ, Davis RF. 2003. Effect of Drought Stress on Leaf and Whole Canopy Radiation Use Efficiency and Yield of Maize. *Agronomy Journal* **95**.
- Ehsanpour AA, Fatahian N. 2003. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **73**.
- Engelhard J, Christian BE, Weingarten L, Kuntz G, Spemulli LL, Dick TP. 2011. In situ kinetic trapping reveals a fingerprint of reversible protein thiol oxidation in the mitochondrial matrix. *Free Radical Biology and Medicine* **50**.
- Evans JR, Caemmerer S v, Setchell BA, Hudson GS. 1994. The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Functional Plant Biology* **21**:475–495. CSIRO.
- Fabro G, Kovács I, Pavet V, Szabados L, Alvarez ME. 2004. Proline Accumulation and *AtP5CS2* Gene Activation Are Induced by Plant-Pathogen Incompatible Interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*® **17**.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* **29**.
- Farquhar GD, Ehleringer JR, Hubick KT. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual review of plant biology* **40**:503–537. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Farrant RD, Walker V, Mills GA, Mellor JM, Langley GJ. 2001. Pyridoxal Phosphate De-activation by Pyrroline-5-carboxylic Acid. *Journal of Biological Chemistry* **276**.
- Fath A. 2002. Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *Journal of Experimental Botany* **53**.
- Fedina IS, Georgieva K, Grigorova I. 2002. Light-Dark Changes in Proline Content of Barley Leaves under Salt Stress. *Biologia plantarum* **45**.
- Fedina IS, Grigorova ID, Georgieva KM. 2003. Response of barley seedlings to UV-B radiation as affected by NaCl. *Journal of Plant Physiology* **160**.
- Fedina IS, Tsonev TS, Guleva EI. 1993. The effect of pre-treatment with proline on the responses of *Pisum sativum* to salt stress. *PHOTOSYNTHEtica-PRAHA-* **29**:521. ACADEMIA.

- Fougère F, Le Rudulier D, Streeter JG. 1991. Effects of Salt Stress on Amino Acid, Organic Acid, and Carbohydrate Composition of Roots, Bacteroids, and Cytosol of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology* **96**(4): 1228.
- Foyer CH, Harbinson J, Mullineaux P. 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants:1–42. CRC press Boca Raton, FL.
- Foyer CH, Noctor G. 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell* **17**.
- Freimark D, Sehl C, Weber C, Hudel K, Czermak P, Hofmann N, Spindler R, Glasmacher B. 2011. Systematic parameter optimization of a Me2SO- and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells. *Cryobiology* **63**.
- Fridovich I. 1986. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **58**:61–97. Wiley Online Library.
- Funck D, Eckard S, Müller G. 2010. Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* **10**.
- Funck D, Stadelhofer B, Koch W. 2008. Ornithine- δ -aminotransferase is essential for Arginine Catabolism but not for Proline Biosynthesis. *BMC Plant Biology* **8**.
- Gadallah MAA. 1999. Effects of Proline and Glycinebetaine on *Vicia Faba* Responses to Salt Stress. *Biologia plantarum* **42**.
- Gagneul D, Ainouche A, Duhazé C, Lugan R, Larher FR, Bouchereau A. 2007. A reassessment of the function of the so-called compatible solutes in the halophytic plumbaginaceae *Limonium latifolium*. *Plant physiology*. American Society of Plant Biologists **144**(3): 1598-1611.
- Garcia-Rios M, Fujita T, LaRosa PC, Locy RD, Clithero JM, Bressan RA, Csonka LN. 1997. Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding γ -glutamyl kinase and γ -glutamyl phosphate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**.
- Hamilton EW, Heckathorn SA. 2001. Mitochondrial Adaptations to NaCl. Complex I Is Protected by Anti-Oxidants and Small Heat Shock Proteins, Whereas Complex II Is Protected by Proline and Betaine. *Plant Physiology* **126**.
- Handa S, Bressan RA, Handa AK, Carpita NC, Hasegawa PM. 1983. Solutes Contributing to Osmotic Adjustment in Cultured Plant Cells Adapted to Water Stress. *Plant Physiology* **73**.
