

ROLA PROLINY U ROŚLIN WYŻSZYCH W WARUNKACH STRESU ABIOTYCZNEGO

Role of proline in higher plants under conditions of abiotic stress

Piotr KAROLEWSKI

Summary. In this review the influence of abiotic stress factors on the level of proline in different plant organs is discussed. This is very difficult because the content of proline is also depends on the influence of many interacting intrinsic (age and stage of development) and external (temperature, humidity of air, water status, nutrition etc.) factors.

Results of much research indicates that influences of abiotic factors, such as toxic gases and metals, salinity, drought, low and high temperature affect free proline in a similar fashion. It is characterized by three stages: an initial lack of significant changes, followed by a rapid increase, and finally a reduction in the level of this imino acid, depending on the dose of the acting stress factor. These changes have a similar course, irrespective of the sensitivity of the plants. This indicates that in the sphere of proline metabolism, we are dealing with a qualitatively identical mechanism of plant reactions, irrespective of the type of stress factor and the degree of plant tolerance. However, more sensitive plants respond earlier, at lower concentrations or interactions of the stress factors than do more tolerant plants. The stages referred to above correspond respectively to: 1) defence reactions, 2) unfavourable metabolic changes and 3) degradation processes leading in effect to the death of plants. The active participation of proline in the defence reactions of plants against the injurious effects of stress factors can take place only at relatively low levels of the stress factor, i.e. until the period of rapid increase in the level of this imino acid. On the other hand, excessive levels of free proline accumulation expresses the degree of stress already experienced.

Key words: proline, hydroxyproline, abiotic stress, air pollution, drought, low temperature, high temperature, salinity

Doc. dr hab. Piotr Karolewski, Instytut Dendrologii, Polska Akademia Nauk, ul. Parkowa 5, 62–035 Kórnik

WSTĘP

Bioindykacyjne badania biochemiczne zmierzają do znalezienia czułych i specyficznych wskaźników metabolicznych, których zmiany będą przydatne do oceny wpływu czynników stresowych na środowisko oraz zróżnicowania w tolerancji roślin. W tym kontekście, od szeregu lat, w centrum zainteresowania znajduje się prolina. Zmiany jej poziomu następują pod wpływem wielu czynników stresowych: toksycznych zanieczyszczeń przemysłowych, nadmiernego zakwaszenia, zasolenia, niedoboru i nadmiaru wody, niskiej i wysokiej temperatury. Jest więc wskaźnikiem niespecyficznym co decyduje, że pomiary poziomu wolnej proliny ma-

ją ograniczone zastosowanie w badaniach terenowych, do oceny stopnia wpływu pojedynczego czynnika stresowego. Natomiast zmiany zawartości proliny mogą być z powodzeniem stosowane do oceny różnic w reakcji roślin w doświadczeniach z kontrolowanym wpływem jednego czynnika.

Ukazało się dotychczas kilka przeglądowych prac dotyczących udziału proliny w reakcji roślin na różnego typu stresy [8, 15, 34, 94]. Znaczna część z opisywanych w nich wyników i wniosków jest nadal aktualna i powszechnie uznawana. Pozostaje jednak wiele niejasności co do roli proliny w reakcji roślin na czynniki abiotyczne. Czy wzrost zawartości wolnej proliny związany jest z ochraniającą funkcją tego imi-

nokwasu, a jej poziom jest wskaźnikiem tolerancji, czy odwrotnie – akumulacja proliny jest rezultatem doznanego przez roślinę stresu, a jej poziom odzwierciedla stopień „uszkodzenia” roślin? Jakie są możliwości wykorzystywania pomiarów poziomu wolnej proliny do oceny natężenia wpływu różnych czynników na rośliny oraz zróżnicowania w stopniu wrażliwości roślin? Próby odpowiedzi na te pytania są istotnymi elementami tego artykułu.

POZIOM PROLINY W ROŚLINACH

Badanie wpływu abiotycznych czynników stresowych na poziom proliny u roślin wymaga wzięcia pod uwagę zależności tego poziomu od wielu wewnętrznych (wiek i stadium rozwojowe rośliny) oraz zewnętrznych (temperatura, wilgotność, natężenie światła, żywienie mineralne itp.) czynników środowiska.

Poziom wolnej i związanej z białkami proliny w tkankach różnych organów roślinnych jest zróżnicowany. Na istotną funkcję proliny w procesach wzrostu i rozwoju roślin wskazuje wysoka zawartość wolnej proliny w organach generatywnych, a także w nasionach oraz pączkach, w okresie bezpośrednio poprzedzającym ich rozwój [15, 62, 108]. Na ogół zawartość wolnej proliny kształtuje się następująco: w pyłku > pylnikach > słupkach > liściach. W porównaniu do pyłku jej poziom w liściach, pędach i korzeniach jest stosunkowo niski, a kolejność jest następująca: w łodygach > liściach > korzeniach [6, 75].

W bioindykacji wielkość zmian proliny pod wpływem czynnika stresowego, jest ważniejsza od jej poziomu w określonym organie. Takie czynniki jak niska temperatura, susza i NaCl, powodują na ogół największy wzrost zawartości wolnej proliny w liściach, mniejszy w łodygach, a najmniejszy w korzeniach [90, 105, 95]. W warunkach silnego stresu mogą następować trwałe uszkodzenia tkanek roślin. W takim przypadku zawartość proliny, mierzona w całych organach, jest wypadkową zmian jej poziomu w tkankach z i bez nekroz, a wynik jest zależny od ilości i wielkości nekroz [54].

Liczne badania wskazują, że zawartość wolnej proliny zależy od wieku oraz stadium rozwo-

ju rośliny i jej organów. Rośliny młodsze posiadają wyższą zawartość wolnej proliny w liściach niż starsze, jak również młodsze liście zawierają jej więcej od starszych liści [2, 63, 105, 108]. Zależność pomiędzy wiekiem roślin i poziomem wolnej proliny jest bardziej skomplikowana u roślin w warunkach stresu. Naidu i wsp. [75] sugerują, że przyczyną większej wrażliwości, a przez to wyższej zawartości wolnej proliny, w młodszych niż w starszych roślinach w warunkach suszy, mogą być różnice w głębokości systemów korzeniowych.

Zawartość wolnej proliny w poszczególnych organach roślin uzależniona jest od okresu w sezonie wegetacyjnym. Jej akumulację w pączkach i igłach drzew iglastych obserwowano odpowiednio – wiosną i późnym latem [58, 108]. W czasie spoczynku drzew prolina uczestniczy w magazynowaniu azotu w korzeniach, a wykorzystywana jest na wiosnę przez rozwijające się intensywnie organy [57]. Badając wpływ czynników stresowych na zawartość wolnej proliny należy uwzględnić porę dnia. U *Picea abies*, *P. glauca* i *Pinus sylvestris* poziom proliny w pączkach i korzeniach wykazywał duży wzrost w ciągu prawie całego dnia [25, 108]. Odwrotnie w igłach – obniżenie poziomu proliny występowało przy dużym nasłonecznieniu. Dobowe zmiany w poziomie wolnej proliny uzależnione są od kondycji roślin. Igły drzew uszkodzonych przez zanieczyszczenia przemysłowe w małym stopniu wykazywały słaby wzrost poziomu proliny w godzinach popołudniowych, a mocno uszkodzonych duży, dwukrotnie – po południu i wieczorem [64].

WPŁYW CZYNNIKÓW STRESOWYCH NA POZIOM PROLINY

Ponieważ w pracy zestawiono szereg wyników badań zmian poziomu wolnej proliny pod wpływem zanieczyszczeń przemysłowych (Tabela 1), zasolenia (Tabela 2), suszy (Tabela 3), ten rozdział ograniczono do podania rezultatów badań innych czynników.

Wyniki badań zmian zawartości wolnej proliny na skutek stresu temperaturowego są jednoznaczne. Zarówno wysoka, jak i niska tempera-

Tabela 1. Wpływ zanieczyszczeń przemysłowych na zmiany poziomu wolnej proliny na podstawie wyników doświadczeń przeprowadzonych w warunkach laboratoryjnych (l) i terenowych (t), (d – dzień, t – tydzień, m – miesiąc, ↑ – wzrost, ↓ – obniżenie, „–” – brak zmian, „+” – korelacja dodatnia zawartości proliny ze stopniem tolerancji roślin, „–” – korelacja ujemna, „o” – brak korelacji, Me – toksyczne metale).

Table 1. Influence of industrial pollutants on the change of free proline level on the basis of experiments conducted in laboratory (l) and field (t) conditions, (d – day, t – week, m – month, ↑ – increase, ↓ – decrease, „–” – without change, „+” positive correlation of proline content with degree of plant tolerance, „–” – negative correlation, „o” – no correlation, Me – toxic metals).

