

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra botaniky a fyziologie rostlin



Vliv exogenní aplikace prolinu a glycin betulinu na obsah prolinu u *Triticum durum* v podmínkách vodního stresu

Bakalářská práce

Autor práce: Martin Zelený

Obor studia: Ekologické zemědělství ABE

Vedoucí práce: Ing. Helena Hniličková, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vliv exogenní aplikace prolinu a glycin betulinu na obsah prolinu u *Triticum durum* v podmínkách vodního stresu " jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18.4.2019

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval všem, kteří mě při psaní této práce podporovali. Mé upřímné poděkování patří zejména Ing. Heleně Hnilíčkové, Ph.D. za vedení mé bakalářské 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 a glycin betulinu na obsah prolinu u *Triticum durum* v podmínkách vodního stresu

Souhrn

Tato bakalářská práce se zaměřuje na vliv exogenní aplikace dvou kompatibilních solutů na obsah prolinu u „*Triticum durum*“ v podmínkách vodního stresu. V práci byl kladen důraz na vodní stres, stresové reakce a adaptace rostlin na vodní stres. Dále byly popsány kompatibilní soluty – prolin a glycin betulin. V rámci pokusu byl sledován vliv vodního deficitu a souběžný vliv exogenní aplikace prolinu a glycin betulinu u rostlin pšenice tvrdé „*Triticum durum*“, odrůda Haristide. na obsah volného prolinu v rostlinných pletivech, za předpokladu možnosti využití těchto látek jako protistresových. Během experimentu byly rostliny pšenice tvrdé „*Triticum durum*“ 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 (K), zavlažovaná varianta s aplikací prolinu (KP), zavlažovaná varianta s aplikací glycinu (KG), zavlažovaná varianta s aplikací obou látek souběžně (KPG). Varianta vystavena stresu suchem (V), stresovaná varianta s aplikací prolinu (VP), stresovaná varianta s aplikací glycinu (VG) a stresovaná varianta s aplikací glycinu i prolinu souběžně (VPG). V průběhu pokusu byly stresované varianty v některých termínech zavlažovány, a to proto, aby pro zkoumané rostliny nebylo příliš vysoké sucho letální. Cílem bylo rostliny dopěstovat do fáze metání.

Nejvyšších hodnot obsahu volného prolinu v nadzemní biomase dosáhla varianta VG – vodní stres s foliární aplikací betulin glycinu, nižšího obsahu prolinu dosáhla varianta VPG – vodní stres s foliární aplikací kombinace prolinu a glycin betulin, a nejnižších hodnot dosáhly varianty VP – vodní stres s foliární aplikací prolinu a V – samotný vodní stres. Tyto dvě varianty dosahovaly similárních hodnot. Obsahy volného prolinu v kořenech dosahují stejných efektů, jako hodnoty volného prolinu v nadzemní biomase pokusných rostlin.

Jediná výjimka tvoří obsah volného prolinu u kontrolních rostlin ve variantě KP – zavlažovaná varianta s aplikací prolinu, u které došlo k transportu volného prolinu z nadzemní biomasy do kořenů.

Klíčová slova: vodní stres, prolin, glycin betulin, pšenice tvrdá

Effect of exogenous application of proline and glycine betulin on proline content of *Triticum durum* in water stress conditions

Summary

This bachelor thesis focuses on the effect of exogenous application of two compatible solutes on proline content in "Triticum durum" under water stress conditions. The emphasis was put on water stress, stress responses and adaptation of plants to water stress. Furthermore, compatible solutes - proline and glycine betain have been described. The effect of water deficiency and the simultaneous effect of exogenous application of proline and glycine betain in durum wheat plants "Triticum durum", Haristide variety, was observed. on the content of free proline in plant tissues, providing that they can be used as anti-stress agents. During the experiment, "Triticum durum" plants were grown under thermally controlled conditions and partially controlled light conditions in an experimental greenhouse of Department of Botany and Plant Physiology, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, University of Life Sciences in Prague. Different plant variants were observed for foliar application of compatible solutes, divided to stressed and irrigated. Irrigated variety without application (K), irrigated variety with proline application (KP), irrigated variety with glycine application (KG), irrigated variety with application of both (KPG). Stressed only variety (V), stressed variety with proline application (VP), stressed variety with glycine application (VG), stressed with application of both (VPG). In the course of the experiment, stressed variants were irrigated in a few terms to prevent lethal drought for the plants studied. The aim was to grow the plants into BBCH 49 – 51 phase.

The highest content of free proline in aboveground biomass was achieved by the VG variety, a lower proline content was achieved by the VPG variety, and the VP and V varieties reached the lowest values. These two varieties achieved simillar values. Free proline contents in roots achieve the same effects as free proline values in the above-ground biomass of experimental plants.

The only exception is the content of free proline in control plants in the KP variety, in which free proline was transported from above-ground biomass to roots.

Keywords: water stress, proline, glycine betaine, triticum durum

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	10
3 Literární rešerše	11
3.1 Stres u rostlin (definice, charakteristika a dělení)	11
3.2 Stresová reakce u rostlin	11
3.3 Adaptační reakce na vodní stres	12
3.4 Vodní stres	13
3.5 Kompatibilní soluty (Prolin, Glycin betain)	13
3.6 Prolin	15
3.7 Prolinová biosyntéza, signalizace a transport	16
3.8 Vliv exogenního prolínu na růst rostlin za měnícího se prostředí	20
3.9 Glycin betain (betulin glycin)	21
3.10 Biosyntéza Glycin betainu	22
3.11 Metodika	24
3.12 Založení a průběh pokusu	24
Časový harmonogram jednotlivých odběrů a aplikací	25
3.13 Stanovení obsahu volného prolínu	26
4 Výsledky	28
4.1 Obsah prolínu v nadzemní biomase pokusných rostlin	28
4.2 Obsah prolínu v nadzemní biomase kontrolních rostlin	29
4.3 Obsah prolínu v kořenech pokusných rostlin	30
4.4 Obsah prolínu v kořenech kontrolních rostlin	31
5 Diskuze	32
5.1 Obsah prolínu v rostlinách <i>Triticum durum</i>	32
6 Závěr	34
6.1 Závěr obsahu prolínu v nadzemní biomase pokusných rostlin	34
6.2 Závěr obsahu prolínu v kořenech pokusných rostlin	34
7 Seznam použité literatury	35

1 Úvod

Důsledkem současných změn klimatu vzniklo velmi diskutované téma dnešní doby – nedostatek vody. Dá se předpokládat, že tento nedostatek bude mít čím dál významnější vliv i v oblastech, ve kterých tento problém doposud nebyl zaznamenán. Na našem území se tento nedostatek již také začíná projevovat, a to hlavně v oblasti jižní Moravy. Díky narůstající lidské populaci, která se za poslední dvě století znásobila až téměř sedmkrát, se poptávka po potravinách a zemědělské produkci razantně zvýšila. Tento problém se bude muset dříve či později řešit.

Zemědělská produkce na celém světě podléhá rostoucím environmentálním omezením, zejména suchu a zasolení, vzhledem k jejich velkému rozsahu dopadu a širokému rozšíření. Tradiční šlechtitelské programy se snaží zvýšit toleranci abiotického stresu. Mají určitý úspěch, avšak jsou omezeny multigenovou povahou rysů. Tolerantní rostliny jako *Craterostigma plantagenium*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Thellungiella halophila* a další vytrvalé rostliny, by mohly být cenným nástrojem pro nalezení extrémní přírodní tolerance. V posledním desetiletí byla *Arabidopsis thaliana*, genetická modelová rostlina, široce využívána k rozluštění molekulární podstaty stresové tolerance. *Arabidopsis* se také ukázal být mimořádně důležitý pro hodnocení funkcí jednotlivých genů, spojených se stresem v důsledku dostupnosti knock-out mutantů a jejich přístupnosti pro genetickou transformaci (Bartels & Sunkar 2005).

Během celého životního cyklu jsou rostliny vystaveny různým typům environmentálních stresů, mezi které patří salinita, vodní deficit, teplotní extrém, toxická koncentrace kovových iontů a UV záření. Tyto faktory životního 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 (RFK), např. OH, O₂, H₂O₂ atd. Tyto formy způsobují značné škody peroxidací membránových lipidových složek a také přímou interakcí s různými makromolekulami. Buňky si přizpůsobily různé mechanismy, aby udržely hladinu RFK pod kontrolou. Nicméně nízká koncentrace RFK se podílí i na mechanismu přenosu signálu (Foyer & Noctor 2005). Tyto RFK jsou zachycovány nízkomolekulárními antioxidantními metabolity, např. glutathionem, kyselinou askorbovou, a-tokoferolem a antioxidantními enzymy, např. katalázou, askorbát peroxidázou a superoxid dismutasou. Při různých stresových podmínkách však tvorba generace volných radikálů převyšuje celkový buněčný antioxidantní potenciál vedoucí k oxidačnímu stresu, který přispívá k nepříznivým účinkům na růst rostlin.

Při odezvě na různé stresy rostliny akumulují velká množství různých typů kompatibilních solutů (Serraj & Sinclair 2002). Kompatibilní soluty jsou vysoce rozpustné organické sloučeniny s nízkou molekulární hmotností, které jsou obvykle netoxické ve vysokých buněčných koncentracích. Tyto soluty poskytují rostlinám ochranu před stresem tím, že přispívají k buněčné osmotické úpravě, detoxifikaci RFK, ochraně membránové integrity a stabilizaci enzymů/proteinů (Ashraf & Foolad 2005). Ty zahrnují prolin, sacharózu, polyoly, trehalosu a kvartérní amoniové sloučeniny (KAS), jako je glycin betain, alinin betain, prolin betain a pipekolát betain (Ashraf & Harris 2004; Rhodes & Hanson 1993).