- Handa S, Handa AK, Hasegawa PM, Bressan RA. 1986. Proline Accumulation and the Adaptation of Cultured Plant Cells to Water Stress. *Plant Physiology* **80**.
- Hare PD, Cress WA. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment* **21**.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. 1999. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany* **50**:413–434. Available from <https://doi.org/10.1093/jxb/50.333.413>.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. 2001. The effects of exogenous proline and proline analogues on in vitro shoot organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation* **34**.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. 2003. A regulatory role for proline metabolism in stimulating *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Plant Growth Regulation* **39**.

- Harris D, Tripathi RS, Joshi A. 2002. On-farm seed priming to improve crop establishment and yield in dry direct-seeded rice. *Direct seeding: Research Strategies and Opportunities*, International Research Institute, Manila, Philippines:231–240.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology* **51**:463–499. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A. 2012. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior* **7**.
- Heerden Van PDR, Kruger HJG. 2002. Separately and simultaneously induced dark chilling and drought stress effects on photosynthesis, proline accumulation and antioxidant metabolism in soybean. *Journal of Plant Physiology* **159**(10): 1077-1086.
- Hejnák, V. 2003. Využití izotopové metody (15N) spalné kalorimetrie a gazometrie v produkční fyziologii ječmene jarního a špenátu setého. Power Print, ČZU AF. Praha. 152 pp. ISBN: 8021311142.
- Heuer, B. 1995. Osmoregulatory Role of Proline in Water and Salt-Stressed Plants. In: Pessarakli, M. (editors), and *Handbook of Plant and Crop Physiology*, Marcel Dekker, Inc. New York. USA.
- Heuer B. 2003. Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. *Plant Science* **165**.
- Holmström K, Somersalo S, Mandal A, Palva TE, Welin B. 2000. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *Journal of Experimental Botany* **51**.
- Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, Verma DPS. 2000. Removal of Feedback Inhibition of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Results in Increased Proline Accumulation and Protection of Plants from Osmotic Stress. *Plant Physiology* **122**.
- Hoque MA, Banu MNA, Okuma E, Amako K, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y. 2007. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate–glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. *Journal of plant physiology* **164**:1457–1468. Elsevier.
- Hu CA, Delauney AJ, Verma DP. 1992. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**.
- Hu Y, Schmidhalter U. 1998. Spatial distributions and net deposition rates of mineral elements in the elongating wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf under saline soil conditions. *Planta* **204**.
- Imlay JA, Linn S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* **240**:1302–1309. American Association for the Advancement of Science.
- Ingram J, Bartels D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology* **47**:377–403. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Islam MM, Hoque MdA, Okuma E, Banu MstNA, Shimoishi Y, Nakamura Y, Murata Y. 2009. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology* **166**.

- Itai C, Paleg LG. 1982. Responses of water-stressed *Hordeum distichum* L. and *Cucumis sativus* to proline and betaine. *Plant Science Letters* **25**.
- Jacobson MD. 1996. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends in biochemical sciences* **21**:83–86. Elsevier.
- Jain M, Mathur G, Koul S, Sarin N. 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Reports* **20**.
- Janas KM, Cvikrová M, Pałagiewicz A, Eder J. 2000. Alterations in phenylpropanoid content in soybean roots during low temperature acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**.
- Jauniaux JC, Urrestarazu LA, Wiame JM. 1978. Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes. *Journal of Bacteriology* **133**.
- Kahlaoui B, Hachicha M, Misle E, Fidalgo F, Teixeira J. 2018. Physiological and biochemical responses to the exogenous application of proline of tomato plants irrigated with saline water. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* **17**.
- Kamran M, Shahbaz M, Ashraf M, Akram NA. 2009. Alleviation of drought-induced adverse effects in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) using proline as a pre-sowing seed treatment. *Pak. J. Bot* **41**:621–632.
- Kaplan F, Kopka J, Sung DY, Zhao W, Popp M, Porat R, Guy CL. 2007. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant Journal* **50**.