Czynnik Factor	Rośliny, Plants		Dawka, Dose		Dośw. Exper.	Prolina, Proline		Literatura References
	Gatunek Species	Organ Organ	Stęż., Conc. (ppm)	Czas Time		Zmiany Changes	Korelacja Correlation	
SO ₂	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Liście — Leaves	0.7	1–72h	l	↓ i ↑		31
SO ₂	<i>Pinus banksiana</i>	Igły — Needles	0.34;0.51	96h	l	↓ ; –		71
SO ₂	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles			t	↑		43
SO ₂	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles	0.4–0.7	10d-5m	t/l	↑		106, 108
SO ₂	<i>Weigela</i>	Liście — Leaves	2.0	12h	l	↑	–	49
SO ₂	<i>Oryza sativa</i>	Liście — Leaves	0.75	4d(2h/d)	l	↑	+	3
SO ₂	<i>Pinus sylvestris</i>	Igły — Needles	0.75	30h	l	↑	–	52
SO ₂	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles	0.034	17 i 22t	l	–		60
SO ₂	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles	0.82	31h	l	–		63
SO ₂ i SO ₂ +O ₃	<i>Picea abies</i> <i>Abies alba</i> <i>Fagus sylvatica</i>	Igły — Needles Igły — Needles Liście — Leaves	0.0074–0.037 0.025-0.09	0.5–24m (7i12 h/d)	t/l	↑ ↑ ↑		10
SO ₂ +O ₃	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles	0.034+0.043	17 i 22t	l	↑		60
SO ₂ +NO ₂	<i>Oryza sativa</i>	Liście — Leaves	0.75+0.3	4d(2h/d)	l	↑	+	3
SO ₂ +NO ₂	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles	0.56+0.21	80h	l	–		63
SO ₂ +NH ₃	<i>Oryza sativa</i>	Liście — Leaves	0.75+10.0	4d(2h/d)	l	↑	+	3
SO ₂ +NO ₂ +NH ₃	<i>Oryza sativa</i>	Liście — Leaves	0.75+0.3 +10.0	4d(2h/d)	l	↑	+	3
NO ₂	<i>Oryza sativa</i>	Liście — Leaves	0.3	4d(2h/d)	l	↑	+	3
NO ₂	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles	1.05	45h	l	–		63
O ₃	<i>Picea abies</i> <i>Abies alba</i> <i>Fagus sylvatica</i>	Igły — Needles Igły — Needles Liście — Leaves	0.025 -0.09	0.5–24m (7i12 h/d)	t/l	↑ ↑ ↑		10
O ₃	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles	0.065	17 i 21 t	l	↑		60
O ₃	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles	0.25	30h	l	–		63
O ₃	<i>Pinus taeda</i> 2rody — Stock	Igły — Needles	0.007–0.116	8m (12h/d)	t/l	–		72
NH ₃	<i>Oryza sativa</i>	Liście — Leaves	10.0	4d(2h/d)	l	↑	+	3
HF	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles			t	↑		43
Cd,Co, Pb,Zn	<i>Cajanus cajan</i> <i>Vigna mungo</i> <i>Triticum aestivum</i>	Liścienie, pędy i korzenie — Cotyledons shoots and roots		10d	l	↓ i ↑		91

Tabela 2. Wpływ zasolenia na zmiany poziomu wolnej proliny. Oznaczenia jak w tabeli 1.

Table 2. Influence of salinity on the change of free proline level. Same symbols as in table 1.

Czynnik Factor	Rośliny, Plants		Dawka, Dose		Dośw. Exper.	Prolina, Proline		Literatura References
	Gatunek Species	Organ Organ	Stęż., Conc. (ppm)	Czas Time		Zmiany Changes	Korelacja Correlation	
NaCl	5 gat. i 3 odm. roślin zielnych — 5 species and 3 varieties of herbs	Łodygi i korzenie — Shoots and roots	0–500	3t	1	↑	–	104
NaCl	<i>Hordeum vulgare</i>	Liście — Leaves		24h	1	↑ i ↓		20
NaCl	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Izolowane komórki — Isolated cells	257	0–10d	1	↑	–	22
NaCl	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Liście — Leaves	1.7–170		t	↑		39
NaCl	<i>Nicotiana tabacum</i>	Izolowane komórki — Isolated cells	0–100		1	↑	+	116
NaCl	<i>Hordeum vulgare</i>	Liście — Leaves	410	0–24h	1	– i ↑		7
NaCl	18 gat. i odmian roślin uprawnych — 18 species and varieties of cultivated plants	Liście, korzenie i łodygi — Leaves roots and stems	0–300	0–7h	1	– i ↑	–	23
NaCl	<i>Nicotiana sylvestris</i>	Izolowane komórki — Isolated cells	0–342	2t	1	↑	+	59
NaCl	<i>Hordeum vulgare</i>	Liście — Leaves	205;410	12h	1	↑		115
NaCl	<i>Hordeum vulgare</i>	Liście — Leaves	205	0–24h	1	↑		102
NaCl	5 gatunków traw — 5 grass species	Liście — Leaves	170	1–11d	1	↑	o	110
NaCl	5 gatunków traw — 5 grass species	Liście — Leaves	342;547;804	2t	1	↑	o	88
NaCl	<i>Melaleuca lanceolata</i>	Liście — Leaves	0;200;500	25d	1	↑		75
NaCl	<i>Nicotiana tabacum</i>	Kalus	100	72h	1	↑ i ↓		27
NaCl	<i>Dolichos biflorus</i> 9 odmian — 9 varieties	Siewki — Seedlings	86;171;257	120h	1	↓	o	77
NaCl	<i>Lycopersion esculentum</i> 3 odm. — 3 varieties i <i>L. pennellii</i>	Liście — Leaves	140	3t	1	↑		82
NaCl+ NH ₄ Cl	<i>Spartina alterniflora</i>	Liście i korzenie — Leaves and roots	0–600+ 0.0025–0.52	0–2m	1	↑		115
NaCl+ KCl	<i>Sesbania bispinosa</i>	Liście i łodygi — Leaves and stems	0;750; 150 0; 7.5;15	6t	1	↑ i ↓		33
KCl	<i>Hordeum vulgare</i>	Liście — Leaves		24h	1	↑ i ↓		20
KCl	18 gat. i odmian roślin uprawnych — 18 species and varieties of cultivated plants	Liście, korzenie i łodygi — Leaves, roots and stems	150	1;2h	1	↑		23
CaCl ₂ , MgCl ₂ , Na ₂ SO ₄	<i>Hordeum vulgare</i>	Liście — Leaves		24h	1	↑ i ↓		20

Tabela 3. Wpływ suszy na zmiany poziomu wolnej proliny (S – susza atmosferyczna, N – niepodlewanie, O – odcięcie, PEG – glikol polietylenowy, Sach – sacharoza, Mann – mannit). Oznaczenia jak w tabeli 1.

Table 3. Influence of drought on the change of free proline level (S – atmospheric drought, N – no watering, O – cutting, PEG – polyethylene glycol, Sach – saccharose, Mann – mannitol). Same symbols as in table 1.