2 Cíl 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. Dále je zdrojem uhlíku, dusíku a redukujících ekvivalentů po odeznění stresu. Cílem práce je sledovat vliv foliární aplikace prolinu a glycin betulinu na obsah prolinu v listech a kořenech pšenice tvrdé, pěstované v podmínkách vodního deficitu.

3 Literární rešerše

3.1 Stres u rostlin (definice, charakteristika a dělení)

Stres rostlin lze být obecně definován jako nepříznivé působení environmentálních vlivů na rostlinu. Na toto působení lze nahlížet z několika směrů, kde první z nich vychází z prosté mechaniky, kdy čím větší silou (v tomto případě stresem) na rostlinu působíme, tím silnější odezvu zaznamenáváme. Z toho plyne, že čím větší stres, tím větší poškození organismu. Druhá teorie vypovídá, že stres je jakákoli změna okolního prostředí, která může nepříznivě ovlivnit či zpomalit vývoj rostliny (Levitt 1980) Podle třetího směru na stres nahlížíme jako na jakékoli biologické zatížení, které zpomalí či zcela zastaví biologický vývoj organismu (Selye 1973).

Dále lze jako stres označit situaci, kdy se životní podmínky rázem významně odchyli od běžných optimálních podmínek k životu, jedná se o stav nebo reakci na konkrétní situaci celého organismu (Larcher 2001).

Stresory u rostlin lze krátce rozdělit na abiotické a biotické. 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.

3.2 Stresová reakce u rostlin

Rostliny mohou na působení stresorů zareagovat, či se adaptovat různými způsoby. Obecnou reakcí na biotické stresory, je snaha o identifikaci patogenu a následnou produkci obranných látek k jeho likvidaci (Agrios 2005). Obranou proti stresu může být adaptace rostlin na abiotické stresory, která je závislá na aktivaci řady reakcí na molekulární úrovni, zapojených do určení stresového faktoru při přenosu signálu a exprese genů. To má za následek zvýšení tolerance k danému stresoru (Shao et al. 2007). Levitt (1980) navrhl, že adaptace se může dosáhnout buď vyhnutím se stresu, kdy hovoříme o tzv. stresové avoidanci, či vytvořením vnitřní tolerance (neboli rezistence) Levitt 1980). Piterková a kol. (2005) dále uvedla, že stresová avoidance představuje způsob obrany, zahrnující mechanickou bariéru rostliny, jež má převážně dlouhodobý charakter, např. silná kutikula na listech, rezervoáry vody nebo výrazná impregnace buněčné stěny (Piterková a kol. 2005)

3.3 Adaptace na vodní stres

Rostliny lze rozdělit na dvě skupiny, podle jejich strategie vodního hospodaření jako reakcí na stres. První skupinou jsou homoiohydričné rostliny, do kterých řadíme rostliny cévnaté. 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 mechorošty. Poikilohydrie značí neschopnost kontroly ztráty vody do okolního prostředí (Wood 2005)

Mezi mechanismy úniku z 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 dokáží přečkat nepříznivé období ve formě orgánu, přežívajícího v podzemí, a vyhnout se tak potenciálněmu 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, čili 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).

3.4 Vodní stres

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 potenciaální 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).

Chlorofyl je základní katalyzátor fotosyntézy, který je významně ovlivňován vodním stresem. Vyjma tolerantních odrůd pšenice, způsobilo sucho celkový pokles obsahu pigmentů, včetně chlorofylu na odrůdách citlivých na suchu (Loggini et al. 1999). Regulátory růstu rostlin jsou široce používány u polních plodin k různým účelům. Retardanty růstu rostlin byly použity ke kontrole polehávání u intenzivně obhospodařovaných obilnin omezením výšky rostlin (Stobbe et al. 1992). Ošetření kyselinou abscisovou (ABA) způsobila akumulaci prolinu v listech ječmene (Stewart 1980). Relativní obsah vody, vlhkost listů, obsah chlorofylu a výtěžek zrn byly zvýšeny ošetřením rostlin cycocolem (regulátor růstu a vývoje) u dešťově zalévané pšenice (Bhat et al. 1990).

3.5 Kompatibilní soluty (Prolin, Glycin betain)

Když se rostliny setkávají s nepříznivými environmentálními podmínkami spojenými s vysokými hladinami soli, suchem nebo nízkou teplotou, chrání se rostlinné buňky před stresem vysokých koncentrací 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 jde 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 je například solný stres a stres chladem. Kromě toho mohou některé kompatibilní soluty sloužit jako účinné ochranné látky, stabilizací struktur a funkcí určitých makromolekul (Santoro et al. 1992; Papageorgiou & Murata 1995).

Mnoho rostlin akumuluje organické osmolyty v reakci na uložení environmentálních stresů, které způsobují buněčnou dehydrataci. Ačkoli se adaptivní úloha těchto sloučenin při zprostředkování osmotické úpravy a ochraně subcelulární struktury stala centrálním dogmatem u fyziologie stresu, důkaz ve prospěch této hypotézy je do značné míry korelační. Transgenní rostliny upravené pro akumulaci prolinu, mannitolu, fruktanu, trehalosu, glycin betainu nebo ononitolu vykazují nepatrné zlepšení tolerance soli a sucha. I když tyto studie neodmítají kauzativní vztahy mezi hladinami osmolytů a stresovou tolerancí, je nepravděpodobné, že by absolutní koncentrace osmolytů v těchto rostlinách zprostředkovaly osmotickou úpravu. Metabolické přínosy akumulace osmolytů mohou rozšířit klasicky přijaté role těchto sloučenin. Při opětovném posouzení funkčního významu slučitelné akumulace rozpuštěných látek se navrhuje, že syntéza prolinu a glycinu betainu může pufrovat buněčný redoxní potenciál. Poruchy v snímání hexózu u transgenních rostlin, které byly šlechtěny pro produkci trehalosu, fruktanů nebo mannitolu, mohou být důležitým faktorem, k pozorovaným fenotypům tolerantním vůči stresu. Mohou být také zahrnuty související účinky na alokaci fotoasimilátu mezi kořenovými a nadzemními tkáněmi rostlin. V současné době je nejasné, zda transport osmolytů mezi subcelulárními kompartmenty či různými orgány představuje překážku, která omezuje toleranci stresu na úrovni celé rostliny. Pokud však má metabolismus osmolytů dopad na hexosovou či redoxní signalizaci, může být tedy důležitý pro přenos signálu na dlouhou vzdálenost skrze rostlinu (Hare & Cress 2002).

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). Předpokládá se, že tato akumulace je ochranným mechanismem proti mnoha nepříznivým environmentálním podnětům. V rostlinách je glycin betain syntetizován v chloroplastech (Hanson & Scott 1980; Rhodes & Hanson 1993). 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).

Prolin a glycin betain zvýšily aktivitu antioxidantních enzymů a poskytly toleranci ke stresu kadmíem v kultivovaných tabákových buňkách (Mansour 1998; Islam et al. 2009). Při solném stresu glycin betain a prolin snížily poranění membrány, zlepšily příjem K^+ , růst a zvýšily obsah chlorofylu (Gadallah 1999). Glycin betain může chránit fotosyntetický aparát před poškozením vyvolaným stresem (Alia et al. 1998; Chen & Murata 2002; Sakamoto & Murata 2002), stabilizovat komplex vyvíjející kyslík (OEC) a chránit jej, stejně jako PSII, proti tepelnému stresu (Papageorgiou & Murata 1995; Allakhverdiev et al. 1996).

3.6 Prolin

Prolin se hromadí 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 stresům životního prostředí (Szabados & Savouré 2010).

Je schopen chránit buňky před poškozením, působením jako osmotické činidlo, tak i jako 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).

Jev akumulace prolinu je znám při výskytu vodního deficitu (Hare & Cress 1998), salinity, nízké teploty, při vystavení těžkým kovům, UV záření apod. Kromě toho, že působí jako osmolyt pro osmotickou úpravu, přispívá prolin ke stabilizaci subcelulárních struktur (např. membrán a proteinů), zachycení volných radikálů a pufrování buněčného redoxního potenciálu za stresových podmínek (Ashraf & Foolad 2007). Může také působit jako hydrotrop kompatibilní s proteinem, zmírňovat cytoplazmatickou acidózu a udržovat vhodné poměry

NADP⁺ / NADPH kompatibilní s metabolismem (Hare & Cress 1997). U mnoha druhů rostlin byla akumulace prolinu při solném stresu korelována se stresovou tolerancí a bylo prokázáno, že jeho koncentrace 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).

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

3.7 Prolinová biosyntéza, signalizace a transport

Prolinová biosyntetická dráha 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' -pyrrolin-5-karboxylát (P5K). Reakce je katalyzována Δ' -pyrrolin-5-karboxylátsyntetázou (P5KS) a Δ' -pyrrolin-5-karboxylátreduktázou (P5KR). P5KS je kódován dvěma geny, zatímco P5KR 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 P5K z prolinu a P5K dehydrogenáza (P5KDH) konvertuje P5K na glutamát. Dva geny kódují PDH, zatímco jediný gen P5KDH byl identifikován v huseníčku (*Arabidopsis*) a tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Deuschle & Funck 2001). Transkripce PDH je aktivována rehydratací a prolinem, ale je potlačena dehydratací, čímž se zabraňuje degradaci prolinu během abiotického stresu (Kiyosue & Yoshida 1996).