- Kaul S, Sharma SS, Mehta IK. 2008. Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. *Amino Acids* **34**.
- Kaur V, Behl RK, Shinano T, Osaki M. 2008. Interacting effects of high temperature and drought stresses in wheat genotypes under semiarid tropics- an appraisal. *Tropics* **17**.
- Kavi Kishor PB. 2015. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. *Frontiers in Plant Science* **6**.
- Kavi Kishor PB, Sreenivasulu N. 2014. Is proline accumulation *per se* correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant, Cell & Environment* **37**.
- Kawakami R, Satomura T, Sakuraba H, Ohshima T. 2012. L-Proline dehydrogenases in hyperthermophilic archaea: distribution, function, structure, and application. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**.
- Kempf B, Bremer E. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Archives of Microbiology* **170**.
- Kesari R, Lasky JR, Villamor JG, des Marais DL, Chen Y-JC, Liu T-W, Lin W, Juenger TE, Verslues PE. 2012. Intron-mediated alternative splicing of *Arabidopsis* P5CS1 and its association with natural variation in proline and climate adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**.
- Khedr AHA. 2003. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* **54**.
- Kiyosue T, Yoshihara Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **8**.
- Klimešová J, Holková L, Středa T. 2017. The expression of dehydrin genes and the intensity of transpiration in drought-stressed maize plants. *Cereal Research Communications* **45**.

- Kobayashi T, Nishii M, Takagi Y, Titani K, Matsuzawa T. 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of mRNA for human kidney ornithine aminotransferase. *FEBS Letters* **255**.
- Kohl DH, Kennelly EJ, Zhu Y, Schubert KR, Shearer G. 1991. Proline Accumulation, Nitrogenase (C₂H₂ reducing) Activity and Activities of Enzymes related to Proline Metabolism in Drought-Stressed Soybean Nodules. *Journal of Experimental Botany* **42**.
- Kostal V, Simek P, Zahradnickova H, Cimlova J, Stetina T. 2012. Conversion of the chill susceptible fruit fly larva (*Drosophila melanogaster*) to a freeze tolerant organism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**.
- Koštal V, Zahradníčková H, Šimek P. 2011. Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**.
- Krall JP, Edwards GE, Andreo CS. 1989. Protection of Pyruvate, Pi Dikinase from Maize against Cold Lability by Compatible Solutes. *Plant Physiology* **89**.
- Krizmanić M, Liović I, Mijić A, Bilandžić M, Krizmanić G. 2003. Genetic potential of OS sunflower hybrids in different agroecological conditions. *Sjemenarstvo* **20**:237–245. Hrvatsko agronomsko društvo.
- Larcher W. 1981. Effects of low temperature stress and frost injury on plant productivity. *Physiological processes limiting plant productivity*:253–269. Butterworths London.
- Larcher W. 2001. *Ökophysiologie der Pflanzen*. Eugen Ulmer-Verlag, Stuttgart 506 pp.
- Leopold AC. 1980. Temperature Effects on Soybean Imbibition and Leakage. *Plant Physiology* **65**.
- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses: water, radiation, salt and other stresses. Academic Press, New York 350pp.
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E. and Navari-Izzo, F. 1999. Antioxidative Defense System, Pigment Composition, and Photosynthetic Efficiency in Two Wheat Cultivars Subjected to Drought. *Plant Physiol.*, 119:1091-1100.
- Mani S, van de Cotte B, van Montagu M, Verbruggen N. 2002. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **128**:73–83. American Society of Plant Physiologists. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11788754>.
- Manivannan P, Abdul Jaleel C, Kishorekumar A, Sankar B, Somasundaram R, Sridharan R, Panneerselvam R. 2007. Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. by propiconazole under water deficit stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **57**.
- Mano J. 2002. Early events in environmental stresses in plants-Induction mechanisms of oxidative stress. *Oxidative stress in plants*:217–245. Taylor & Francis.
- Mansour MMF. 1998. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**.
