

REVISION

ACUMULACION DE PROLINA EN PLANTAS EN RESPUESTA AL ESTRES OSMOTICOP. Díaz¹⁻², O. Borsani¹ y J. Monza¹.

Recibido: 28 de mayo de 1999. Aceptado: 18 de noviembre de 1999.

RESUMEN

Entre las respuestas moleculares de las plantas frente al estrés osmótico, se encuentran los incrementos de acuaporinas, osmolitos compatibles, especies reactivas del oxígeno y niveles de ácido abscísico. Una respuesta común en plantas estresadas es la acumulación de prolina, consecuencia del descenso del potencial hídrico celular. Esta acumulación, se acompaña de incrementos de las actividades enzimáticas glutamato sintasa, pirrolín-5-carboxilato sintasa y pirrolín-5-carboxilato reductasa, e inhibición de la prolina deshidrogenasa. Si bien se pensó durante mucho tiempo que la principal función de la prolina era actuar como osmolito, en esta revisión se presentan evidencias que indican una diversidad de funciones a la que esta molécula estaría relacionada, y que en conjunto hacen posible tolerar el estrés osmótico.

PALABRAS CLAVES: estrés hídrico, estrés osmótico, osmolitos compatibles, prolina.

SUMMARY**PROLINE ACCUMULATION IN PLANTS AS RESPONSE TO OSMOTIC STRESS**

Increase of aquaporines, compatible osmolytes, reactive oxygen species and abscisic acid levels were found among the molecular responses in plants subjected to osmotic stress. The proline accumulation is one of the most common responses to osmotic stress in plants, and results from decrease of cellular hydric potential. This accumulation results from stimulation of enzymes glutamate synthase, pyrrolyne-5-carboxylate synthase and pyrrolyne-5-carboxylate reductase, and proline dehydrogenase inhibition. For a long time it had been thought that the principal function of proline was as osmolyte. In this review evidences are presented that show a diversity of functions for this molecule, and all them render possible the osmotic stress tolerance

KEY WORDS: compatible osmolyte, osmotic stress, proline, water stress.

INTRODUCCION

La fotosíntesis, la incorporación de nitrógeno y la disponibilidad de agua son los principales determinantes de la producción vegetal, de manera que la sequía es de los factores que afecta a la producción de cultivos agrícolas (Tarczynski *et al.*, 1993).

En días calurosos y con alta irradiancia, las plantas presentan momentáneamente déficit hídrico sobre el mediodía, debido a que temporalmente, la pérdida de agua excede a la absorción. Otra situación diferente son los déficits

hídricos a largo plazo, provocados por la disminución de la disponibilidad de agua existente en el suelo.

A medida que el suelo se seca su potencial hídrico se hace más negativo. De esta forma, para que se pueda mantener el gradiente suficiente que permita la absorción de agua es necesario que la planta disminuya su potencial osmótico. La disminución del potencial hídrico de la célula vegetal puede darse por disminución del potencial osmótico, mediante acumulación de solutos, o por reducción de la turgencia, consecuencia de la deshidratación. De estos dos procesos el más importante es la disminución del potencial osmótico por estimulación de la acumulación de iones inorgánicos y de solutos orgánicos (Morgan, 1984).

Las plantas, hongos y bacterias presentan similitudes en cuanto a los cambios metabólicos inducidos por la disminución del contenido de agua en la célula. En cualquiera

¹ Cátedra de Bioquímica. Facultad de Agronomía. ² Unidad Asociada Fijación Biológica de Nitrógeno, Facultad de Ciencias. Av. E. Garzón 780. CP12900. Montevideo. Uruguay. E-mail pediaz@fagro.edu.uy

de esos organismos, hay que distinguir las alteraciones que ocurren a nivel de distintas vías metabólicas como consecuencia de la disminución del potencial hídrico, de las respuestas adaptativas para la tolerancia al estrés (Bray, 1993).

Si bien las distintas especies vegetales varían en su sensibilidad y respuesta a la disminución del potencial hídrico causado por la sequía, todas las plantas tienen la información genética necesaria para percibir y responder frente a situaciones de estrés hídrico (Bonerth *et al.*, 1995; Bonhert and Sheveleva, 1998). Durante la evolución, las plantas han desarrollado estrategias metabólicas que las han hecho más tolerantes al estrés hídrico, de manera de poder sobrevivir en ambientes secos (Hanson *et al.*, 1994).

También hay que considerar que las diferentes respuestas bioquímicas y fisiológicas frente a las condiciones de estrés, dependen del estado fenológico de la planta, del tipo de estrés y de la intensidad de su imposición.