Czynnik Factor	Rośliny, Plants		Czas Time	Dośw. Exper.	Prolina, Proline		Literatura References
	Gatunek Species	Organ Organ			Zmiany Changes	Korelacja Correlation	
N, PEG	<i>Hordeum vulgare</i> 2 odm. — 2 varieties	Liście — Leaves	4d	1 i t	↑	—	35
N	<i>Hordeum vulgare</i> 10 odmian — 10 varieties	Liście — Leaves	5d	1/t	↑	+	68
PEG	<i>Zea mays</i> 6 odmian — 6 varieties	Liście — Leaves Korzenie — Roots	24h	1	↑ ↑	o o	70
N	<i>Picea abies</i>	Igły — Needles	2–4h	1	↑		106
PEG	<i>Cicer arietinum</i>	Liście — Leaves Pędy — Shoots Korzenie — Roots	1–8d	1	↑ ↑ i ↓ ↑ i ↓	— +	96
Mann	<i>Zea mays</i> 2 odmiany — 2 varieties	Siewki — Seedlings	4d	1	↑	+	109
N	<i>Zea mays</i> 4 odmiany — 4 varieties	Liście — Leaves	0–16d	1	↑	—	42
PEG	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Liście — Leaves	10d	1	↑	+	48
O	<i>Solanum</i> 11 kultywarów — 2 varieties	Liście — Leaves	4d	1	↑		112
O, PEG O	<i>Hordeum vulgare</i> <i>Lycopersion esculentum</i>	Liście — Leaves Liście — Leaves	0–32h 0–32h	1 1	↑ ↑	—	103
PEG Sach Mann	<i>Atriplex canescens</i> i <i>Hilaria jamesii</i>	Pędy — Shoots	3d	1	↑ ↑ ↑	o — —	21
Mann	<i>Zea mays</i>	Kalus — Callus	17d	1	↑		24
N	<i>Melaleuca lanceolata</i> <i>Melaleuca uncinata</i>	Liście — Leaves Liście — Leaves Łodygi — Stems Korzenie — Roots	4d 4d	1 1	↑ ↓ ↓ ↑		75
PEG	<i>Brassica napus</i> <i>oleifera</i>	Liście — Leaves Łodygi — Stems Korzenie — Roots	3,7,14,21d	1	↑ ↑ ↑		90
N	<i>Sorghum bicolor</i> 6 linii — 6 lines	Liście — Leaves Liście — Leaves	49d 78d	t 1	↑ ↑	+	98
N	<i>Dolichos biflorus</i>	Liście — Leaves, Łodygi — Stems Korzenie — Roots	7, 14, 21 d	1	↑ i ↓ ↑ i ↓ ↑ i ↓		78
PEG	<i>Hordeum vulgare</i>	Liście — Leaves	1 i 2d	1	↑		74
PEG	<i>Lycopersion esculentum</i> 3 odm. — 3 varieties i <i>L.</i> <i>pennellii</i>	Liście — Leaves	3t	1	↑		82

tura powoduje w roślinach wzrost jej poziomu [19, 62, 112].

Na zawartość proliny istotny wpływ ma poziom makro – i mikroelementów w glebie. Niedobór siarki powoduje wzrost poziomu wolnej proliny [4]. Przyczyną zwiększenia zawartości proliny jest naruszenie równowagi pomiędzy N i S, a przez to intensywniejsza biosynteza związków, w których efektywnie wiązany jest nadmiar azotu. Na zmiany poziomu wolnej proliny wpływa poziom azotu, głównie w formie NH_3 . Jego nadmiar, a szczególnie niedobór, przyczyniał się do akumulacji proliny w igłach, łodygach i korzeniach *Picea glauca* oraz *Pinus banksiana* [26]. Wzrost poziomu proliny powoduje także niedobór Ca, Mg, P, K i Fe [90].

Na poziom wolnej proliny istotnie wpływa światło [58]. Jest on wyższy w liściach rosnących od nasłonecznionej niż zacienionej strony [105]. Akumulacja proliny zachodzi tak na świetle jak i w ciemności, ale jest stymulowana przez światło [36, 47].

Analiza wyników jest złożona, gdy mamy do czynienia z wpływem kilku czynników stresowych. Stwierdzono, że kolejne działanie SO_2 , niskiej temperatury i suszy, powodowało w igłach świerka większy wzrost zawartości wolnej proliny niż powodował to każdy z tych czynników oddzielnie [106, 107]. Ponadto, wielkość zmian poziomu wolnej proliny zależała od kolejności wpływu tych czynników.

Jednoczesne działanie dwu lub więcej czynników może mieć charakter synergistyczny lub neutralizujący. Przykładem synergistycznego oddziaływania są wyniki badań, w których stwierdzono, że działanie SO_2 na sadzonki świerka pospolitego nie wywoływało w igłach istotnych zmian poziomu wolnej proliny, O_3 powodowało 1,5-krotny wzrost, a mieszanina tych gazów zwiększała prawie 6-krotnie jej zawartość [60]. Zwiększenie zawartości wolnej proliny w liściach sadzonek topoli, pod wpływem SO_2 , NaCl i PEG, było wyższe w warunkach podwyższonej (35°C) i obniżonej temperatury (3°C) niż przy optymalnej (15°C) [53]. Jednocześnie, w porównywalnych temperaturach, działanie SO_2 +NaCl i SO_2 +PEG powodowało większy wzrost pozio-

mu proliny, niż którykolwiek z tych czynników działający oddzielnie.

Ponieważ akumulację wolnej proliny u roślin powodują przede wszystkim czynniki wywołujące u nich stres wodny, o wielkości tego wpływu w dużym stopniu decydują: temperatura oraz wilgotność powietrza i gleby [19, 74]. Sugeruje się, że poziom proliny może być wykorzystywany jako wskaźnik stresu wodnego tylko w warunkach, w których nie mamy do czynienia ze zmianą temperatury [105, 112]. Zmiany zawartości wolnej proliny, następujące pod wpływem czynników stresowych, zależą od poziomu azotu. Działanie SO_2 , NO_2 i NH_3 powodowało większy wzrost zawartości proliny przy nadmiernej i niedostatecznej dawce azotu [3]. Również forma N ma wpływ na zawartość proliny. Dodanie do środowiska z NaCl azotu w formie azotanowej obniża [5], a amonowej – podwyższa [5, 17] jej poziom.

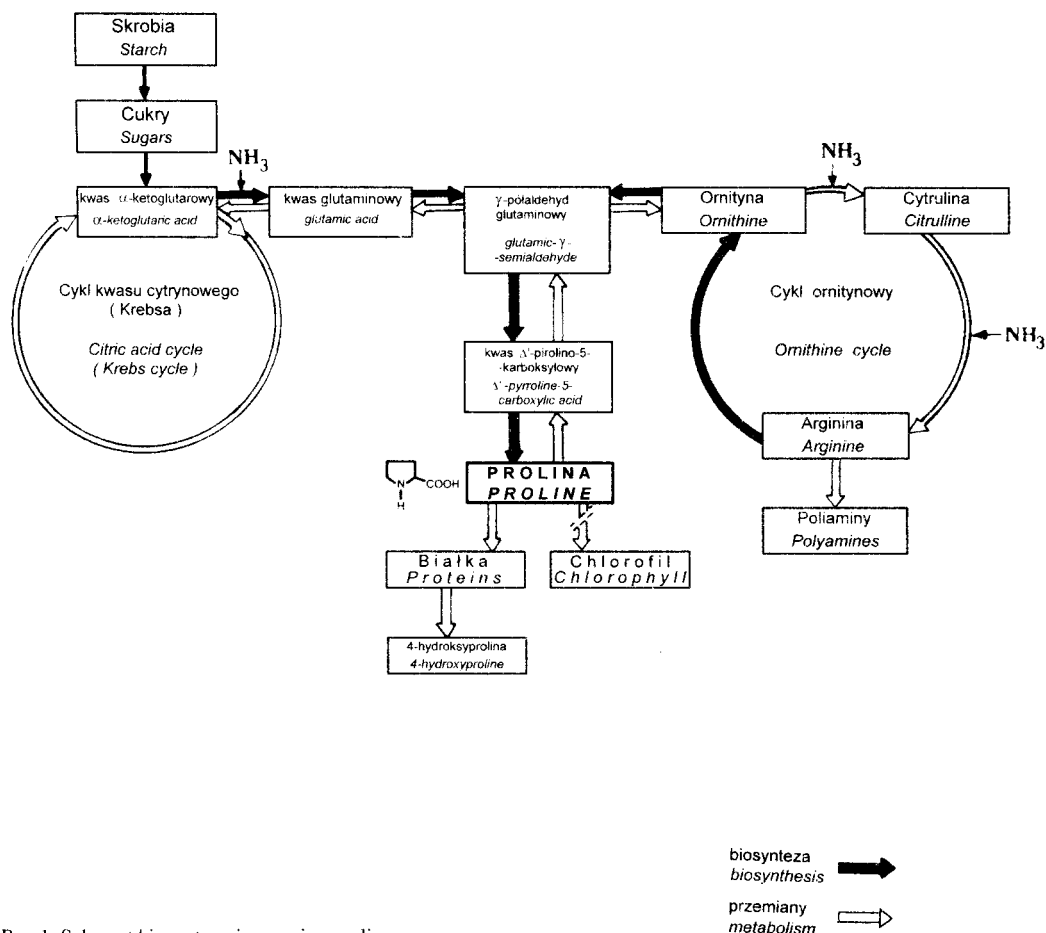
Przytoczone powyżej wyniki badań ukazują, jak wnikliwa musi być znajomość zależności zmian poziomu proliny od wielu czynników, by możliwe było do oceny stopnia wpływu określonego czynnika stresowego i zróżnicowania w reakcji roślin.

BIOSYNTeza I METABOLIZM PROLINY W WARUNKACH STRESU

W warunkach optymalnych oraz stresu o niewielkim natężeniu, możliwa jest kontrola intensywności biosyntezy i dalszych przemian proliny u roślin (Ryc. 1). Przy silnym stresie mamy do czynienia z akumulacją proliny wynikającą z jej niekontrolowanej biosyntezy, ograniczenia utleniania, zahamowania włączania w białka, a nawet uwalniania z białek na skutek proteolizy.