- Marco-Marín C, Gil-Ortiz F, Pérez-Arellano I, Cervera J, Fita I, Rubio V. 2007. A Novel Two-domain Architecture Within the Amino Acid Kinase Enzyme Family Revealed by the Crystal Structure of *Escherichia coli* Glutamate 5-kinase. *Journal of Molecular Biology* **367**.
- Mattioli R, Falasca G, Sabatini S, Altamura MM, Costantino P, Trovato M. 2009. The proline biosynthetic genes *P5CS1* and *P5CS2* play overlapping roles in *Arabidopsis* flower transition but not in embryo development. *Physiologia Plantarum* **137**.

- Matysik J, Alia, Bhalu B, Mohanty P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science* **82**:525–532. Temporary Publisher. Available from <http://www.jstor.org/stable/24105959>.
- McNeil SD, Nuccio ML, Hanson AD. 1999. Betaines and Related Osmoprotectants. Targets for Metabolic Engineering of Stress Resistance. *Plant Physiology* **120**.
- Meng Z, Lou Z, Liu Z, Li M, Zhao X, Bartlam M, Rao Z. 2006. Crystal Structure of Human Pyrroline-5-carboxylate Reductase. *Journal of Molecular Biology* **359**.
- Miller G, Honig A, Stein H, Suzuki N, Mittler R, Zilberstein A. 2009. Unraveling Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate-Proline Cycle in Plants by Uncoupled Expression of Proline Oxidation Enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **284**.
- Mittler R. 2002a. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science* **7**:405–410. Elsevier.
- Mittler R. 2002b. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**.
- Morgan JM. 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual review of plant physiology* **35**:299–319.
- Morita Y, Nakamori S, Takagi H. 2002. Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**.
- Moxley MA, Tanner JJ, Becker DF. 2011. Steady-state kinetic mechanism of the proline:ubiquinone oxidoreductase activity of proline utilization A (PutA) from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **516**.
- Mulroy WT, Rundel P. 1977. *Annual Plants: Adaptations to Desert Environments: Adaptations to Desert Environments* s 27.
- Nainawatee HS, Chowdury JB, Jain RK, Madan S. 1995. Proline and Proline Metabolising Enzymes in in-vitro Selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under Salt Stress. *Annals of Botany* **76**(1): 51-57.
- Nanjo T, Fujita M, Seki M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K. 2003. Toxicity of Free Proline Revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-Tagged Mutant Deficient in Proline Dehydrogenase. *Plant and Cell Physiology* **44**.
- Nilsen ET, Orcutt DM. 1996. *The physiology of plants under stress*. Wiley 2.
- Niyogi KK. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual review of plant biology* **50**:333–359. *Annual Reviews* 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology* **49**:249–279. *Annual Reviews* 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA.
- Nomura M, Takagi H. 2004. Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: Regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**.
- Okuma E, Murakami Y, Shimoishi Y, Tada M, Murata Y. 2004. Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* **50**:1301–1305. Taylor & Francis.
- Okuma E, Soeda K, Tada M, Murata Y. 2000. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* **46**.

- Page R et al. 2003. Crystal structure of γ -glutamyl phosphate reductase (TM0293) from *Thermotoga maritima* at 2.0 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **54**.
- Paleg LG, Douglas TJ, van Daal A, Keech DB. 1981. Proline and betaine protect enzymes against heat inactivation. *Aust. J. Plant Physiol* **8**:107–114.
- Paleg LG, Stewart GR, Bradbeer JW. 1984. Proline and Glycine Betaine Influence Protein Solvation. *Plant Physiology* **75**.
- Papageorgiou GC, Murata N. 1995. The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosynthesis Research* **44**(3): 243-252.
- Parkin KL, Kuo S-J. 1989. Chilling-Induced Lipid Degradation in Cucumber (*Cucumis sativa* L. cv Hybrid C) Fruit. *Plant Physiology* **90**.
- Parre E, Ghars MA, Leprince A-S, Thiery L, Lefebvre D, Bordenave M, Richard L, Mazars C, Abdelly C, Savouré A. 2007. Calcium Signaling via Phospholipase C Is Essential for Proline Accumulation upon Ionic But Not Nonionic Hyperosmotic Stresses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **144**.