RESPUESTAS BIOQUÍMICAS DE LAS PLANTAS FRENTE AL ESTRÉS OSMÓTICO

La pérdida de agua que ocurre como consecuencia del estrés osmótico, o la que se da en determinadas condiciones fisiológicas como en el estado final de maduración de la semilla, donde se pierde aproximadamente un 90%, induce diferentes ajustes metabólicos.

En semillas de *Arabidopsis thaliana*, algodón, cebada, maíz y arroz (Ingram and Bartels, 1996) se han identificado proteínas designadas LEA (Late Embryogenesis-Abundant). Estas proteínas podrían proteger a macromoléculas de la desnaturalización (Baker *et al.*, 1988) o evitarían la cristalización de componentes celulares cuando la célula se deshidrata (Ingram and Bartels, 1996).

En cloroplastos de *Craterostigma plantaginum*, planta que puede llegar a perder hasta el 98% de agua durante la desecación, se han encontrado también proteínas que cumplen la función de proteger las estructuras fotosintéticas (Bartels *et al.*, 1992). El análisis diferencial de ARNm de estas plantas, puso en evidencia similitudes con la secuencia del ARNm de proteínas *heat-shock*. Estas proteínas, probablemente chaperonas (Morimoto *et al.*, 1990), estarían involucradas en la recuperación de la conformación nativa de proteínas que se desnaturalizaron o se desplegaron, como consecuencia del déficit hídrico.

Otro mecanismo de protección frente al estrés osmótico es la regulación de la permeabilidad facilitada de agua. Durante el estrés salino se han observado cambios importantes en la cantidad de transcritos MIPs (Major Intrinsic Protein) en *Mesembryanthemum crystallinum* (Yamada *et al.*, 1995). La misma observación fue realizada en distintas especies de plantas sometidas a estrés hídrico (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992).

La secuencia de los transcritos MIPs es homóloga a la secuencia de transcritos de acuaporinas, proteínas canales de agua presentes en plantas y animales. En plantas, se

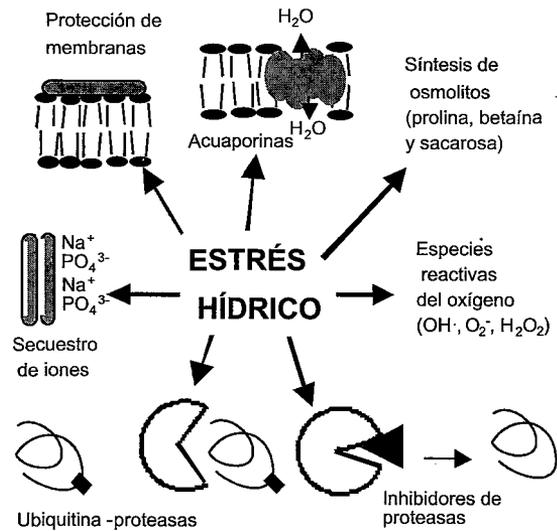


Figura 1. Esquema de las principales respuestas bioquímicas inducidas por estrés hídrico en plantas (modificado de Bray, 1993).

conocen dos clases de acuaporinas, una asociada a la membrana plasmática y otra asociada al tonoplasto (Johnson *et al.*, 1990), membrana donde se acumulan durante el estrés hídrico (Kjellbom *et al.*, 1999) (Fig. 1).

La inducción de proteasas por sequía ha sido un hecho observado en varias especies vegetales (Becana *et al.*, 1986). Si bien la inducción de tal actividad en plantas no es bien conocida (Hatfield and Viestra, 1990), una de las funciones de estas enzimas es degradar proteínas dañadas, entre otras, aquellas que sufrieron alteraciones como consecuencia del estrés hídrico (Ingram and Bartels, 1996) (Fig. 1).

También se ha observado que en las primeras etapas del estrés osmótico ocurren incrementos en los niveles de ARNm que codifican ubiquitinas (Bray, 1993), proteínas que pueden actuar como marcadores de proteínas a ser degradadas (Fig. 1). Sin embargo, en ensayos realizados en nuestro laboratorio con plantas de *Lotus corniculatus* sometidas a estrés hídrico, no se detectaron en hojas incrementos de actividad proteolítica.

Por otro lado, como consecuencia del estrés hídrico, varias especies reactivas del oxígeno (ERO) incrementan su concentración en la célula vegetal. Esto lleva a que se genere estrés oxidativo, que ocurre cuando los mecanismos de generación de ERO superan la capacidad de las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas.