NADMIERNA AKUMULACJA PROLINY

Rozpad skrobi i akumulacja cukrów na skutek wpływu suszy lub wysokiej [30] i niskiej temperatury [73] oraz SO_2 [73], jest przyczyną podwyższenia poziomu α -ketoglutaranu. Ten w reakcji z NH_3 , powstającym także w niekorzystnych warunkach prowadzi, poprzez glutaminy, do podwyższenia zawartości proliny [4,



Ryc.1. Schemat biosyntezy i przemian proliny.

Fig.1. Pathway of biosynthesis and metabolism of proline.

31]. Również zwiększenie poziomu kwasów trójkarboksylowych w roślinach przy deficycie wody jest przyczyną akumulacji proliny [114]. Toksyczne gazy powodują wzrost poziomu glutaminianu tylko przy niedużych ich stężeniach [44]. Przy wyższych stężeniach ma miejsce obniżenie zawartości glutaminianu, a wzrost poziomu proliny [71].

Badania z izotopami prekursorów proliny wykazały, że synteza proliny w liściach jęczmienia pod wpływem stresu wodnego następuje wyłącznie z kwasu glutaminowego [14]. Na in-

tensywną syntezę proliny z glutaminianu u tytoniu, pod wpływem NaCl, wskazują też Kir'yan i Shevyakova [59]. Jednakże autorzy stwierdzili, że u odpornej na NaCl linii akumulacja iminokwasu jest także wynikiem zwiększenia szybkości jego syntezy z argininy → = ornityny. Larher i Petrivalsky [65] twierdzą, że rodzaj czynnika stresowego ma duży wpływ na drogę prowadzącą do akumulacji wolnej proliny.

Wzrost zawartości proliny na skutek stresu wodnego może być spowodowany jednocześnie zwiększeniem jej biosyntezy, jak i zahamowa-

niem procesu utleniania [14]. Autorzy wykazali też, że syntezę proliny limituje etap tworzenia γ -pirolino-5-karboksyalanu z glutaminianu, a nie redukcja γ -pirolino-5-karboksyalanu do proliny. Sells i Koeppe [93] badając izolowane mitochondria pędów kukurydzy stwierdzili, że stres osmotyczny powoduje znaczniejszą inhibicję utleniania proliny niż innych metabolitów. Jednakże przy ponownym uwodnieniu regeneracja utleniania proliny jest większa niż pozostałych substratów. Przy długotrwałym lub silnym stresem wodnym następują uszkodzenia tkanek, którym towarzyszą procesy proteolizy. To jest kolejna przyczyna nagromadzania się nadmiernych ilości wolnej proliny [87].

BIOSYNTeza I DEGRADACJA PROLINY

Enzymy biosyntezy proliny zlokalizowane są w cytoplazmie, a jej utleniania w mitochondriach. Jedną z przyczyn akumulacji proliny w warunkach stresu wodnego jest większa wrażliwość enzymów jej utleniania niż biosyntezy. Enzymy biosyntezy proliny są stosunkowo odporne na nadmiar soli, a nawet wymagają jej dla osiągnięcia maksimum aktywności [94]. Nawet wysoki poziom zasolenia (NaCl, KCl, Na₂SO₄) powoduje aktywację enzymów biosyntezy proliny: syntetazy i dehydrogenazy glutaminianowej oraz reduktazy pirolino-5-karboksyalanowej, a zahamowania aktywności enzymu jej degradacji – dehydrogenazy prolinowej [94, 111]. Także SO₂ powoduje wzrost aktywności dehydrogenazy glutaminianowej, katalizującej redukcję α -ketoglutaranu do glutaminianu [44].

Sugeruje się, że enzymem odpowiedzialnym w największym stopniu za akumulację proliny u roślin w stresie wodnym [45] i zasolenia [41] jest reduktaza pirolino-5-karboksyalanowa. Podkreśla się natomiast hamujący wpływ suszy i NaCl na utlenianie proliny – dużą wrażliwość utleniającej formy reduktazy pirolino-5-karboksyalanowej [13]. W badaniach z mitochondriami kukurydzy wykazano, że inhibicja aktywności oksydazy proliny następuje już przy mniejszym, ujemnym potencjale wodnym niż zaburzone zostają przepuszczalność membran i natężenie oddychania [93].

W normalnych warunkach prolina łatwo

przechodzi przez membramy do mitochondriów, gdzie jest utleniana [15]. Czynniki stresowe powodują zaburzenia w przepuszczalności, a nawet uszkodzanie membran [69]. Na ich działanie bardziej wrażliwe są membrany mitochondriów niż chloroplastów [94].

WŁĄCZANIE PROLINY W BIAŁKA I PROCES HYDROKSYLACJI

Działanie czynników stresowych (SO₂, NaCl) o niewielkim natężeniu, praktycznie nie zmienia poziomu proliny związanej z białkami, natomiast obserwuje się wzrost zawartości hydroksyproliny [49, 95]. Zmiana stosunku prolina:hydroksyprolina na korzyść hydroksyproliny jest zjawiskiem podobnym do zachodzącego w starzejących się tkankach roślin [89].

Zasolenie o dużym stężeniu powoduje zahamowanie włączania proliny w białka [32]. Stwierdza się inhibicję syntezy białek ścian komórkowych i zmiany właściwości fizykochemicznych ścian na etapie glikolizacji i wiązania hydroksyproliny polipeptydów z polisacharydami. Również SO₂ i SO₃²⁻ w większych dawkach powodują spadek poziomu związanej proliny i hydroksyproliny [54, 56].

WPLYW PROLINY NA ZEWNĄTRZ

W warunkach stresu poziom wolnej proliny wzrasta w większym stopniu w nadziemnych częściach roślin niż w korzeniach. Przyczyną tego może być wpływ iminokwasu na zewnątrz. Tesche [106] stwierdził, że działanie SO₂, suszy i niskiej temperatury powoduje u siewek świerka wypływ proliny z korzeni na zewnątrz, na skutek uszkodzenia membran. Podobnie działanie jonów siarczynu na siewki fasoli powoduje wypływ proliny do medium zewnętrznego [56].

WSPÓLNE MECHANIZMY REAKCJI ROŚLIN NA STRES

Ze wzrostem natężenia stresu, obserwuje się początkowo brak lub niewielki wzrost zawartości proliny, następnie gwałtowną akumulację i ostatecznie obniżenie poziomu iminokwasu. Stwierdza się to u różnych gatunków roślin w badaniach z wpływem siarczynu [56], toksycznych metali [91], zasolenia [27, 95], suszy [42,

78] oraz niskiej temperatury [55]. Świadczy to, że w kontekście zmian zawartości wolnej proliny, mamy do czynienia z jednakową reakcją roślin na działanie różnych abiotycznych czynników stresowych. Również zmiany związanej z białkami proliny oraz hydroksyproliny, przebiegają podobnie pod wpływem takich czynników jak SO_3^{2-} [56] i NaCl [95]. Potwierdza to koncepcję niektórych badaczy sugerujących uruchamianie przez rośliny zintegrowanych fizjologiczno-biochemicznych mechanizmów przeciwstawiania się wpływowi różnego typu stresów [18, 46].

FIZJOLOGICZNA ROLA PROLINY W ROŚLINACH

ADAPTACJA ROŚLIN DO WARUNKÓW STRESOWYCH

Zwiększona zawartość wolnej proliny jest uważana za przejaw adaptacji roślin do warunków zasolenia [59, 116, 111], wpływu toksycznych gazów [3, 61] oraz suszy [68, 116]. Wskazuje się też, że jest ona związana z ekspresją odpowiedzialnych za nią genów [116, 66] i przejawia się produkowaniem białek odpornościowych, zawierających duże ilości proliny i hydroksyproliny [28, 97].

Udział proliny w procesach adaptacji roślin do warunków stresu wodnego może polegać także na redukcji zakwaszenia [113]. To w dużym stopniu wyjaśniałoby udział proliny w adaptacji roślin nie tylko do warunków suszy i niskiej lub wysokiej temperatury, ale i do toksycznych gazów o charakterze kwasowym.

Część badaczy uważa, że prolina nie uczestniczy w procesach adaptacyjnych, lecz wzrost jej poziomu odzwierciedla stopień doznanego przez roślinę stresu. Ich wyniki nie zaprzeczają jednak hipotezie o udziale proliny w procesach adaptacyjnych, gdyż na ogół dotyczą działania stresu w bardzo dużym jego natężeniu.