- Pedersen AL, Feldner HC, Rosendahl L. 1996. Effect of proline on nitrogenase activity in symbiosomes from root nodules of soybean (*Glycine max* L.) subjected to drought stress. *Journal of Experimental Botany* **47**.
- Pejic B, Maksimovic L, Skoric D, Milic S, Stricevic R, Cupina B. 2009. Effect of water stress on yield and evapotranspiration of sunflower. *Helia* **32**.
- Pemberton TA, Still BR, Christensen EM, Singh H, Srivastava D, Tanner JJ. 2012. Proline: Mother Nature's cryoprotectant applied to protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **68**.
- Pérez-Arellano I, Carmona-Álvarez F, Gallego J, Cervera J. 2010a. Molecular Mechanisms Modulating Glutamate Kinase Activity. Identification of the Proline Feedback Inhibitor Binding Site. *Journal of Molecular Biology* **404**.
- Pérez-Arellano I, Carmona-Álvarez F, Martínez AI, Rodríguez-Díaz J, Cervera J. 2010b. Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: From osmotolerance to rare metabolic disease. *Protein Science* **19**.
- Phang JM. 1985. The Regulatory Functions of Proline and Pyrroline-5-carboxylic Acid.
- Phang JM, Donald SP, Pandhare J, Liu Y. 2008. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. *Amino Acids* **35**.
- Phang JM, Liu W, Hancock C, Christian KJ. 2012. The Proline Regulatory Axis and Cancer. *Frontiers in Oncology* **2**.
- Phang JM, Liu W, Zabinnyk O. 2010. Proline Metabolism and Microenvironmental Stress. *Annual Review of Nutrition* **30**.
- Poschenrieder CH, Barceló J. 1999. Water relations in heavy metal stressed plants. Pages 207–229 *Heavy metal stress in plants*. Springer.
- Posmyk MM, Janas KM. 2007. Effects of seed hydropriming in presence of exogenous proline on chilling injury limitation in *Vigna radiata* L. seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* **29**.
- Praba ML, Cairns JE, Babu RC, Lafitte HR. 2009. Identification of Physiological Traits Underlying Cultivar Differences in Drought Tolerance in Rice and Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* **195**.

- Premachandra GS, Saneoka H, Fujita K, Ogata S. 1992. Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. *Journal of experimental botany* **43**:1569–1576. Oxford University Press.
- Pritchard SG, Ju Z, van Santen E, Qiu J, Weaver DB, Prior SA, Rogers HH. 2000. The influence of elevated CO₂ on the activities of antioxidative enzymes in two soybean genotypes. *Functional Plant Biology* **27**:1061–1068. CSIRO.
- Qayyum A, Razzaq A, Ahmad M, Jenks MA. 2011. Water stress causes differential effects on germination indices, total soluble sugar and proline content in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *African Journal of Biotechnology* **10**.
- Rajagopal V. 1981. The influence of exogenous proline on the stomatal resistance in *Vicia faba*. *Physiologia Plantarum* **52**.
- Rajagopal V, Sinha SK. 1980. INFLUENCE OF EXOGENOUSLY SUPPLIED PROLINE ON THE RELATIVE WATER-CONTENT IN WHEAT AND BARLEY. COUNCIL SCIENTIFIC INDUSTRIAL RESEARCH PUBL & INFO DIRECTORATE, NEW DELHI
- Rajendiran K, Ramanujam MP. 2003. Alleviation of Ultraviolet-B Radiation-Induced Growth Inhibition of Green Gram by Triadimefon. *Biologia plantarum* **46**.
- Rajendrakumar CSV, Suryanarayana T, Reddy AR. 1997. DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Letters* **410**.
- Ramanjulu S, Bartels D. 2002. Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, cell & environment* **25**:141–151. Wiley Online Library.
- Rascio, A., Platani, C., Scalfati, G., Tonti, A. and Di Fonzo, N. 1994. The Accumulation of Solutes and Water Binding Strength in Durum Wheat. *Physiol. Plant*, 90: 715-721.