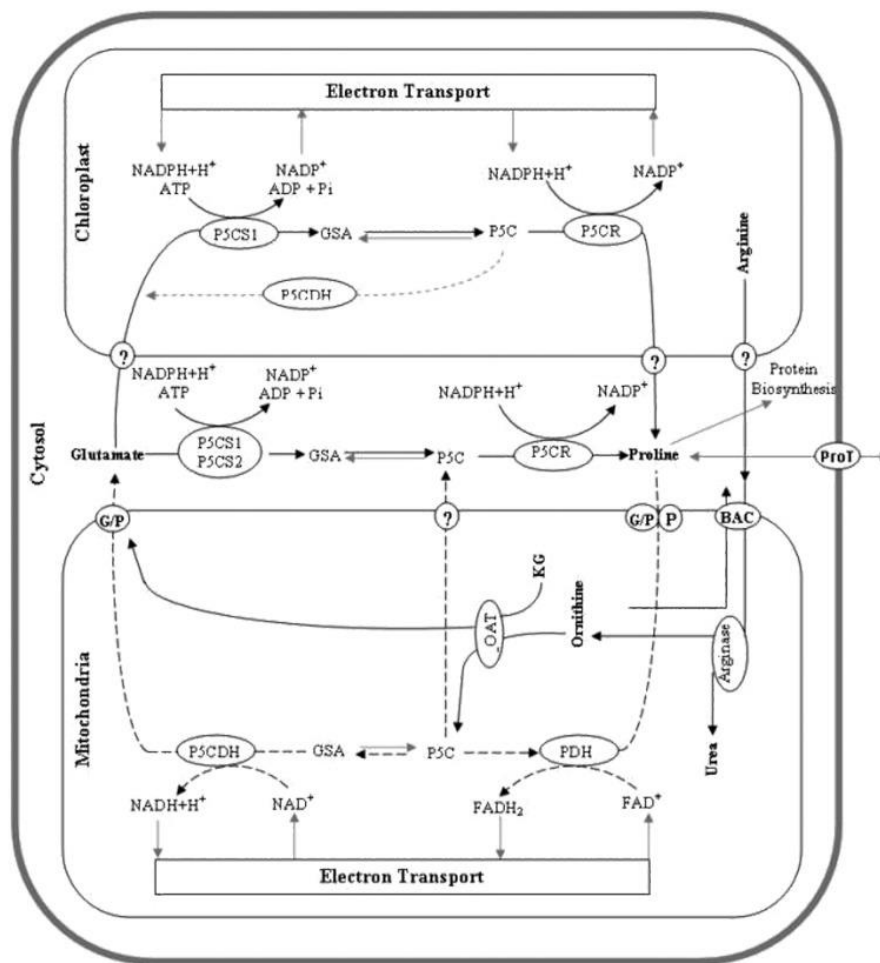
V alternativní ornithin-dependentní cestě může být prolin syntetizován z ornitinu, který je transaminován na P5K pomocí ornithin-8-aminotransferázy. (Verbruggen & Hermans, 2008) Ornithin-dependentní dráha je důležitá u mladých rostlin, hlavně při vývoji sazenic a v některých rostlinách pro akumulaci 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 zhasedla kyslíku (Matysik & Alia 2002).

Bylo zjištěno, že volná akumulace prolinu je jednou z nejrychlejších reakcí rostlin pšenice na vodní stres (Tan & Halloran 1982; Rascio et al. 1994). V kukuřici byly hladiny prolinu zvýšeny až 100krát v reakci na vodní stres (Voetberg & Sharp 1991), zatímco v čiroku se volný prolin nijak významně nenaakumuloval, až dokud rostliny nebyly silně stresovány a viditelně zvadlé (Waldern et al. 1974).

Exogenní aplikace prolinu snižuje hladiny RFK u hub a kvasinek, čímž zabraňuje programované smrti buněk (Chen & Dickman 2005), a také zabraňuje peroxidaci lipidů v buňkách řas vystavených těžkým kovům (Mehta & Gaur 1999). Předúprava prolinu také zmírnila toxicitu Hg^{2+} u rýže (*Oryza sativa*) prostřednictvím vychytávání RFK, jako je například H_2O_2 (Wang & Zung et al. 2008). Poškozující účinky RFK na fotosystém II (PSII) mohou být redukovány prolinem v izolovaných tylakoidních membránách (PSII) (Alia & Mohanty 1997).

Vnitřní obsah prolinu může být určen biosyntézou, katabolismem a transportem mezi buňkami a různými buněčnými kompartmenty. Předpokládá se, že biosyntetické enzymy (P5KS1, P5KS2 a P5KR) jsou lokalizovány v cytosolu, zatímco mitochondriální lokalizace je předurčena pro enzymy zapojené do katabolismu prolinu (jako jsou PDH1 / ERD5, PDH2, P5KDH a OAT) (Szabados & Saviouré 2010).



Obr. 1

Metabolismus prolinu u vyšších rostlin. Pevné čáry představují biosyntetickou dráhu, zatímco katabolické dráhy jsou znázorněny čárkovaně. BAC - základní aminokyselinový transportér (pro výměnu argininu a ornitinu); Glu - glutamát; G / P - mitochondriální glutamát / prolin antiportér; KG - a-ketoglutarát; P - mitochondriální prolinový transportér; Pi - anorganický fosfát; ProT - prolin transportér; ? - neznámé transportéry (Szabados & Savoure 2010).

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 absorpčních 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).

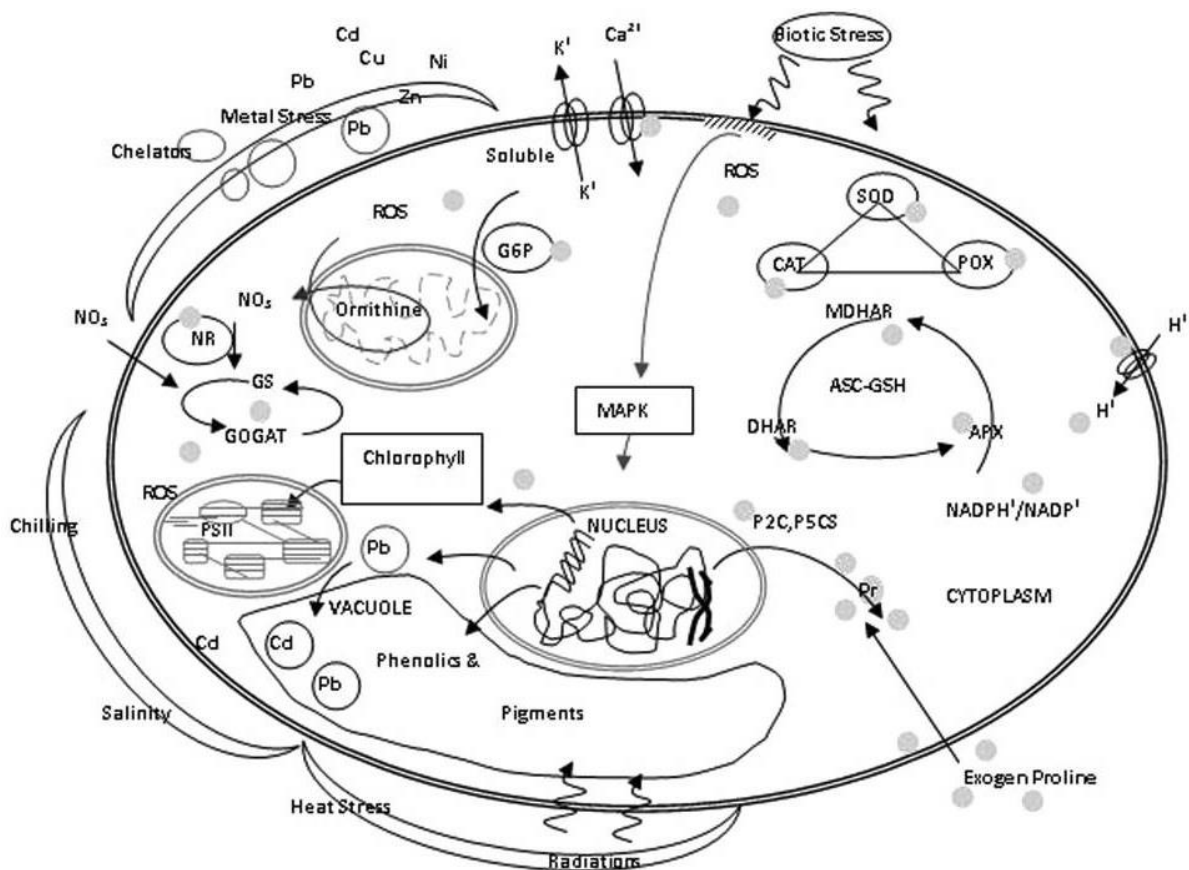
Metabolismus prolinu byl v rostlinách studován již více než 40 let, nicméně málo je známo o signálních drahách zapojených do jeho regulace. Biosyntetická dráha prolinu se aktivuje, zatímco jeho katabolismus je během dehydratace potlačen a rehydratace reguluje v opačném směru (Strizhov et al. 1997; Deuschle et al. 2001; Verbruggen et al. 1996; Yoshida et al. 1995). Chen et al. indikoval, že akumulace prolinu v oddělených listech rýže po vystavení přebytku mědi byla způsobena proteolýzou a zvýšenou aktivitou A1-pyrrolin-5-karboxylátreduktázy či ornitin-8-aminotransferázy, čili enzymy metabolismu prolinu. Bylo také zjištěno, že syntéza prolinu, indukovaná mědí, a akumulace v oddělených listech rýže, byla zprostředkována kyselinou abscisovou (ABA) (Chen et al. 2001). Zhang et al. uvedl, že syntéza prolinu indukovaná mědí je spojena s tvorbou NO. Ve zmíněné studii autoři uvedli, že expozice *Chlamydomonas reinhardtii* vzrůstající koncentraci mědi vedla ke zvýšené syntéze prolinu a současnému zvýšení intracelulární hladiny NO. Autoři argumentovali, že tato intracelulární tvorba NO se podílela na mědí-indukované akumulaci a signalizaci prolinu. Tento pojem byl do značné míry založen na skutečnosti, že aplikace nitroprusidu sodného (silného donoru NO) zvýšila aktivitu a množství transkriptu P5KS (klíčového enzymu biosyntézy prolinu) v řasách (Algae) ošetřených mědí. Tato aktivita a množství P5KS byla blokována, pokud byl použit lapač NO místo donoru NO (Zhang et al. 2008). Dále bylo u řetízkovky (*Scenedesmus*) popsáno, že exogenní prolin působí detoxikací RFK generovaného při odezvě na ošetření těžkým kovem (Cu nebo Zn), spíše než zlepšením antioxidačního obranného systému (Tripathi & Gaur 2004). Podobně Wang et al. také prokázal, že ochranného účinku prolinu před toxicitou Hg u rýže bylo dosaženo detoxikací RFK, generované v odezvě na ošetření kovy (Wang et al. 2009).