AKTYWNE PROCESY OBRONNE ROŚLIN PRZED SKUTKAMI STRESU

O udziale proliny w przeciwstawianiu się wpływowi niekorzystnych czynników świadczą wyniki badań, w których rośliny traktowano tym

iminokwasem. Powodowało to podwyższenie progu ich tolerancji na SO_2 [50], NaCl [59, 9], niską [112, 38] i wysoką [62] temperaturę. Jednakże stosując prolinę w zbyt dużym stężeniu uzyskano ujemny skutek [59]. Wskazuje to, że prolina pełni ochraniającą funkcję, ale tylko do określonego poziomu.

Za podstawową, ochraniającą funkcję wolnej proliny u roślin uważana jest osmotyczna regulacja uwodnienia komórek. Sądzi się, że geny odpowiedzialne za osmotyczną tolerancję sterują produkcją takich cząsteczek jak prolina i betaina [66]. Przy wysokim zasoleniu podłoża, prolina funkcjonuje u roślin jako efektywny wewnątrzkomórkowy osmotyk [101]. Rozpuszczona w cytoplazmie prolina działa jako substancja równoważąca nadmiar soli na zewnątrz cytoplazmy [115]. Udział proliny w osmoregulacji zależy od gatunku roślin. W badaniach wpływu zasolenia u 5 gatunków traw wykazano, że u 3 z nich prolina pełni rolę głównego, organicznego osmoregulatora, a u pozostałych jest substancją współuczestniczącą w osmoregulacji i funkcję tę pełnią inne substancje [88]. Część badaczy bardziej stanowczo neguje udział proliny w procesach osmoregulacji. Sugerują oni, że w porównaniu do cukrów, kwasów organicznych i związków nieorganicznych, wolna prolina posiada znikomy udział we wpływie na obniżenie potencjału osmotycznego u roślin będących pod działaniem NaCl i PEG [82].

Prolina stanowi również ochronę dla różnego typu struktur białkowych komórek. Tworzy z wodą agregaty, które są zdolne łączyć się z hydrofobowymi grupami funkcyjnych białek i przez obniżenie ich hydrofobowości powoduje zwiększenie ich stabilności [92]. Ponadto, prolina stabilizuje enzymy przed denaturacyjnym wpływem wolnych rodników, powstających w czasie stresu [99]. Ochraniające działanie proliny na elementy białkowe enzymów jest uważane za główny mechanizm w przeciwdziałaniu przed ich dezaktywacją lub destrukcją [79, 85]. Wykazano, że prolina posiada ochraniające działanie przed wpływem wysokiej temperatury na enzymy mitochondrialne (dehydrogenazę izocytrynianową i jabłczanową oraz fumarazę) [76]. Mechanizm ten polega prawdopodobnie na

utrzymywaniu konformacji białka, korzystnej dla aktywności enzymu [83]. Prolina w cytoplazmie stabilizuje struktury białkowe także przed denaturacją na skutek stresu wodnego [84]. Stopień ochrony był tym większy, im w medium zawierającym proteiny stężenie prolina było wyższe. Ochrona składników białkowych przed denaturacją jest jednym z elementów zabezpieczających membrany. W badaniach z egzogenną proliną wykazano, że ma ona stabilizujący wpływ na membrany podczas stresu wywołanego niską temperaturą [37].

Stosunkowo dobrze poznana jest możliwość udziału prolina w biosyntezie i odbudowie chlorofilu u roślin w warunkach wpływu suszy [15] i toksycznych gazów [51]. W badaniach z SO_2 u topoli wykazano jednak, że utrzymywanie stałego poziomu chlorofilu ma miejsce tylko do momentu akumulacji wolnej prolina [50].

Prolina jest głównym aminokwasem u drzew w stanie spoczynku [25, 57]. Chociaż jej węgiel jest wbudowywany w szkielety węglowe wielu związków, to nie stanowi efektywnego składnika magazynującego węgiel (C:N = 5:1) [34]. Jest natomiast istotnym, zapasowym źródłem azotu w metabolizmie roślin [16]. Wykazano to w badaniach z ^{14}N u siewek soi w warunkach stresu wodnego [29]. Głównie jest ona donorem grup aminowych [86].

Przed wszystkim jednak wolna prolina stanowi zapasowe źródło energii [12, 40]. W odróżnieniu od braku zmian poziomu innych osmoprotektantów, po ustąpieniu stresu zasolenia [17] lub suszy [98] zawartość prolina szybko obniża się. Stewart [100] wykazał, że gdy poziom węglowodanów był duży, obniżenie to było niewielkie, a prolina była przekształcana głównie w prolinę białkową. Natomiast przy niskim poziomie węglowodanów prolina w dużym stopniu była utleniana aż do CO_2 . Stymulację oddychania komórek uzyskano też w doświadczeniach z egzogenną proliną [15, 86].

Prolina pełni jeszcze inną ważną rolę, mającą największe znaczenie w ekstremalnych warunkach stresu. Gdy zachodzą już proteoliza i dezaminacja, następuje w tkankach wydzielanie toksycznego amoniaku. Wykazano to w przypadku wpływu suszy [87] i SO_2 [31]. W neutra-

lizacji nadmiaru amoniaku u roślin, w warunkach zasolenia, uczestniczy szereg aminokwasów, wśród których przeważają prolina i arginina [5]. Akumulacja wolnej prolina przyczynia się do neutralizacji amoniaku także u roślin w warunkach suszy [87] i niskiej temperatury [67]. Jednocześnie nawet duży nadmiar prolina nie jest szkodliwy, ze względu na jej obojętność względem wielu enzymów w komórkach roślinnych [80].

PROLINA W ROŚLINACH JAKO WSKAŹNIK WRAŻLIWOŚCI NA STRES

Najwięcej kontrowersji budzą wnioski z badań wpływu czynników stresowych na poziom wolnej prolina u roślin o różnym stopniu wrażliwości. W zależności od stopnia tolerancji roślin i poziomu akumulacji iminokwasu, autorzy sugerują ochraniającą rolę prolina [59, 68, 112], negują ją [35, 70, 96] lub twierdzą, że wyraża ona tylko wielkość doznanego przez roślinę stresu [22, 104]. Tego typu badania opierają się często na stosowaniu tylko jednej dawki czynnika stresowego lub więcej dawek, ale tylko dwu odmian roślin. Za miarę wrażliwości przyjmowane są najczęściej przeżywalność lub wielkość widocznych objawów uszkodzeń (chlorozy, nekrozy), lub stopień zahamowania ich wzrostu. Takie objawy występują tylko w warunkach silnego stresu u roślin. Akumulacja wolnej prolina jest wówczas tym większa, im bardziej „uszkodzone” są rośliny na skutek wpływu: suszy [42], suszy i niskiej temperatury [11], wysokiej i niskiej temperatury [19], SO_2 , NO_2 , HF [52] oraz metali [91].

Dowodem na to, że wolna prolina jest wskaźnikiem doznanego przez roślinę stresu są wyniki badań z gatunkami roślin o różnych wymaganiach termicznych. Öztürk i Szaniawski [81] wykazali, że podnoszenie temperatury indukuje stres i powoduje wzrost prolina w korzeniach i liściach owsa, natomiast u ciepłolubnego gatunku – kukurydzy, zachodzą identyczne zmiany wraz z jej obniżaniem.

Niejednokrotnie autorzy wysuwali wnioski w oparciu o średnie [110], maksymalne [1] lub przeprowadzone dopiero po kilku dniach trwa-

nia silnego stresu [98] pomiary zawartości proliny. Nie pozwalało to na określenie przebiegu zmian poziomu iminokwasu. Natomiast Dreier [23] wykazał, że do oceny stopnia wrażliwości roślin niezbędne jest określenie momentu, od którego zaczyna się akumulacja iminokwasu. Następuje ona tym szybciej im rośliny są bardziej wrażliwe. Potwierdza się to w badaniach nad wpływem NaCl [22, 95], siarczynu [56] oraz niskiej temperatury [55].

PODSUMOWANIE

Analiza wyników badań przytoczonych w tej pracy pozwala na postawienie hipotezy, że możliwy jest zarówno udział proliny w procesach adaptacyjnych i obronnych, jak i jej nadmierna akumulacja może wyrażać wielkość doznanego przez roślinę stresu. W celu określenia zróżnicowania w reakcji roślin na dany czynnik stresowy, należy przeanalizować zmiany poziomu wolnej proliny lub przynajmniej określić moment rozpoczęcia intensywnej akumulacji iminokwasu. W badaniach terenowych nie ma takiej możliwości. Jednak przytoczone wcześniej wyniki wskazują, że gdy wystąpiły już widoczne uszkodzenia, wzrost poziomu wolnej proliny odzwierciedla stopień doznanego przez roślinę stresu. Oceniając wielkość wpływu czynnika stresowego, nawet w tym samym miejscu i u tych samych roślin, należy jednak uwzględnić interakcję z innymi czynnikami, zmienność związaną z wiekiem, stadium rozwoju roślin itp.