- Raymond MJ. 2002. Proline Metabolism and Transport in Maize Seedlings at Low Water Potential. *Annals of Botany* **89**.
- Rentsch D, Hirner B, Schmelzer E, Frommer WB. 1996. Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *The Plant cell* 8(8): 1437-1446.
- Rhodes D, Handa S, Bressan RA. 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiology* **82**:890–903. Am Soc Plant Biol.
- Rhodes D, Hanson AD. 1993. Quaternary Ammonium and Tertiary Sulfonium Compounds in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**.
- Ribarits A, Abdullaev A, Tashpulatov A, Richter A, Heberle-Bors E, Touraev A. 2007. Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. *Planta* **225**.
- Rodriguez MM, Heyser JW. 1988. Growth inhibition by exogenous proline and its metabolism in saltgrass (*Distichlis spicata*) suspension cultures. *Plant Cell Reports* **7**.
- Roy D, Basu N, Bhunia A, Banerjee SK. 1993. Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt-sensitive cultivar of rice. *Biologia plantarum* **35**.
- Santoro MM, Liu Y, Saber M, Khan A, Hou LX, Bolen DW. 1992. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry. American Chemical Society* 31(23): 5278-5283.

- Saradhi PP, Alia Arora S, Prasad KVSK. 1995a. Proline Accumulates in Plants Exposed to uv Radiation and Protects Them against uv-Induced Peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **209**.
- Saradhi PP, AliaArora S, Prasad KVSK. 1995b. Proline Accumulates in Plants Exposed to uv Radiation and Protects Them against uv-Induced Peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **209**.
- Saud S, Yajun C, Fahad S, Hussain S, Na L, Xin L, Alhussien SAAFE. 2016. Silicate application increases the photosynthesis and its associated metabolic activities in Kentucky bluegrass under drought stress and post-drought recovery. *Environmental Science and Pollution Research* **23**.
- Savouré A, Hua X-J, Bertauche N, Montagu M van, Verbruggen N. 1997. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and General Genetics MGG* **254**.
- Savouré A, Jaoua S, Hua X-J, Ardiles W, van Montagu M, Verbruggen N. 1995. Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **372**.
- Sayed OH. 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* **41**:321–330. Springer.
- Schobert B. 1977. Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? *Journal of Theoretical Biology* **68**.
- Schutzendubel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany* **53**:1351–1365. Oxford University Press.
- Schwacke R, Grallath S, Breitzkreuz KE, Stransky E, Stransky H, Frommer WB, Rentsch D. 1999. LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *The Plant cell* **11**(3): 377-392.
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **10**(3): 296-302.
- Selye H. 1973. Evolution of stress concept. *American scientist* **6**: 692-699.
- Serraj R, Sinclair TR. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant, Cell & Environment* **25**.
- Shabala S. 2006. Non-invasive microelectrode ion flux measurements in plant stress physiology. Pages 35–71 *Plant Electrophysiology*. Springer.
- Shahbaz M, Ashraf M, Akram NA, Hanif A, Hameed S, Joham S, Rehman R. 2011. Salt-induced modulation in growth, photosynthetic capacity, proline content and ion accumulation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* **33**:1113–1122. Springer.
- Sharma P, Shanker Dubey R. 2005. Modulation of nitrate reductase activity in rice seedlings under aluminium toxicity and water stress: role of osmolytes as enzyme protectant. *Journal of Plant Physiology* **162**.
- Sharma S, Villamor JG, Verslues PE. 2011. Essential Role of Tissue-Specific Proline Synthesis and Catabolism in Growth and Redox Balance at Low Water Potential. *Plant Physiology* **157**.
- Shetty K. 2004. Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: a review. *Process Biochemistry* **39**.

- Shetty P, Atallah MT, Shetty K. 2001. ENHANCEMENT OF TOTAL PHENOLIC, L-DOPA AND PROLINE CONTENTS IN GERMINATING FAVA BEAN (*VICIA FABA*) IN RESPONSE TO BACTERIAL ELICITORS. *Food Biotechnology* **15**.