3.8 Vliv exogenního prolinu na růst rostlin za měnícího se prostředí

Když jsou rostliny vystaveny abiotickému stresu, tak prožívají inhibici růstu nebo jeho retardaci. Exogenní aplikace prolinu však poskytla osmoprotekci a také zvýšila růst rostlin vystavených působení solného stresu (Csonka & Hanson 1991). Roy et al. (1993) uvedl, že prolin, aplikovaný exogenně při nízké koncentraci, zmírnil nepříznivé účinky salinity u rýže (Roy et al. 1993). Pokud byl přidán do kultivačního média při nízkých koncentracích, účinně zmírnil pokles čerstvé hmotnosti, vyvolaný salinitou a také snížil peroxidační poškození lipidových membrán u mletého jádra podzemnice olejné (*Arachis hypogea*). Naopak vyšší koncentrace prolinu se neprokázaly být nijak přínosné (Jain et al. 2001).

V podobné studii Ehsanpour & Fatahian uvedli, že exogenní aplikace prolinu na kultivační médium vystavené působení solným stresem vedlo ke zvýšení suché hmotnosti a také ke zvýšení obsahu volného prolinu v kalusových buňkách vojtěšky (*Medicago sativa*) (Ehsanpour & Fatahian 2003). Při aplikaci exogenně na nezralá embrya kukuřice (*Zea mays*) působení prolinu stimulovalo jejich somatickou embryogenezi (Armstrong & Green 1985). Ali et al. (2007) uvedli, že exogenní prolin, aplikovaný jako ošetření rozprašováním při výsadbě semen a ve vegetativním stádiu kukuřice (*Zea mays*), má za následek zvýšený růst v prostředí vodního deficitu (Ali et al. 2007).

Ošetření prolinem, aplikovaným před výsevem na semena jako mořidlo, zmírnilo nepříznivé účinky vyvolané stresem ze sucha u pšenice seté (*Triticum aestivum*), což vyústilo ve zvýšení růstové a výnosové charakteristiky rostliny (Kamran et al. 2009). Exogenní aplikace prolinu zvyšovala růst a také udržovala stav živin podporou příjmu K^+ , Ca^+ , P a N u rostlin kukuřice (*Zea mays*) vystavených stresu ze sucha (Bot et al. 2008). Exogenní aplikace prolinu zmírnila inhibiční účinky kadmia na růst kultivovaných buněk tabáku Bright Yellow-2 (BY-2) (Islam et al. 2007).



Obr. 2

Prolinem zprostředkovaná intracelulární redoxní regulace jako mnohostranná konvergentní strategie odlišných stresů. Rovnováha exogenních a endogenních molekul určuje požadovanou vnitřní koncentraci prolinu (Islam et al. 2007).

3.9 Glycin betain (betulin glycin)

Glycin betain jakožto N, N, N-trimethylglycin, je amfoterní sloučenina, která je v širokém rozsahu fyziologických hodnot pH nábojově neutrální. Je extrémně rozpustný ve vodě, avšak obsahuje nepolární uhlovodíkovou skupinu, která se skládá ze tří methylových skupin. Molekulární vlastnosti glycin betainu (dále jen GB) umožňují interakci s hydrofilními i hydrofobními doménami makromolekul, jako jsou enzymy a proteinové komplexy. Studie *in vitro* ukázaly, že GB není pouze netoxický buněčný osmolyt, který zvyšuje intracelulární osmolaritu, pokud je buňka vystavena hyperosmotickým stavům vyvolaným stresem. Bylo dobře zdokumentováno, že *in vitro* GB stabilizuje struktury a aktivity enzymů a proteinových komplexů a udržuje integritu membrán proti škodlivým účinkům nadměrné soli, chladu, tepla a mrazu (Gorham 1995).

I přestože bylo mnoho pozornosti věnováno působení mechanismů GB, dosud nebyly stanoveny podrobné údaje. Byly však navrženy dvě vzájemně se vylučující hypotézy pro mechanismus, kterým GB stabilizuje makromolekulární struktury. Z výsledků biofyzikální analýzy, Arakawa & Timasheff (1983) navrhli, že GB je přednostně vyloučen z kontaktu s proteinem, tím pádem kolem povrchu proteinu může být udržován hydratační obal (vrstvy vázané vody). Tato „preferenční hydratační aktivita“ stabilizuje nativní strukturu proteinu (Arakawa & Timasheff 1983). Naproti tomu Schobert (1977) přisuzovala stabilizační účinek GB své přímé interakci s proteinem. Podle Schobertové se hydrofobní část GB váže na hydrofobní domény proteinu, od kterých se, pokud nastane vodní deficit, vázaná voda snadno uvolní (Schobert 1977). Tímto způsobem GB umožňuje hydrofobním doménám proteinu, aby se staly dostupnějšími pro vodu, což předchází proteinu v denaturaci, která by jinak byla způsobena dehydratací. Doposud však nebyl předložen nevyvratitelný důkaz ani jedné teorie. Tato problematika byla nedávno přezkoumána z pohledu ochranného účinku GB na fotosyntetický aparát, autory Papageorgiou & Murata (1995).

3.10 Biosyntéza Glycin betainu

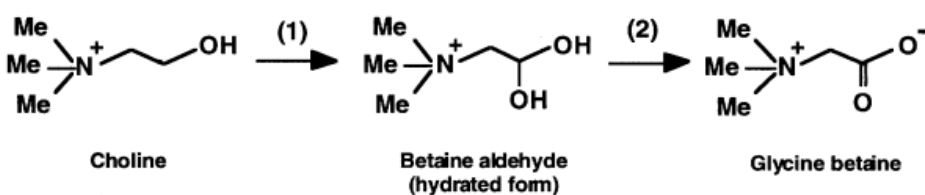
Zdá se, že v přírodě distribuce GB nijak nesouvisí s taxonomií, jelikož se GB nachází v široké škále prokaryot, eukaryotických mikroorganismů, vyšších rostlin a zvířat (Rhodes & Hanson 1993). Ve známých biologických systémech je GB syntetizován prostřednictvím dvou odlišných cest ze dvou odlišných substrátů: cholinu a glycinu. Konverze cholinu na GB byla studována v řadě organismů a cesta zahrnuje jeden nebo dva enzymy v závislosti na způsobu oxidace cholinu. (Obr. 3 (a))

Dvou-enzymová cesta je velmi rozšířená, vyskytuje se přirozeně u různých rostlin, zvířat a mikroorganismů. V této cestě je GB vytvořen jako výsledek dvoukrokové oxidace cholinu prostřednictvím toxického meziproductu betaine aldehydu. U vyšších rostlin jsou reakce katalyzovány CMO (Cholin monooxygenáza) a BADH (Betain-aldehyd dehydrogenáza), které se nachází ve stromatu chloroplastů. Biosyntéza GB je indukovatelná stresem, a koncentrace GB *in vivo* se u rostlinných druhů liší v rozsahu od 40 do 400 $\mu\text{mol (g DW)}^{-1}$ v tzv. přirozených akumulátorech za stresových podmínek (Rhodes & Hanson 1993). Některé bakterie, například *Escherichia coli*, jsou schopné produkovat GB z cholinu, skrze působení dvou dehydrogenáz: membránově vázané CDH (Cholin dehydrogenáza) a BADH (Lamark et al. 1991). Buňky zvířat mohou syntetizovat GB prostřednictvím stejné CDH / BADH cesty (Wilken et al. 1970).

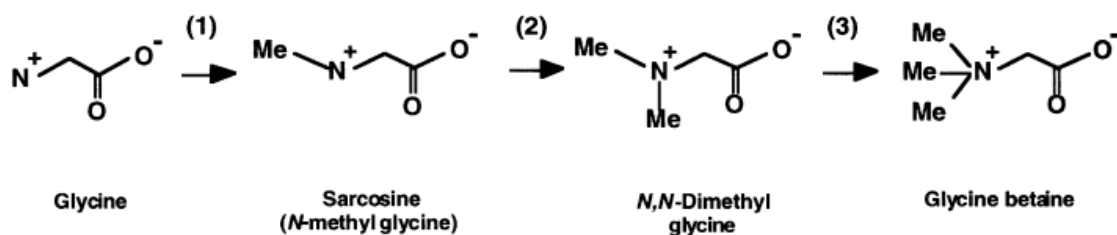
Naproti tomu, jedno-enzymová cesta byla dosud rozpoznána pouze v půdních bakteriích rodu *Arthrobacter*. Celá reakce je katalyzována COD, oxidázou generující H_2O_2 (Ikuta et al. 1997).