Na podstawie analizy wyników badań, przedstawionych w tej publikacji można stwierdzić, że:

1. Ochraniająca rola proliny ma miejsce przy niewielkim natężeniu stresu, gdy możliwe jest wykorzystywanie jej do syntezy białek, chlorofilu lub w przemianach związanych z uzyskiwaniem energii.

2. Działanie różnych, abiotycznych czynników stresowych powoduje u roślin podobne zmiany poziomu wolnej proliny, kolejno: niewielki wzrost, dużą akumulację i obniżenie. Jest to niezależne od typu czynnika stresowego i stopnia wrażliwości roślin. Jednak im rośliny są

bardziej wrażliwe, tym zmiany te następują przy niższym natężeniu stresu.

3. Akumulacja wolnej proliny jest wskaźnikiem stopnia doznanego przez roślinę stresu – przebiegu procesów przyspieszonego dojrzewania i starzenia się, a obniżenie jej poziomu charakteryzuje rozkład tkanek.

4. Jednoczesne działanie kilku czynników stresowych powoduje większą akumulację wolnej proliny, niż każdy z nich oddzielnie.

5. Istnieje zróżnicowanie w poziomach wolnej proliny i związanych w białkach proliny i hydroksyproliny, w zależności od rodzaju „uszkodzenia” tkanek liści: nekroz i wizualnie zdrowych części.

6. Wykorzystywanie w badaniach terenowych pomiarów zawartości wolnej proliny w celach diagnostycznych jest mało przydatne ze względu na małą specyficzność iminokwasu. Natomiast duża czułość zmian zawartości proliny na czynniki stresowe preferuje ten związek do stosowania w badaniach kontrolowanego wpływu danego czynnika i do oceny zróżnicowania w reakcji roślin. Wymaga to jednak wyznaczania momentu rozpoczęcia się akumulacji iminokwasu.

LITERATURA

- [1] ALONI B., ROSENSHTEIN G. 1984. Proline accumulation: A parameter for evaluation of sensitivity of tomato varieties to drought stress. *Physiol. Plant.* **61**: 231–235.
- [2] AMBERGER-OCHSENBAUER S., OBENDORFER J. 1988. Levels of free proline in ornamental plants: I. Influence of plant age, leaf age, and leaf region in *Saintpaulia* and *Chrysanthemum*. *J. Plant Physiol.* **132**: 758–761.
- [3] ANBAZHAGAN M., KRISHNAMURTHY R., BHAGWAT K. A. 1988. Proline: an enigmatic indicator of air pollution tolerance in rice cultivars. *J. Plant Physiol.* **133**: 122–123.
- [4] ARUTYUNOVA N. V., SHEVYAKOVA N. I. 1982. Osobennosti azotnogo obmena *Arachis hypogaea* L. pri deficite sery i zasolenii. *Izv. Akad. Nauk SSSR ser. biol.* **4**: 615–620.
- [5] ARUTYUNOVA N. V., SHEVYAKOVA N. I. 1983. Rol' istocznika azota v povyszenii soleustojczivosti *Arachis hypogaea* L. *Izv. Akad. Nauk SSSR ser. biol.* **6**: 863–870.
- [6] ASPINALL D., PARAMESWARAN K. V.M., GRAHAM R. D. 1983. Proline accumulation in grains, floral organs and flag leaves of wheat and barley in response to va-

- riations in water and nitrogen supply. *Irrig. Sci.* **4**: 157–166.
- [7] BADZINSKI BUHL M., STEWART C. R. 1983. Effects of NaCl on proline synthesis and utilization in excised barley leaves. *Plant Physiol.* **72**: 664–667.
- [8] BANDURSKA H. 1991. Akumulacja wolnej proliny jako przejaw metabolicznej reakcji roślin na działanie stresu wodnego. *Wiad. Bot.* **35**: 35–46.
- [9] BAL A. B. 1976. Salinity tolerance through seed treatment with proline. *Biol. Plant.* **18**: 227–229.
- [10] BENDER J., JÄGER H.-J., SEUFERT G., ARNDT U. 1986. Untersuchungen zur Einzel- und Kombinationswirkung von SO₂ und O₃ auf den Stoffwechsel von Waldbäumen in Open-top-Kammern. *Angew. Botanik* **60**: 461–479.
- [11] BIRYUKOVA Z. P., CHARLAMOVA N. V. 1981. Geograficzeskaja izmenczivost' zasuchoustojczivosti i zimostojkosti sosny obyknovennoj. *Ekologija* **4**: 42–47.
- [12] BOGGESE S. F., KOEPPE D. E., STEWART C. R. 1978. Oxidation of proline by plant mitochondria. *Plant Physiol.* **62**: 22–25.
- [13] BOGGESE S. F., PALEG L. G., ASPINAL D., 1975. Δ^1 -Pyrroline-5-carboxylic acid dehydrogenase in barley, a proline – accumulating species. *Plant Physiol.* **56**: 259–262.
- [14] BOGGESE S. F., STEWART C. R., ASPINAL D., PALEG L. G. 1976. Effect of water stress on proline synthesis from radioactive precursor. *Plant Physiol.* **58**: 398–401.
- [15] BRITIKOV E. A. 1975. Biologičeskaja rol' prolina. Nauka, Moskva, ss. 88.
- [16] BRITIKOV E. A., SCHRAUWEN J., LINSKENS H. F. 1970. Proline as a source of nitrogen in plant metabolism. *Acta Bot. Neerl.* **19**: 515–520.
- [17] CAVALIERI A. J. 1983. Proline and glycinobetaine accumulation by *Spartina alterniflora* Loisel. in response to NaCl and nitrogen in a controlled environment. *Oecologia (Berl.)* **57**: 20–24.
- [18] CHAPIN F. S. 1991. Integrated response of plant to stress. *BioScience* **41**: 29–36.
- [19] CHU T. M., ASPINALL D., PALEG L. G. 1974. Stress metabolism. VI. Temperature stress and the accumulation of proline in barley and radish. *Aust. J. Plant Physiol.* **1**: 87–97.
- [20] CHU T. M., ASPINALL D., PALEG L. G. 1976. Stress metabolism. VII. Specific ion effects on proline accumulation in barley. *Aust. J. Plant Physiol.* **3**: 503–511.
- [21] CRESS W. A., JOHNSON G. V. 1987. The effect of three osmotic agents on free proline and amino acid pools in *Atriplex canescens* and *Hilaria jamesii*. *Can. J. Bot.* **65**: 799–801.
- [22] DIX P. J., PEARCE R. S. 1981. Proline accumulation in NaCl-resistant and sensitive cell lines of *Nicotiana sylvestris*. *Z. Pflanzenphysiol.* **102**: 243–248.
- [23] DREIER W. 1983. La teneur en proline et la résistance des plantes aux sels. *Biol. Plant.* **25**: 81–87.
- [24] DUNCAN D. R., WIDHOLM J. M. 1987. Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerative maize callus. *Plant Physiol.* **83**: 703–708.
- [25] DURZAN D. J. 1968. Nitrogen metabolism of *Picea glauca*. II. Diurnal changes of free amino acids, amides, and guanidino compounds in roots, buds, and leaves during the onset of dormancy of white spruce saplings. *Can. J. Bot.* **46**: 921–928.
- [26] DURZAN D. J., STEWARD F. C. 1967. The nitrogen metabolism of *Picea glauca* (Moench) Voss and *Pinus banksiana* Lamb. as influenced by mineral nutrition. *Can. J. Bot.* **45**: 695–710.
- [27] EBERHARDT H.-J., WEGMANN K. 1989. Effects of abscisic acid and proline on adaptation of tobacco callus cultures to salinity and osmotic shock. *Physiol. Plant.* **76**: 283–288.
- [28] ERICSON M. C., ALFINITO S. H. 1984. Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. *Plant Physiol.* **74**: 506–509.
- [29] FUKUTAKU Y., YAMADA Y. 1984. Source of proline nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). II. Fate of ¹⁵N-labelled protein. *Physiol. Plant.* **61**: 622–628.
- [30] GENKEL' P. A. 1982. Principy i napravlenie issledovanij po povyszeniju i diagnostike žaro – i zasuchoustojczivosti restenij. *Sel'skochozjajstvennaja biologija* **17**: 157–166.
- [31] GODZIK S., LINSKENS H. F. 1974. Concentration changes of free amino acids in primary bean leaves after continuous and interrupted SO₂ fumigation and recovery. *Environ. Pollut.* **7**: 25–38.
- [32] GOLAN-GOLDHIRSH A., HANKAMER B., LIPS S. H. 1990. Hydroxysproline and proline content of cell walls of sunflower, peanut and cotton under salt stress. *Plant Sci.* **69**: 27–32.
- [33] GORHAM J., TOMAR O. S., WYN J. R. G. 1988. Salinity-induced changes in the chemical composition of *Leucaena leucocephala* and *Sesbania bispinosa*. *J. Plant Physiol.* **132**: 678–682.
- [34] HANSON A. D., HITZ W. D. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**: 163–203.
- [35] HANSON A. D., NELSON C. E., EVERSON E. H. 1977. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. *Crop Science* **17**: 720–726.
- [36] HANSON A. D., TULLY R. E. 1979. Light stimulation of proline synthesis in water-stressed barley leaves. *Planta* **145**: 45–51.
- [37] HEBER U., TYANKOVA L., SANTARIUS K. A. 1971. Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids. *Biochem. Biophys. Acta* **241**: 578–592.
- [38] HELLERGREN J., LI P. H. 1981. Survival of *Solanum tuberosum* suspension cultures to –14°C: The mode of action of proline. *Physiol. Plant.* **52**: 449–453.
- [39] HÖLLWARTH M. 1981. Physiologische Reaktionen in Pflanzen städtischer Standorte unterschiedlicher Immissionsbelastung. *Angew. Botanik* **55**: 21–27.
- [40] HSIAO T. C. 1973. Plant response to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **24**: 519–570.
- [41] HUBER W. 1974. Über den Einfluss von NaCl – oder Abscisinsäurebehandlung auf den Proteinmetabolismus und einige weitere Enzyme des Aminosäure-