Muchas enzimas relacionadas con la eliminación de intermediarios producidos por el metabolismo del oxígeno, se incrementan en respuesta al estrés hídrico (Smirnov, 1993; Borsani, 1998) así como también algunas moléculas no enzimáticas entre ellas la prolina.

Los daños celulares causados por las ERO se deben a la acción del radical superóxido, al peróxido de hidrógeno, y al

radical hidroxilo, que reaccionan con distintas moléculas alterando su estructura y función. Entre las defensas antioxidantes no enzimática, se encuentran diferentes moléculas captadoras de ERO como la prolina, el ácido ascórbico, glutatión y carotenos que pueden proteger a proteínas y fosfolípidos, entre otras moléculas, de daños derivados de su oxidación (Smirnov and Cumbes, 1989, Foyer *et al.*, 1997).

OSMOLITOS COMPATIBLES Y TOLERANCIA AL ESTRÉS

El potencial hídrico de la planta durante la sequía puede ser mantenido a través del ajuste osmótico. Una reducción del potencial hídrico celular, resultado de la disminución del potencial osmótico, provoca un movimiento de agua hacia el interior de la célula.

El potencial osmótico de la célula puede hacerse menor por acumulación en el citoplasma de osmolitos compatibles, entre los que se encuentran polioles, sacarosa, glicín-betaína y prolina. Estas moléculas impiden la disminución del potencial hídrico sin interferir con el funcionamiento celular (Bray, 1993) (Fig. 1).

Si bien es difícil evaluar la importancia relativa de los osmolitos compatibles *in vivo* (Hare *et al.*, 1988), es probable que estas moléculas, además de contribuir en el mantenimiento de la osmolaridad celular, tengan otras funciones de igual o mayor importancia que mantenimiento del potencial osmótico. De hecho, estudios *in vitro* en plantas, han demostrado que los osmolitos protegerían a diferentes macromoléculas del ataque por ERO (Smirnov and Cumbes, 1989).

La capacidad de acumular polioles de cadena lineal como manitol y sorbitol, o cíclica como el mio-inositol y sus derivados metilados, está correlacionada con la tolerancia a sequía (Tarczynski *et al.*, 1993). Los polioles parecen tener dos funciones que son difíciles de separar, el ajuste osmótico y la osmoprotección. Así, estas moléculas aumentan la retención de agua haciendo posible el ajuste osmótico, pero también pueden proteger a diferentes macromoléculas de daños derivados del estrés (Bonhert *et al.*, 1995).

Por otra parte, el inositol e inositol-1-fosfato son sustratos de la vía de síntesis de otros compuestos que están relacionados con la tolerancia al estrés, como las gomas, glicoproteínas, carbohidratos de pared celular y mucílagos (Loewus and Loewus, 1983).

El incremento de azúcares solubles como respuesta al estrés hídrico se ha observado en una gran variedad de especies de plantas (Ingram and Bartels, 1996). Esta acumulación puede ser resultado de un aumento de la vía de conversión de almidón en azúcares solubles (Turner *et al.*, 1978), o de una baja utilización de estos compuestos (Irigoyen *et al.*, 1992).

Otro tipo de glúcido que se acumula al descender el potencial hídrico de la célula son los fructanos, cadenas de 10 a 200 fructosas, que pueden proteger a la célula del dé-

ficit hídrico (Pilon-Smits *et al.*, 1995).

Aunque es rara la aparición en vegetales del disacárido trealosa, éste ha sido encontrado en *C. plantaginum* durante el proceso de desecación, y se ha comprobado *in vitro* que la trealosa es un eficiente estabilizador de proteínas y lípidos de membrana.

Por otro lado, estudios con plantas que sobreexpresan genes de las enzimas de síntesis de fructanos o trealosa, muestran que éstas son más tolerantes al estrés osmótico causado por el exceso de sal o déficit hídrico. Estas moléculas glucídicas podrían tener una participación importante en la tolerancia al estrés (Pilon-Smits *et al.*, 1995) y podrían ser tenidas en cuenta para el desarrollo de estrategias en el mejoramiento de plantas cultivadas (Goddijn and van Dun, 1999).

En respuesta al estrés osmótico inducido por altas concentraciones de NaCl o por falta de agua, también se ha observado la acumulación de moléculas nitrogenadas pequeñas como prolina, 4-hidroxi-prol-betaína, betaína, glicín-betaína y glicín-prolina, que presentan una amplia distribución en plantas (Nolte *et al.*, 1997). La síntesis y acumulación de betaína y sus derivados parece estar restringida sólo a algunas taxas y se encuentran universalmente en las Chenopodeaceae y en algunos miembros de la familia Gramineae.