Dráha od glycinu k GB byla objevena teprve nedávno a dosud byla rozpoznána pouze ve dvou extrémně halofilních mikroorganismech, *Ectothiorhodospira halochloris* a *Actinopolyspora halophilia* (Obr.3 (b)); Nyysölä et al. 2000). U těchto mikroorganismů je GB generován z glycinu prostřednictvím tří po sobě následujících N-methylací, které jsou katalyzovány dvěma S-adenosylmethionin-dependentními methyltransferázami, GSMT a SDMT. Geny pro všechny enzymy podílejícími se na různých cestách, byly naklonovány a jsou k dispozici pro metabolické inženýrství rostlin, které přirozeně GB neakumulují, čímž jsou obdařeny potenciální schopností tuto důležitou sloučeninu syntetizovat.

(a)



(b)



Obr. 3

Dvě hlavní cesty syntézy GB. (a) Syntéza GB z cholinu. V této cestě je cholin oxidován na GB prostřednictvím dvou krokové reakce [označené (1) a (2)], ve kterých je zapojen jeden či dva enzymy. U vyšších rostlin je reakce (1) katalyzována CMO a reakce (2) je katalyzována BADH. U savců a některých bakterií (např. *E. coli*) se přeměna cholinu na GB podobá přeměně u rostlin. Výjimku tvoří reakce(1), při níž CDH nahrazuje CMO. (b) Syntéza GB z glycinu. GB je generován jako výsledek tří po sobě následujících N-methylací glycinu. Enzymy GSMT

a SDMT mají částečně překrývající se funkce, katalyzující první dvě [označené jako (1) a (2)] a poslední dvě [označené jako (2) a (3)] methylace.

3.11 Metodika

V rámci pokusu byl sledován vliv vodního deficitu a souběžný vliv exogenní aplikace prolinu a glycin betulinu u rostlin pšenice tvrdé „*Triticum durum*“, odrůda Haristide. na obsah volného prolinu v rostlinných pletivech, za předpokladu možnosti využití těchto látek jako protistresových.

Pšenice tvrdá „*Triticum durum*“ odrůda Haristide

Pšenice „*Triticum*“ je skupina jednoděložných rostlin z čeledi lipnicovitých „*Poaceae*“ s přibližně 20 druhy, zahrnující šlechtěné i planě rostoucí druhy pšenic. Pšenice jsou jedny z nejstarších kulturně pěstovaných rostlin, pocházející z jihozápadní Asie. Pšenice mají duté stéblo, dělené kolénky. Květenstvím je lichoklas, složený z klásků, v nichž se nacházejí obilky s výraznou podélnou rýhou. Z klásků může vyrůst 2 až 5 květů. Plodem je obilka, která zůstává až do zralosti volná, a nesrůstá s pluchou ani pluškou. Plucha je hladká a pluška bývá blanitá. Tento druh patří mezi pšenice, které se nazývají nahé (Slavík & Štěpánská 2004).

Odrůda Haristide je poloraná odrůda pšenice tvrdé, přesívkového typu, která je nadprůměrně odolná vůči padlím travním a rzím. Střední odolnost projevuje vůči fuzariózám v klasu a braničnatce na listech, a vyšší odolnost vůči braničnatce v klasu. Rostliny jsou vysoké, středně odolné vůči poléhání. Při dodržení přesívkové technologie je přezimování velmi dobré (Slavík & Štěpánská 2004).

3.12 Založení a průběh pokusu

V pokusu bude sledován vliv vodního deficitu na obsah prolinu v listech a kořenech po foliární aplikaci prolinu, glycin betulinu a kombinace prolin + glycin betulin rostlin pšenice tvrdé „*Triticum durum*“.

Během experimentu byly rostliny pšenice tvrdé „*Triticum durum*“ pěstovány za tepelně řízených podmínek a částečně řízených světelných podmínek v experimentálním skleníku katedry botaniky a fyziologie rostlin FAPPZ ČZU v Praze. Teplota byla nastavena na 25 °C ve dne a 18 °C v noci. Rostliny byly pěstovány v PVC kontejnerech (o rozměru 37 cm x 27 cm x 14 cm). Výsev proběhl 24.4.2018 do zahradního substrátu A (maximálně 10 % částic nad 10 mm), pH ve vodném roztoku 5,5 – 6,5, substrát je prostý plevelů a škůdců, obsah spalitelných

látek ve vysušeném vzorku je 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 jsme se snažili simulovat průběh jednotlivých agrotechnických postupů, které jsou používány i v praxi. Po výsevu jednotlivých rostlin do pěstebních nádob ve sponu (28 rostlin na kontejner, 4 řady po 7 rostlinách), 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 bylo aplikování osmoticky aktivních solutů, proběhlo dohnojení substrátů na přibližný odběrový normativ pšenice tvrdé, na výnosový potenciál 5 t N, P, K a Mg. Poté 1.6.2018 následovalo rozdělení rostlin do jednotlivých skupin podle stresu a aplikace účinné látky: jednotlivé varianty, zavlažovaná varianta bez aplikace (K), zavlažovaná varianta s aplikací prolinu (KP), zavlažovaná varianta s aplikací glycinu (KG), zavlažovaná varianta s aplikací obou látek souběžně (KPG). Varianta vystavena stresu suchem (V), stresovaná varianta s aplikací prolinu (VP), stresovaná varianta s aplikací glycinu (VG) a stresovaná varianta s aplikací glycinu i prolinu souběžně (VPG). V průběhu pokusu byly stresované varianty v některých termínech zavlažovány, a to proto, aby pro zkoumané rostliny nebylo příliš vysoké sucho letální. Cílem bylo rostliny dopěstovat do fáze metání.

Časový harmonogram jednotlivých odběrů a aplikací

24.4.2018	Výsev
9.5.2018	základní výživa roztok Haugland 200 ml/nádoba a foliární aplikace mikroelementy
21.5.2018	výživa NPK + Mg 200 ml/nádoba, mikroelementy a foliární aplikace mikroelementy
23.5.2018	zakracování aplikace CCC 0,75 ml/10 m ²
28.5.2018	NPK + Mg 100 ml/nádoba
1.6.2018	rozdělení do jednotlivých variant: zavlažovaná varianta bez aplikace (K), zavlažovaná varianta s aplikací prolinu (KP), zavlažovaná varianta s aplikací glycinu (KG), zavlažovaná varianta s aplikací obou látek

	souběžně (KPG). Varianta vystavena stresu suchem (V), stresovaná varianta s aplikací prolin (VP), stresovaná varianta s aplikací glycinu (VG) a stresovaná varianta s aplikací glycinu i prolinu souběžně (VPG).
4.6.2018	zahájení stresu – přerušení zálivky u stresovaných variant u kontrolních rostlin zálivka 400 ml/nádoba destilovaná voda + odběr (K. KP, KG, KPG)
7.6. 2018	3. odběr (K. KP, KG, KPG, V, VP, VG, VPG)
8.6.2018	foliární aplikace močoviny 7 % roztok kvalitativní přihnojení
11.6.2018	4. odběr (K. KP, KG, KPG, V, VP, VG, VPG)
14.6.2018	5. odběr (K. KP, KG, KPG, V, VP, VG, VPG), následně zálivka u stresu vodou 200 ml/nádoba
18.6.2018	6. odběr (K. KP, KG, KPG, V, VP, VG, VPG), následně zálivka u stresu vodou 200 ml/nádoba
22.6.2018	7. odběr (K. KP, KG, KPG, V, VP, VG, VPG) – ukončení pokusu