- stoffwechsels in Keimlingen von *Pennisetum typhoides*. *Planta* **121**: 225–235.
- [42] ILAHI I., DÖRFFLING K. 1982. Changes in abscisic acid and proline levels in maize varieties of different drought resistance. *Physiol. Plant.* **55**: 129–135.
- [43] JÄGER H.-J., GRILL D. 1975. Einfluss von SO₂ und HF auf freie Aminosäuren der Fichte (*Picea abies* L./Karsten). *Eur. J. For. Path.* **5**: 279–286.
- [44] JÄGER H.-J., PAHLICH E. 1972. Einfluss von SO₂ auf den Aminosäurestoffwechsel von Erbsenkeimlingen. *Oecologia* **9**: 135–140.
- [45] JÄGER H.-J., PAHLICH E. 1980. Ursache und Bedeutung der Prolinakkumulation in Pflanzen unter Wasserstress. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie* **8**: 469–470.
- [46] JONES H. G. 1978. How plants respond to stress. *Nature* **271**: 610.
- [47] JOYCE P. S., PALEG L. G., ASPINALL D. 1985. The requirement of low intensity light in the accumulation of proline as a response to water deficit. *J. Exp. Bot.* **35**: 209–218.
- [48] KAPUYA J. A., BARENDSE G. W.M., LINSKENS H. F. 1985. Water stress tolerance and proline accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Acta Bot. Neerl.* **34**: 293–300.
- [49] KAROLEWSKI P. 1984. Influence of SO₂ on changes in the content of proline and hydroxyproline in the leaves of rooted *Weigela* cuttings. *Acta Soc. Bot. Pol.* **53**: 237–245.
- [50] KAROLEWSKI P. 1985. The role of free proline in the sensitivity of poplar (*Populus* 'Robusta') plants to the action of SO₂. *Eur. J. For. Path.* **15**: 199–206.
- [51] KAROLEWSKI P. 1989. Wpływ zanieczyszczeń przemysłowych na procesy fizjologiczne i metabolizm roślin. W: S. Białobok (red.), *Życie drzew w skażonym środowisku*, PWN, Poznań, s. 273–339.
- [52] KAROLEWSKI P. 1989. Free proline content of 18 European provenances of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and their susceptibility to the action of SO₂, NO₂ and HF. *Folia dendrologica* **16**: 365–382.
- [53] KAROLEWSKI P. 1989. Free proline content and susceptibility of poplar (*Populus*) cuttings to the action of SO₂, NaCl, and PEG at different temperatures. *Environ. Pollut.* **57**: 307–315.
- [54] KAROLEWSKI P. 1990. Visible and invisible injury to Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) needles caused by sulphur dioxide. *Arbor. Kórnickie* **35**: 127–136.
- [55] KAROLEWSKI P., PUKACKI P. 1995. Free proline as an indicator of sensitivity of Norway spruce (*Picea abies* L./Karst.) to low temperature. *Arbor. Kórnickie* **40**: 159–167.
- [56] KAROLEWSKI P., SHEVYAKOVA N. I. 1990. Effect of sulphite ions on the proline and polyamine content in the bean *Phaseolus vulgaris*. *Acta Soc. Bot. Pol.* **59**: 55–64.
- [57] KATO T. 1986. Nitrogen metabolism and utilization in citrus. *Hort. Rev.* **8**: 181–216.
- [58] KIM Y. T., GLERUM C. 1995. Seasonal free amino acid fluctuations in red pine and white spruce needles. *Can. J. For. Res.* **25**: 697–703.
- [59] KIR'YAN I. G., SHEVYAKOVA N. I. 1984. Puti nakopleniya svobodnogo prolina u NaCl-rezistentnoj kletocznoj linii *Nicotiana sylvestris*. *Fiziol. Rast.* **31**: 712–720.
- [60] KLUMPP G., GUDERIAN R., KÜPPERS K. 1989. Peroxidase – und Superoxiddismutase-Aktivität sowie Prolinegehalte von Fichtennadeln nach Belastung mit O₃, SO₂ und NO₂. *Eur. J. For. Path.* **19**: 84–97.
- [61] KRISHNAMURTHY R., ANBAZHAGAN M., BHAGWAT K. A. 1987. Accumulation of free amino acids and distribution of Na⁺, Cl⁻ and K⁺ in rice varieties exposed to NaCl stress. *Indian J. Plant Physiol.* **30**: 183–188.
- [62] KUO C. G., CHEN H. M., MA L. H. 1986. Effect of high temperature on proline content in tomato floral buds and leaves. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **111**: 746–750.
- [63] LALK I., HARTMANN A., DÖRFFLING K. 1992. Wirkung kurzzeitiger Schadgas-Expositionen (SO₂, NO₂, O₃) auf geklonte Jungfichten im Simulationsexperiment. W: W. Michaelis, J. Bauch (red.), *Luftverunreinigungen und Waldschäden am Standort „Postturm“*, Forstamt Farchau/Ratzeburg., GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, GKSS 92/E/100, s. 309–340.
- [64] LALK I., NAUMANN R., LUDEWIG M., FENNER R., DÖRFFLING K. 1992. Stressphysiologische Untersuchungen an Freilandfichten des Standortes „Postturm“. W: W. Michaelis, J. Bauch (red.), *Luftverunreinigungen und Waldschäden am Standort „Postturm“*, Forstamt Farchau/Ratzeburg., GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH, GKSS 92/E/100, s. 93–118.
- [65] LARHER F., PETRIVALSKY M. 1992. Rape leaf discs: a tool for the study of the stress induced proline syndrome. *Physiol. Plant.* **85** Part 2, ss. 77.
- [66] LE RUDULIER D., STROM A. R., DANDEKAR A. M., SMITH L. T., VALENTINE R. C. 1984. Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064–1068.
- [67] LEVITT J. 1972. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York, London, ss. 697.
- [68] LEWIN L. G., SPARROW D. H.B., ASPINALL D. 1978. Proline accumulation and drought resistance in barley. *P. B.A.* **48**: Abstr. 7323.
- [69] LIEN R., ROGNES S. E. 1982. Salt effects on amino acid transport into barley leaf cells. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **177**: 54–60.
- [70] LUXOVÁ M., GAŠPARIKOVÁ O., PŠENÁKOVÁ T., POLEREČKÝ O. 1979. Inhibícia rastu a akumulácia prolínu v kličiacich rastlinách imbreďných liní kukurice ako reakcia na osmotický stres. *Rostl. Výroba* **25**: 1215–1224.
- [71] MALHOTRA S. S., SARKAR S. K. 1979. Effect of sulphur dioxide on sugar and free amino acid content of pine seedlings. *Physiol. Plant.* **47**: 223–228.
- [72] MANDERSCHIED R., JÄGER H.-J., KRESS L. W. 1992. Effects of ozone on foliar nitrogen metabolism of *Pinus taeda* L. and implications for carbohydrate metabolism. *New Phytol.* **121**: 623–633.
- [73] MICHAEL G., FEILER S., RANFT H., TESCHE M. 1982. Der Einfluss von Schwefeldioxid und Frost auf Fichten (*Picea abies* L./Karst.). *Flora* **172**: 317–326.
- [74] NAIDU B. P., ASPINALL D., PALEG L. G. 1992. Variability in proline-accumulating ability of barley (*Horde-*