- Shevyakova NI, Bakulina EA, Kuznetsov VI v. 2009. Proline antioxidant role in the common ice plant subjected to salinity and paraquat treatment inducing oxidative stress. *Russian Journal of Plant Physiology* **56**.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (n.d.). Gene expression and signal transduction in water-stress response *Plant Physiol* 1997 115. N.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current opinion in plant biology* **6**:410–417. Elsevier.
- Simmaco M, John RA, Barra D, Bossa F. 1986. The primary structure of ornithine aminotransferase. *FEBS Letters* **199**.
- Singh PK, Tewari RK. 2003. Cadmium toxicity induced changes in plant water relations and oxidative metabolism of *Brassica juncea* L. plants. *Journal of Environmental Biology* **24**:107–112. PRAGATI PRESS-INDIA.
- Singh RK. 2012. Unique structural features and sequence motifs of proline utilization A (PutA). *Frontiers in Bioscience* **17**.
- Smirnoff N, Cumbes QJ. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**.
- Smith LT. 1985. Characterization of a gamma-glutamyl kinase from *Escherichia coli* that confers proline overproduction and osmotic tolerance. *Journal of Bacteriology* **164**.
- Sourour A. 2017. A review: Morphological, physiological, biochemical and molecular plant responses to water deficit stress. *The International Journal of Engineering and Science* **06**.
- Srivastava D, Singh RK, Moxley MA, Henzl MT, Becker DF, Tanner JJ. 2012. The Three-Dimensional Structural Basis of Type II Hyperprolinemia. *Journal of Molecular Biology* **420**.
- Stewart, C.R. 1980. The Mechanism of Abscisic Acid Induced Proline Accumulation in Barley
- Strizhov N, Ábrahám E, Ökrész L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L. 1997. Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **12**:557–569. John Wiley & Sons, Ltd. Available from <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.00537.x>.
- Swaaij AC, Jacobsen E, Feenstra WJ. 1985. Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of *Solanum*. *Physiologia Plantarum* **64**.
- Szabados L, Savouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**.
- Székely G et al. 2008. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal* **53**.
- Šantrůček, J., 2010 Současné možnosti fyziologie a zemědělského výzkumu přispět k produkci rostlin. Powerprint s.r.o., Praha 6 - suchdol ISBN978-80-7427-023-9
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1991. *Stress Physiology: Water and Drought Resistance*. In L. Taiz and E. Zeiger (eds), *Plant Physiology*, (1st edition), Benjamin- Cummings, Reading, Mass. New York. USA
- Takagi H. 2008. Proline as a stress protectant in yeast: physiological functions, metabolic regulations, and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**.

- Tanner JJ. 2008. Structural biology of proline catabolism. *Amino Acids* **35**.
- Tevini M, Braun J, Fieser G. 1991. THE PROTECTIVE FUNCTION OF THE EPIDERMAL LAYER OF RYE SEEDLINGS AGAINST ULTRAVIOLET-B RADIATION. *Photochemistry and Photobiology* **53**.
- Ueda A, Yamamoto-Yamane Y, Takabe T. 2007. Salt stress enhances proline utilization in the apical region of barley roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **355**.
- Verbruggen N, Hermans C. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* **35**.
- Verbruggen N, Villarroel R, van Montagu M. 1993. Osmoregulation of a Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **103**.
- Verslues PE, Kim Y-S, Zhu J-K. 2007. Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis* glutamate:glyoxylate aminotransferase mutant. *Plant Molecular Biology* **64**.
- Volkov V, Wang B, Dominy PJ, Fricke W, Amtmann A. 2004. *Thellungiella halophila*, a salt-tolerant relative of *Arabidopsis thaliana*, possesses effective mechanisms to discriminate between potassium and sodium. *Plant, Cell & Environment* **27**:1–14. Wiley Online Library.
- Wanduragala S, Sanyal N, Liang X, Becker DF. 2010. Purification and characterization of Put1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **498**.
- Webster BD, Leopold AC. 1977. The Ultrastructure of Dry and Imbibed Cotyledons of Soybean. *American Journal of Botany* **64**.