3.13 Stanovení obsahu volného prolinu

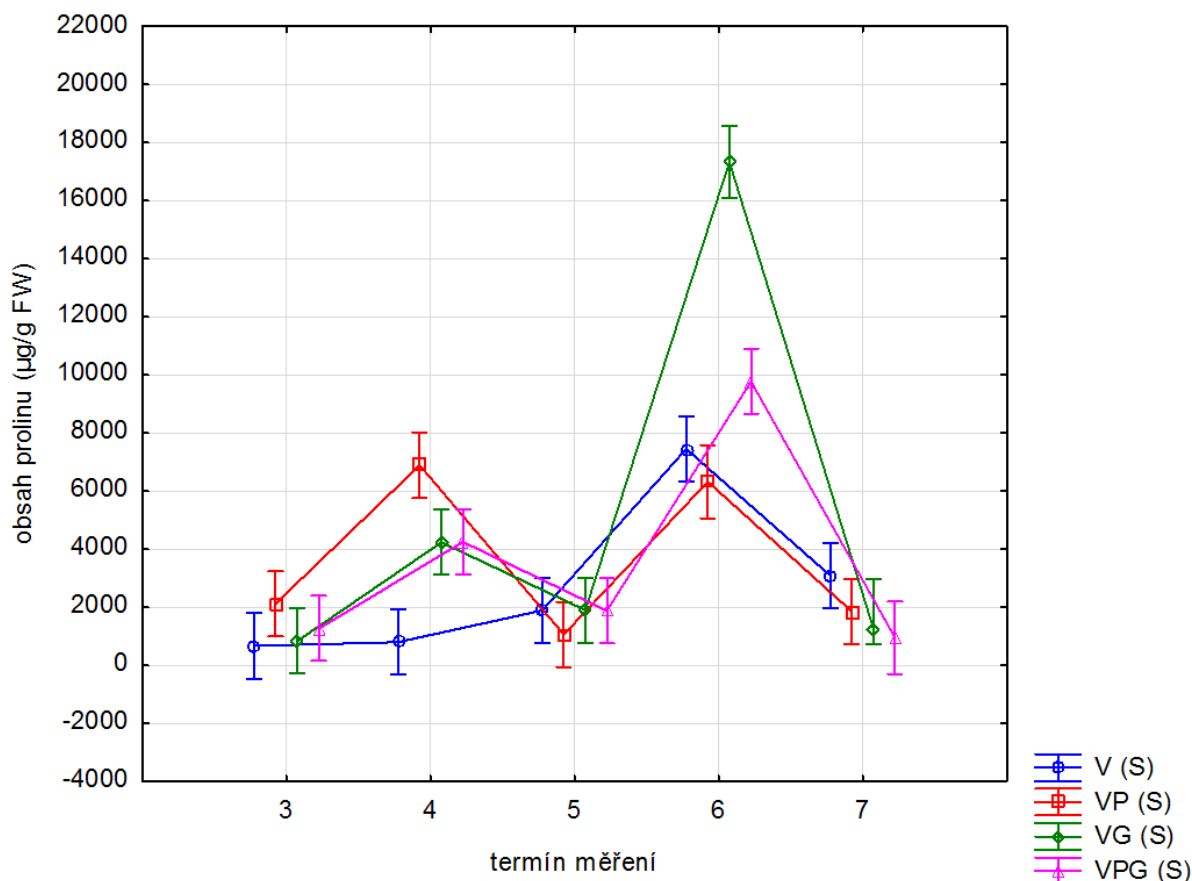
Použitá metodika pro stanovení koncentrace prolinu v rostlinném pletivu byla upravena z původní metodiky podle Bateše (1973). Volný prolin je z rostlinného pletiva získán pomocí 3% kyseliny sulfosalicylové. Tato bezbarvá kyselina působí jako efektivní proteinové srážedlo ve vodném roztoku, do něhož jsou 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, nezbytné pro 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.

4 Výsledky

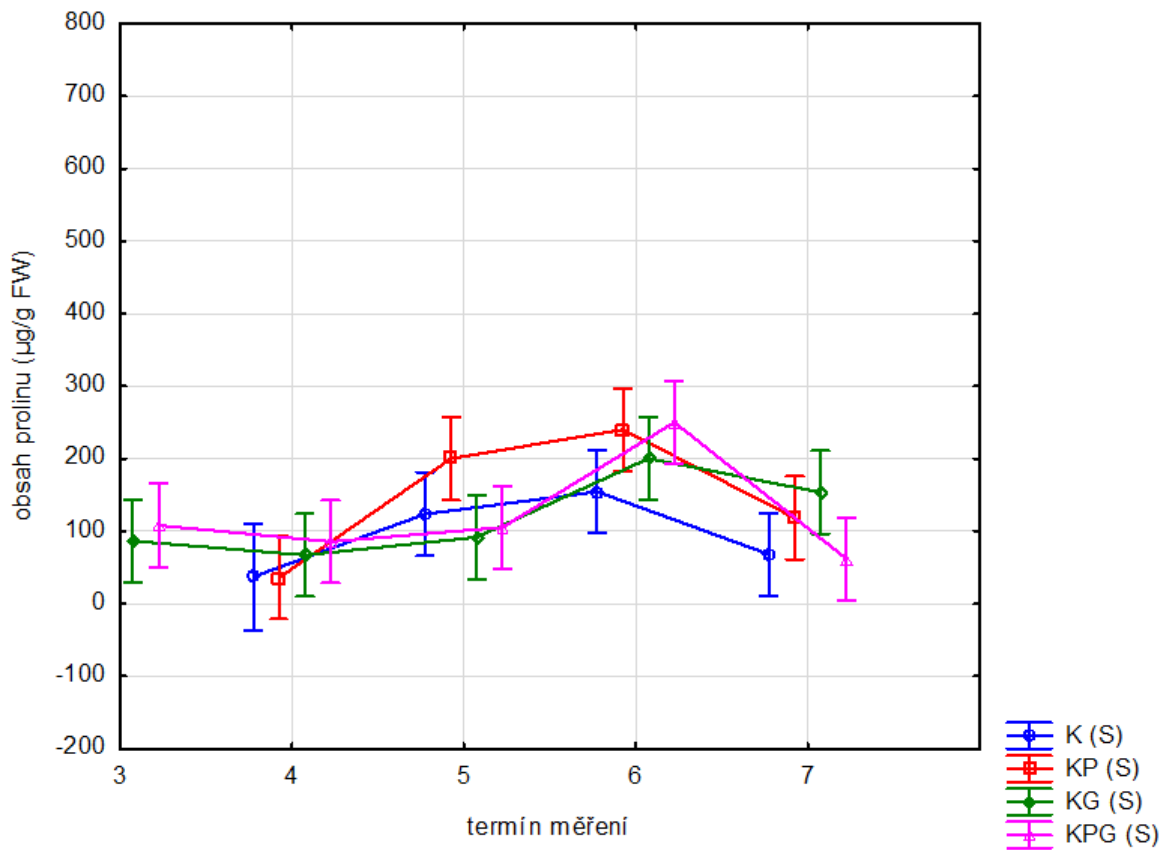
4.1 Obsah prolinu v nadzemní biomase pokusných rostlin



Graf 1: Obsah prolinu v nadzemní biomase rostlin pod vlivem vodního stresu

V grafu 1 je zobrazen vliv vodního stresu na obsah prolinu v nadzemní části (shoots) pšenice tvrdé. Z grafu jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými variantami v obsahu prolinu. Na počátku pokusu (3. termín měření) byl obsah prolinu obdobný u všech variant. S postupným rozvojem vodního stresu u variant s aplikací prolinu a glycin betulinu dochází v porovnání s kontrolou k nárůstu obsahu prolinu. Při 5. termínu měření je patrný pokles obsahu prolinu na úroveň kontrolní varianty. Při následujícím termínu měření je patrný opětovný nárůst obsahu prolinu u všech pokusných variant. Nejvíce prolinu bylo obsaženo u varianty s aplikací glycinu. V posledním termínu měření obsah prolinu u všech variant opět klesá.

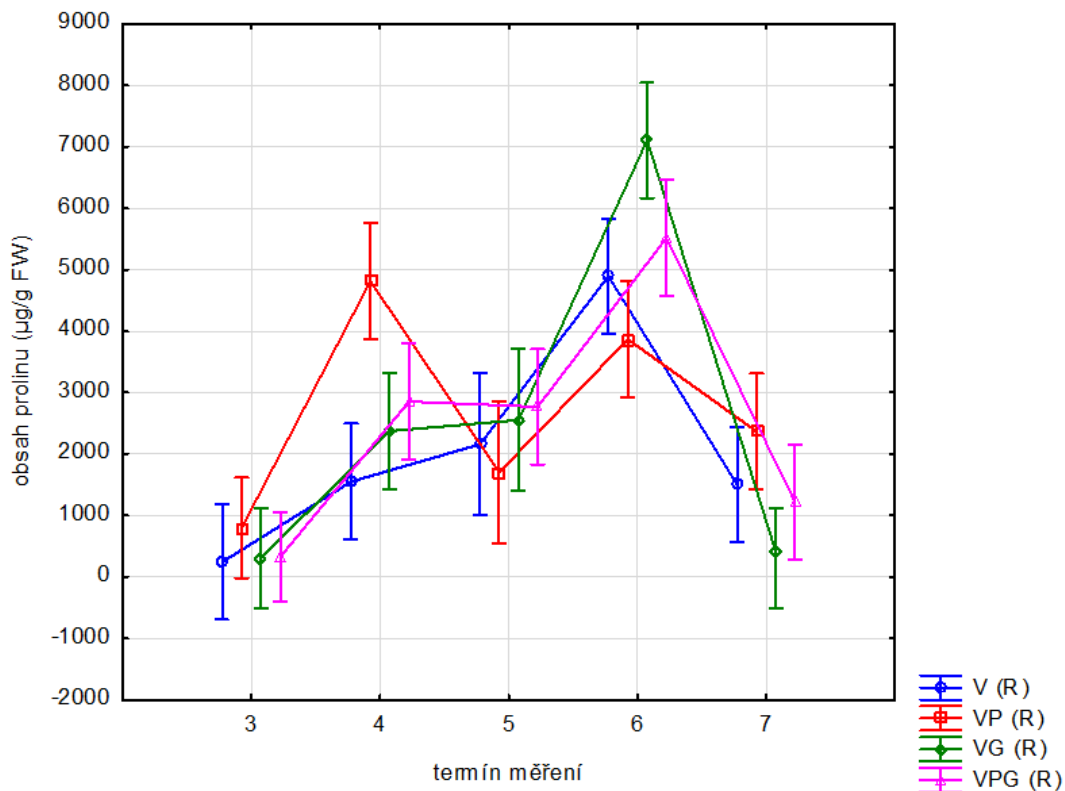
4.2 Obsah prolinu v nadzemní biomase kontrolních rostlin



Graf 2: Obsah prolinu v nadzemní biomase kontrolních rostlin

V grafu 2 je zobrazen obsah prolinu v nadzemní části (shoots) kontrolních rostlin pšenice tvrdé. Z naměřených hodnot je patrné, že mezi variantami nevznikly rozdíly v obsahu prolinu.