- um vulgare* L.) cultivars induced by vapor pressure deficit. *Plant Physiol.* **98**: 716–722.
- [75] NAIDU B. P., JONES G. P., PALEG L. G., POLJAKOFF-MAYBER A. 1987. Proline analogues in *Melaleuca* species: Response of *Melaleuca lanceolata* and *M. uncinata* to water stress and salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* **14**: 669–677.
- [76] NASH D., PALEG L. G., WISKICH J. T. 1982. Effect of proline, betaine and some other solutes on the heat stability of mitochondrial enzymes. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**: 47–57.
- [77] NIGWEKAR A. S. 1990. Germination performance of horsegram (*Dolichos biflorus* L.) under saline conditions. *Biovigyanam* **16**: 108–112.
- [78] NIGWEKAR A. S., CHAVAN P. D. 1990. The effect of water stress on nitrogen metabolism *Dolichos biflorus* L. *Acta Soc. Bot. Pol.* **59**: 73–80.
- [79] NIKOLOPOULOS D., MANETAS Y. 1991. Compatible solutes and in vitro stability of *Salsola soda* enzymes: proline incompatibility. *Phytochem.* **30**: 411–413.
- [80] OAKS A., MITCHELL D. J., BARNARD R. A., JOHNSON F. J. 1971. The regulation of proline biosynthesis in maize roots. *Can. J. Bot.* **48**: 2249–2258.
- [81] ÖZTÜRK M., SZANIAWSKI R. K. 1981. Root temperature stress and proline content in leaves and roots of two ecologically different plant species. *Z. Pflanzenphysiol.* **102**: 375–377.
- [82] PÉREZ-ALFOCEA F., ESTAÑ M. T., CARO M., GUERRIER G. 1993. Osmotic adjustment in *Lycopersion esculentum* and *L. pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses. *Physiol. Plant.* **87**: 493–498.
- [83] PALEG L. G., DOUGLAS T. J., VAN DAAL A., KEECH D. B. 1981. Proline, betaine and other organic solutes protect enzymes against heat inactivation. *Aust. J. Plant Physiol.* **8**: 107–114.
- [84] PALEG L. G., STEWART G. R., BRADBEER J. W. 1984. Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiol.* **75**: 974–978.
- [85] PALEG L. G., STEWART G. R., STARR R. 1985. The effect of compatible solutes on proteins. *Plant and Soil* **89**: 83–94.
- [86] PÁLFI G., KÖVES E., BITÓ M., SEBESTYÉN R. 1974. The role of amino acids during water-stress in species accumulating proline. *Phyton* **32**: 121–127.
- [87] PROCENKO D. F., SHMATKO I. G., RUBANJUK E. A. 1968. Ustojczivosť ozimých pszeníc k zasuche v svyazi z ich aminokislótnym sostavom. *Fiziol. Rast.* **15**: 680–688.
- [88] PULICH W. M. JR. 1986. Variations in soluble amino acids and ammonium content in subtropical seagrasses related to salinity stress. *Plant Physiol.* **80**: 283–286.
- [89] RIDGE I., OSBORNE D. J. 1971. Role of peroxidase when hydroxyproline-rich protein in plant cell wall is increased by ethylene. *Nature New Biology* **229**: 205–208.
- [90] ROGOZIŃSKA J., FLASIŃSKI S. 1987. The effect of nutrient, salt and osmotic stresses on proline accumulation in oilseed rape plants. *Acta Physiol. Plant.* **9**: 61–68.
- [91] SARADHI A., SARADHI P. P. 1991. Proline accumulation under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* **138**: 554–558.
- [92] SCHOBERT B., TSCHESCHE H. 1978. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Bioch. Biophys. Acta* **541**: 270–277.
- [93] SELLS G. D., KOEPE D. E. 1981. Oxidation of proline by mitochondria isolated from water-stressed maize shoots. *Plant Physiol.* **68**: 1058–1063.
- [94] SHEVYAKOVA N. I. 1983. Metabolizm i fiziologičeskaja rol' prolina v rastenijach pri vodnom i solevom stresse. *Fiziol. Rast.* **30**: 768–783.
- [95] SHEVYAKOVA N. I., KAROLEWSKI P. 1994. K voprosu o mechanizmach otvetnyh reakcij na zasolenije razlicnyh po soleustojczivosti sortov fasoli. *Sel'skochozjajstvennaja biologija* **1**: 84–88.
- [96] SING G., RAI K. 1981. Free proline accumulation and drought resistance in *Cicer arietinum* L. *Biol. Plant.* **23**: 86–90.
- [97] SINGH N. K., HANDA A. K., HASEGAWA P. M., BRESAN R. A. 1985. Proteins associated with adaption of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* **79**: 126–137.
- [98] SIVARAMAKRISHNAN S., PATELL V. Z., FLOWER D. J., PEACOCK J. M. 1988. Proline accumulation and reductase activity in contrasting sorghum lines during mid-season drought stress. *Physiol. Plant.* **74**: 418–426.
- [99] SMIRNOFF N., CUMBES P. J. 1989. Hydroxy radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem.* **28**: 1057–1060.
- [100] STEWART C. R. 1972. Proline content and metabolism during rehydration of wilted excised leaves in the dark. *Plant Physiol.* **50**: 679–681.
- [101] STEWART C. R., LEE J. A. 1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta* **120**: 279–289.
- [102] STEWART C. R., VOETBERG G. 1985. Relationship between stress-induced ABA and proline accumulations and ABA-induced proline accumulation in excised barley leaves. *Plant Physiol.* **79**: 24–27.
- [103] STEWART C. R., VOETBERG G. 1987. Absciscic acid accumulation is not required for proline accumulation in wilted leaves. *Plant Physiol.* **83**: 747–749.
- [104] STOREY R., WYN J. R. G. 1975. Betaine and choline levels in plant and their relationship to NaCl stress. *Plant Sci. Lett.* **4**: 161–168.
- [105] SYVERTSEN J. P., SMITH JR. M. L. 1983. Environmental stress and seasonal changes in proline concentration of citrus tree tissues and juice. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **108**: 861–866.
- [106] TESCHE M. 1979. Wirkungen von Umweltstress auf Fichten. UNESCO-MAB/IUFRO Symposium *Stability of spruce forest ecosystems*, Brno, June 21: 1–20.
- [107] TESCHE M. 1981. Wirkungen von komplexem Umweltstress auf Koniferen. Vortrag, gehalten auf der III. Arbeitstagung Umweltbiophysik UMWELT – STRESS, Templin, 25–29 März: 1–12.
- [108] TESCHE M. 1987. Prolin in Bäumen. TEIL I. Prolin in gesunden Bäumen. *Flora* **179**: 335–343.
- [109] THAKUR P. S., RAI U. K. 1981. Growth characteristics and proline content in relation to water status in two

- Zea mays* L. cultivars during dehydration. *Biol. Plant.* **23**: 98–103.
- [110] TORELLO W. A., RICE L. A. 1986. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive and tolerant turfgrasses. *Plant and Soil* **93**: 241–247.
- [111] TREICHEL S. 1980. The role of proline accumulation in halophytes. Federation of European Societies of Plant Physiology. II. Congress, Santiago de Compostela, 27 July – 1 August: 661–662.
- [112] VAN SWAAD A. C., JACOBSEN E., FEENSTRA W. J. 1985. Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of *Solanum*. *Physiol. Plant.* **64**: 230–236.
- [113] VENEKAMP J. H. 1989. Regulation of cytosolic activity in plants under conditions of drought. *Physiol. Plant.* **76**: 112–117.
- [114] VENEKAMP J. H., LAMPE J. E., KOOT J. T.M. 1989. Organic acids as a sources of drought-induced proline synthesis in field bean plants, *Vicia faba* L. *J. Plant Physiol.* **133**: 654–659.
- [115] VOETBERG G., STEWART C. R. 1984. Steady state proline levels in salt-shocked barley leaves. *Plant Physiol.* **76**: 567–570.
- [116] WATAD A. A., REINHOLD L., LERNER H. R. 1983. Comparison between stable NaCl-selected *Nicotiana* cell line and wild type. *Plant Physiol.* **73**: 624–629.