- Weltmeier F, Ehlert A, Mayer CS, Dietrich K, Wang X, Schütze K, Alonso R, Harter K, Vicente-Carbajosa J, Dröge-Laser W. 2006. Combinatorial control of *Arabidopsis* proline dehydrogenase transcription by specific heterodimerisation of bZIP transcription factors. *The EMBO Journal* **25**.
- White TA, Krishnan N, Becker DF, Tanner JJ. 2007. Structure and Kinetics of Monofunctional Proline Dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* **282**.
- Williamson CL, Slocum RD. 1992. Molecular Cloning and Evidence for Osmoregulation of the Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Reductase (*pro C*) Gene in Pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology* **100**.
- Wingler A, Brownhill E, Pourtau N. 2005. Mechanisms of the light-dependent induction of cell death in tobacco plants with delayed senescence. *Journal of Experimental Botany* **56**:2897–2905. Oxford University Press.
- Withers LA, King PJ. 1979. Proline: A Novel Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Cultured Cells of *Zea mays* L. *Plant Physiology* **64**.
- Wood AJ. 2005. Eco-physiological Adaptations to Limited Water Environments. In *Plant Abiotic Stress* (eds M. A. Jenks and P. M. Hasegawa). Blackwell Publishing Ltd, Oxford 1.: 1-13
- Wu G, Bazer FW, Datta S, Johnson GA, Li P, Satterfield MC, Spencer TE. 2008. Proline metabolism in the conceptus: implications for fetal growth and development. *Amino Acids* **35**.
- Yancey P, Clark M, Hand S, Bowlus R, Somero G. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**.
- Yancey PH. 1994. Compatible and counteracting solutes. Cellular and molecular physiology of cell volume regulation:81–109. CRC press Boca Raton, FL.
- Yang S-L, Lan S-S, Gong M. 2009. Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology* **166**.

- Yang Y, Zhang Y, Wei X, You J, Wang W, Lu J, Shi R. 2011. Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**.
- Yoo JH et al. 2005. Direct Interaction of a Divergent CaM Isoform and the Transcription Factor, MYB2, Enhances Salt Tolerance in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **280**.
- Yoon K-A, Nakamura Y, Arakawa H. 2004. Identification of ALDH4 as a p53-inducible gene and its protective role in cellular stresses. *Journal of Human Genetics* **49**.
- Yoshihara Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, Shinozaki K. 1995. Correlation between the induction of a gene for Delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in Arabidopsis thaliana under osmotic stress. *The Plant Journal* **7**.
- Yoshihara Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1997. Regulation of Levels of Proline as an Osmolyte in Plants under Water Stress. *Plant and Cell Physiology* **38**.
- Yu Ch, Claybrook DL, Huang AHC. 1983. Transport of glycine, serine, and proline into spinach leaf mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **227**(1): 180-187.
- Zelený M. 2019. Vliv exogenní aplikace prolinu a glycin betulinu na obsah prolinu u Triticum durum v podmínkách vodního stresu [bakalářská práce]. Česká zemědělská univerzita, Praha.
- Zhang C, Lu Q, Verma DPS. 1995a. Removal of Feedback Inhibition of Δ 1-Pyrroline-5-carboxylate Synthetase, a Bifunctional Enzyme Catalyzing the First Two Steps of Proline Biosynthesis in Plants. *Journal of Biological Chemistry* **270**.
- Zhang M, Wang L, Zhang K, Liu F, Wan Y. 2017. Drought-induced responses of organic osmolytes and proline metabolism during pre-flowering stage in leaves of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Integrative Agriculture* **16**.
- Zhu J, Gong Z, Zhang C, Song C-P, Damsz B, Inan G, Koiwa H, Zhu J-K, Hasegawa PM, Bressan RA. 2002. OSM1/SYP61: a syntaxin protein in Arabidopsis controls abscisic acid-mediated and non-abscisic acid-mediated responses to abiotic stress. *The Plant Cell* **14**:3009–3028. *Am Soc Plant Biol*.
- Zhu J-K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in plant science* **6**:66–71. Elsevier.