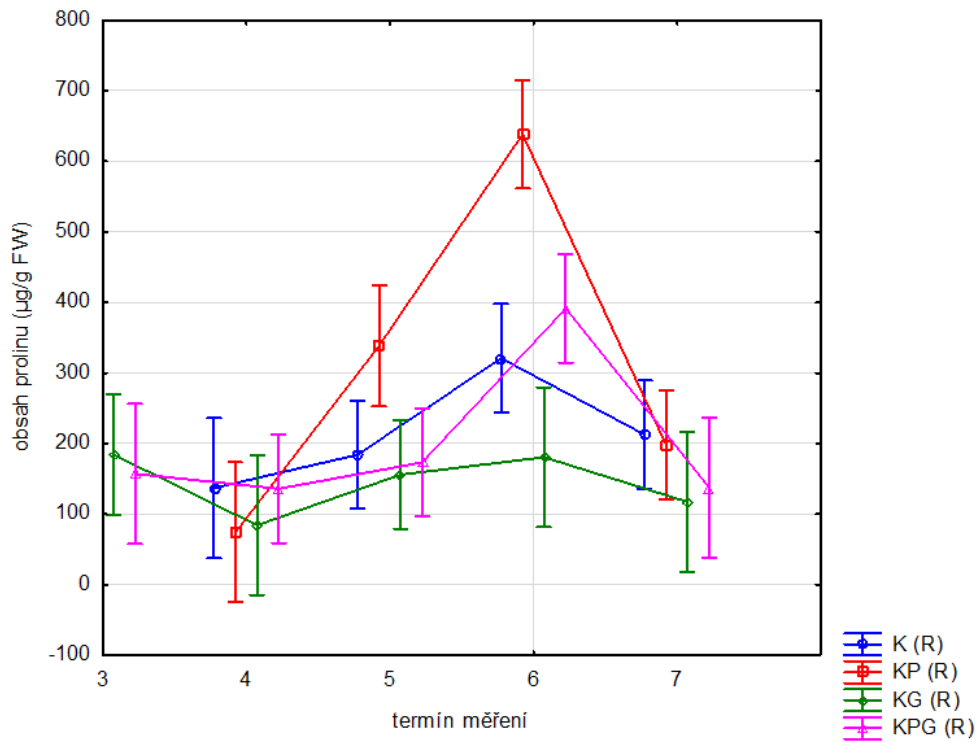
4.3 Obsah prolinu v kořenech pokusných rostlin



Graf 3: Obsah prolinu v kořenech rostlin pod vlivem vodního stresu

V grafu 3 je zobrazen vliv vodního stresu na obsah prolinu v kořenech rostlin (roots) pšenice tvrdé. Z grafu jsou patrné rozdíly mezi jednotlivými variantami v obsahu prolinu. Při 3. měření (3. den vodního stresu) byl obsah prolinu u všech variant obdobný. Při 4. měření se u variant glycin a prolin + glycin mírně zvýšil obsah prolinu oproti kontrole, zatímco u varianty prolin výrazně narostla hodnota obsahu prolinu – až trojnásobně. Při 5. měření se obsah prolinu u variant glycin a prolin + glycin téměř shodoval s kontrolní variantou, naopak u varianty prolin obsah významně klesl na přibližnou hodnotu kontrolní varianty. 6. měření ukázalo zvýšený obsah prolinu u varianty glycin oproti ostatním variantám, naopak mírně nižší hodnotu obsahu prolinu, než v kontrolní variantě bylo naměřeno u varianty prolin. Poslední 7. měření ukázalo pokles obsahu prolinu u všech variant, na hodnoty o málo nižší, než při měření 5.

4.4 Obsah prolinu v kořenech kontrolních rostlin



Graf 4: Obsah prolinu v kořenech kontrolních rostlin

V grafu 4 je zobrazen vliv vodního stresu na obsah prolinu v kořenech kontrolních rostlin (roots) pšenice tvrdé. Z grafu je patrné odchýlení obsahu prolinu od ostatních variant v kořenech rostlin u varianty prolin. Toto zvýšení obsahu lze sledovat od 5. do 6 měření, poté obsah prolinu klesl na úroveň ostatních variant.

5 Diskuze

5.1 Obsah prolinu v rostlinách *Triticum durum*

U rostlin pšenice tvrdé, *Triticum durum*, byl při experimentu sledován vliv působení foliární aplikace kompatibilních solutů prolin a betulin glycin na obsah prolinu v nadzemní biomase pokusných rostlin a v jejich kořenech, kdy byly tyto rostliny zároveň vystaveny vodnímu stresu.

Vodní deficit patří mezi abiotické stresové faktory, které mají v globálním měřítku významné negativní dopady na zemědělskou produkci, včetně pěstování rostlin. Tento stresový faktor se projevuje již na celém území ČR.

Voda je nezbytnou součástí metabolických procesů a vytváří prostředí pro jejich průběh. Její omezené množství tedy vede ke snížení metabolické aktivity a tím i omezení syntézy bílkovin, nezbytných pro růst (Ashraf & Harris 2005)

Bohnert et al. (1995) ustanovil na základě své studie závěr, pokud se rostliny setkávají s nepříznivými environmentálními podmínkami spojenými s vysokými hladinami soli, suchem nebo nízkou teplotou, chrání se rostlinné buňky před stresem vysokých koncentrací intracelulárních solí akumulací různých malých organických metabolitů, které jsou souhrnně označovány jako kompatibilní soluty. Na jeho myšlenku navázali ve svých pracích van Heerden & Krüger (2002), Ashraf & Foolad (2007), a Seki et al. (2007), z jejichž vzájemně nezávislých studií vyplynul fakt, kdy mnoho druhů rostlin přirozeně akumuluje glycin betain a prolin jako hlavní organické osmolyty, pokud jsou vystaveny abiotickému stresu jako je sucho.

Hasegawa et al. (2000) uvedli, že se prolin hromadí v reakci na několik abiotických stresů. Zvýšená akumulace prolinu a glycin betainu může snížit poškození vyvolané stresem rostlinných buněk.

Ve své studii Ali et al. (2007) uvedli, že exogenní prolin, aplikovaný rozprašováním při výsadbě semen a ve vegetativním stádiu kukuřice (*Zea mays*), měl za následek zvýšený růst v prostředí vodního deficitu. Zároveň i Bot et al. (2008) ve své práci později uvedli, že exogenní aplikace prolinu zvyšovala růst a podporu příjmu živin u rostlin kukuřice (*Zea Mays*), vystavených vodnímu stresu.

Výše uvedené poznatky teoreticky potvrzují hypotézu tohoto pokusu, kdy se po uvedení rostlin do vodního stresu skutečně v určitých stádiích růstu rostlin postupně zvyšuje obsah

prolinu při foliární aplikaci prolinu a glycin betulinu v nadzemní biomase pokusných rostlin a v jejich kořenech.

Gorham (1995) uvedl, že molekulární vlastnosti glycin betainu umožňují interakci s hydrofilními i hydrofobními doménami makromolekul, jako jsou enzymy a proteinové komplexy. Tento pokus bohužel nemůže potvrdit hypotézy působení mechanismů glycin betulinu na stabilizaci makromolekulárních struktur dle Arakawy & Timasheffa (1983), či dle Schobertové (1977), avšak nelze je ani vyvrátit.

Zajímavým faktem se prokázal nezvýšený obsah volného prolinu v nadzemní biomase nestresovaných kontrolních rostlin a zároveň transport volného prolinu do kořenové části u varianty „KP“.

U stresovaných rostlin dochází u variant s foliární aplikací kompatibilních solutů k okamžitému nárustu obsahu prolinu oproti kontrolní variantě.

V nadzemní biomase a kořenové části stresovaných rostlin dochází k patrným výkyvům obsahu volného prolinu. Existuje možnost, že za tímto jevem stojí biosyntetické dráhy prolinu či jeho katabolismus.

Lze říci, že tento pokus vykazuje osmoprotektické vlastnosti glycin betulinu, který hydrofobním doménám proteinů včetně prolinu umožňuje stát se dostupnějšími pro vodu. Toto tvrzení by bývalo šlo potvrdit výsledkem 6. měření u pokusných rostlin, kdy se obsah prolinu v nadzemních částech i v kořenech pokusných rostlin u varianty „VG“ oproti variantě „V“ výrazně zvýšil. Příčinou tohoto jevu však mohla být zálivka, nutná pro přežití rostlin, která byla aplikována po 5. termínu měření. K objasnění této hypotézy by však bylo nutné uskutečnit další experimenty.

Po aplikaci 2. záhonné zálivky po 6. termínu měření došlo k poklesu obsahu prolinu v nadzemní biomase a v kořenech všech pokusných rostlin, ke kterému mohlo dojít z důvodu dozrávání rostlin z mléčné do voskové zralosti. Avšak to je jen hypotéza, ke které je nutné uskutečnit další pokusy.

6 Závěr

Cíl této práce spočíval v experimentu, při kterém byl sledován vliv foliární aplikace dvou kompatibilních solutů: prolinu, glycin betulinu a jejich kombinace na obsah prolinu v nadzemní biomase a kořenech rostlin pšenice tvrdé, *Triticum durum*, pěstovaných v podmínkách vodního deficitu.

Sledovaným parametrem byl obsah volného prolinu v různě ošetřovaných variantách rostlin pšenice tvrdé. Rozdělení rostlin do jednotlivých skupin podle stresu a aplikace účinné látky: jednotlivé varianty, zavlažovaná varianta bez aplikace (K), zavlažovaná varianta s aplikací prolinu (KP), zavlažovaná varianta s aplikací glycinu (KG), zavlažovaná varianta s aplikací obou látek souběžně (KPG). Varianta vystavena stresu suchem (V), stresovaná varianta s aplikací prolinu (VP), stresovaná varianta s aplikací glycinu (VG) a stresovaná varianta s aplikací glycinu i prolinu souběžně (VPG).

Cílem bylo sledovat hodnoty obsahu prolinu u jednotlivých variant rostlin pšenice tvrdé, s ohledem na jejich růst ve vodním stresu.

6.1 Závěr obsahu prolinu v nadzemní biomase pokusných rostlin

Nejvyšších hodnot obsahu volného prolinu v nadzemní biomase dosáhla varianta VG – vodní stres s foliární aplikací betulin glycinu, nižšího obsahu prolinu dosáhla varianta VPG – vodní stres s foliární aplikací kombinace prolinu a glycin betulin, a nejnižších hodnot dosáhly varianty VP – vodní stres s foliární aplikací prolinu a V – samotný vodní stres. Tyto dvě varianty dosahovaly similárních hodnot.

K objasnění důvodu nejvyššího obsahu volného prolinu u varianty VG je třeba uskutečnit další experimenty.

6.2 Závěr obsahu prolinu v kořenech pokusných rostlin

Obsahy volného prolinu v kořenech dosahují stejných efektů, jako hodnoty volného prolinu v nadzemní biomase pokusných rostlin.

Jediná výjimka tvoří obsah volného prolinu u kontrolních rostlin ve variantě KP – zavlažovaná varianta s aplikací prolinu, u které došlo k transportu volného prolinu z nadzemní biomasy do kořenů.

7 Seznam použité literatury

Agrios GN. 2005. Chapter three - EFFECTS OF PATHOGENS ON PLANT PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS. San Diego: Academic Press s. 105-123.

Ali Q, Ashraf M, Athar HUR. 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.

Alia, Hayashi H, Sakamoto A, Murata N. 1998. Enhancement of the tolerance of Arabidopsis to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *The Plant Journal*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) **16**: 155-161.

Alia, Pardha Saradhi P, Mohanty P. 1997. Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **38**: 253-257.

Allakhverdiev SI, Feyziev YM, Ahmed A, Hayashi H, Aliev JA, Klimov VV, Murata N, a Carpentier R. 1996. Stabilization of oxygen evolution and primary electron transport reactions in photosystem II against heat stress with glycinebetaine and sucrose. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **34**: 149-157.

Al-Tabbal JY, Kafawin AOM. 2005. Effect of water deficit and plant growth regulators on leaf chlorophyll, proline and total soluble sugar content of two durum wheat cultivars (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Dirasat Agricultural Sciences* **32**: 195-204.

Arakawa T, Timasheff SN. 1983. Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **224**: 169-177.

Armengaud P, Thiery L, Buhot N, Grenier-De MG, Savouré A. 2004. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. *Physiologia Plantarum*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) **120**: 442-450.

Armstrong CL, Green CE. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* **164**: 207-214.

Ashraf M, Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 206-216.

- Ashraf M, Harris PJC (eds.). 2005. Abiotic Stresses: Plant Resistance Through Breeding and Molecular Approaches. Food Product Press. New York :398.
- Ashraf M, Harris PJC. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* **166**: 3-16.
- Bartels D, Sunkar. 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **24**: 23-58
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 1973, **39**: 205-207.
- Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell* **7**: 1099.
- Bot PJ, 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 40.
- Csonka LN, Hanson AD. 1991. PROKARYOTIC OSMOREGULATION: Genetics and Physiology: Genetics and Physiology. *Annual Review of Microbiology*. *Annual Reviews* **45**: 569-606.
- Deuschle K, Funck D, Hellmann H, Daschner K, Binder S, Frommer WB. 2001. A nuclear gene encoding mitochondrial Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *The Plant Journal*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) **27**: 345-356.
- Ehsanpour AA, Fatahian N. 2003. Effects of salt and proline on *Medicago sativa* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **73**: 53-56.
- 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**: 1228.
- Foyer CH. 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *THE PLANT CELL ONLINE* **17**: 1866-1875
- Gadallah MAA. 1999. Effects of Proline and Glycinebetaine on *Vicia Faba* Responses to Salt Stress. *Biologia Plantarum* **42**: 249-257.

- 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**: 1598-1611.
- Gorham J. 1995. *Amino Acids and Their Derivatives in Higher Plants*. Cambridge: Cambridge Academ
- Hanson AD, Scott NA. 1980. Betaine Synthesis from Radioactive Precursors in Attached, Water-stressed Barley Leaves. *Plant Physiology* **66**: 342.
- Hare PD, Cress WA, van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) **21**: 535-553.
- Hare PD, Cress WA. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* **21**: 79-102.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. 2000. PLANT CELLULAR AND MOLECULAR RESPONSES TO HIGH SALINITY. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Annual Reviews **51**: 463-499.
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AF, Pichtel J, Ahmad A. 2014. Role of proline under changing environments. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 1456-1466
- 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**: 1077-1086.
- Chen Ch, Dickman MB. 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3459.
- Chen CHT, Chen L, Lin CHCH, Kao CHH. 2001. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. *Plant Science* **160**: 283-290.
- Chen THH, Murata N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 250-257.
- ISLAM MM, Hoque Md.A, Okuma E, Banu Mst.NA, 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**: 1587-1597.

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**: 463-468.

Kamran M, Shahbaz M, Basra S, Aisha N. 2009. Alleviation of drought-induced adverse effects in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) using proline as a pre-sowing seed treatment *41*: 621-632.

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 and Environment* **37**: 300–311

Kiyosue T, Yoshiba 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**, 1323.

Lamark T, Kaasen, Eshoo MW, Falkenberg P, Mcdougall J, Strom AR. 1991. DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline—glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) **5**: 1049-1064.

Larcher W. 2001. *Ökophysiologie der Pflanzen*. Eugen Ulmer-Verlag, Stuttgart 506 pp.

Levitt J. 1980. *Responses of plants to environmental stresses: water, radiation, salt and other stresses*. Academic Press, New York 350pp.

Mansour MMF. 1998. Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 767-772.

Matysik J, Alia, Bhalu B, Mohanty P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Science*. Temporary Publisher **82**: 525.

Mehta SK, Gaur JP. 1999. Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytologist*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) **143**: 253-259.

- Misaki H, Ikuta S, Imamura S, Horiuti Y. 1977. Purification and Characterization of Choline Oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *The Journal of Biochemistry* **82**: 1741-1749.
- 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**: 51-57.
- Nilsen ET, Orcutt DM. 1996. *The physiology of plants under stress*. Wiley **2**.
- Nyysola A, Kerovuo J, Kaukinen P, Von Weymarn N, Reinikainen T. 2000. Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *Journal of Biological Chemistry*. *ASBMB* **275**: 22196-22201.
- 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**: 243-252.
- Piterková J, Tománková K, Luhová L, Petřivalský M. 2005. Oxidativní stres: Lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlině organismu. *Chemické listy* **99**.: 455-466.
- Rajendrakumar CHSV, Suryanayarana T, Reddy AR. 1997. DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process: possible role in the salinity tolerance process. *FEBS Letters*. John Wiley **410**: 201-205.
- 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**: 1437-1446.
- Rhodes D, Hanson AD. 1993. Quaternary Ammonium and Tertiary Sulfonium Compounds in Higher Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. *Annual Reviews* **44**: 357-384.
- 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**: 69.

- Sakamoto A, Murata N. 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants: clues from transgenic plants. *Plant, Cell & Environment*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) **25**: 163-171.
- 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**: 5278-5283.
- Seki M, Umezawa T, Urano K, Shinozaki K. 2007. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 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*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) **25**: 333-341.
- Shao HB, Guo QJ, Chu LY, Zhao XN, Su ZL, Hu YC, Cheng JF. 2007. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids and surfaces biointerfaces*. **1**: 37-45.
- Schobert B. 1977. Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants?. *Journal of Theoretical Biology*. 1977, **68**: 17-26.
- Schwacke R, Grallath S, Breikreuz 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**: 377-392.
- Slavík B, Štěpánská L. 2004. Květena České republiky 7. Akademie věd České republiky
- 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*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) **12**: 557-569.
- Szabados L, Saviouré A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science* **15**: 89-97.
- Tripathi BN, Gaur JP. 2004. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta* **219**: 397-404.

- Verbruggen N, Hermans Ch. 2008. Proline accumulation in plants: a review: a review. *Amino Acids*. **35**: 753-759.
- Verbruggen N, Hua XJ, May M, Van Montagu M. 1996. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: evidence for a negative transcriptional regulator: evidence for a negative transcriptional regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 8787-8791.
- Vogel HJ, Davis BD. 1952. Glutamic γ -Semialdehyde and Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylic Acid, Intermediates in the Biosynthesis of Proline^{1,2}. *Journal of the American Chemical Society*. American Chemical Society **74**: 109-112.
- Wang F, Zeng B, Sun Z, Zhu Ch. 2008. Relationship Between Proline and Hg²⁺-Induced Oxidative Stress in a Tolerant Rice Mutant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **56**: 723.
- Wilken DR, McMacken ML, Rodriguez A. 1970. Choline and betaine aldehyde oxidation by rat liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* **216**: 305-317.
- 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
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214.
- Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, et al. 1995. Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) **7**: 751-760.
- Yu Ch, Claybrook DL, Huang AHC. 1983. Transport of glycine, serine, and proline into spinach leaf mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **227**: 180-187.
- Zhang LP, Mehta SK, Liu ZP, Yang ZM. 2008. Copper-Induced Proline Synthesis is Associated with Nitric Oxide Generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology* **49**: 411-419.