La introducción en *A. thaliana* del gen de la colina oxidasa, responsable de la transformación de colina en glicín-betaína, llevó a la acumulación de este osmolito y permitió a las plantas soportar mejor el estrés salino y térmico (Hayashi *et al.*, 1997). Asimismo, se ha encontrado una alta correlación entre la acumulación de glicín-betaína y la tolerancia al frío en trigo (Allard *et al.*, 1998).

La capacidad de acumular y utilizar prolina ha sido correlacionada en ciertas plantas con genotipos tolerantes a la sequía (Al-Sulaiti *et al.*, 1990) aunque no existen evidencias directas que demuestren que las plantas que acumulan más prolina sean más tolerantes al estrés hídrico (Samaras *et al.*, 1995).

Si bien la acumulación de prolina en condiciones de estrés se conoce desde hace tiempo (Barnett and Naylor, 1966) y se han descrito muchas especies vegetales que la acumulan en respuesta a diferentes estreses (Delanuey and Verma, 1993; Chiang and Dandekar, 1995; Samaras *et al.*, 1995), las funciones de esta molécula en esas condiciones no han sido definitivamente establecidas. La prolina podría actuar como osmolito compatible (Chiang and Dandekar, 1995), como estabilizador de proteínas (Paley *et al.*, 1984), como fuente de carbono y nitrógeno (Samaras *et al.*, 1995), en el mantenimiento del potencial redox celular (Hare *et al.*, 1998) y como captador de especies reactivas del oxígeno (Smirnov and Cumbes 1984).

Por otro lado, hace relativamente poco tiempo que se conoce la inducción de genes específicos y la variación de la actividad de enzimas relacionadas al metabolismo de la prolina en respuesta al estrés osmótico (Berteli *et al.*, 1995, Kiyouse *et al.*, 1996, Borsani *et al.*, 1999).

METABOLISMO DE LA PROLINA

Los dos principales ajustes metabólicos que están implicados en la acumulación de prolina son la estimulación de la síntesis (Hanson y Hitz, 1982), controlada en varios puntos (Hu *et al.*, 1992; Delauney and Verma, 1993) y la disminución de su oxidación. A su vez, el descenso de la síntesis proteica bajo condiciones de estrés, contribuye también con la acumulación de prolina.

Síntesis de prolina

En plantas, estudios *in vivo* sugieren que el precursor de la prolina es el glutamato (Bogges *et al.*, 1976; Rhodes *et al.*, 1986). La primer enzima de la vía de síntesis de este aminoácido en vegetales es la glutamato sintasa ferredoxina dependiente (Fd-GOGAT, EC 1.4.7.1), de localización cloroplástica (Fig 3). Se ha encontrado además, que la vía de síntesis de prolina en vegetales, es similar a la encontrada en bacterias (Yoshiba *et al.*, 1997) (Fig. 2).

El glutamato es reducido por la enzima P5C sintetasa (P5CS, EC 1.5.1.12) a glutamilo-semialdehído (GSA), que se cicla espontáneamente formando pirrolín 5-carboxilato (P5C), que es reducido a prolina por la enzima P5C reductasa (P5CR, EC 1.5.1.2), (Delauney and Verma, 1993; Yoshiba *et al.*, 1997), (Fig. 2).

La reacción catalizada por la P5CS parece ser un punto de control de la vía de síntesis de prolina (Yoshiba *et al.*, 1997), dado que en *Vigna sp.* la actividad de esa enzima es regulada competitivamente por prolina (Zhag *et al.*, 1995) por un mecanismo de *feed-back*.

La enzima P5CR, que cataliza la reacción de P5C a prolina, ha sido identificada y caracterizada en arveja y tendría localización cloroplástica (Rayapati *et al.*, 1989). Por otro lado, Szoke *et al.* (1992) han encontrado actividad P5CR en la fracción citosólica de raíces y nódulos de soja, así como también en células de hojas. Las diferentes localizaciones de la P5CR, indican que la prolina se puede sintetizar en diferentes compartimentos celulares, como el citosol y el estroma de cloroplastos (Fig.3).

La ornitina, aminoácido no proteico, también puede ser precursor de la prolina, aunque esta estrategia es poco conocida en plantas (Delauney and Verma, 1993; Verslues and Sharp 1999). La síntesis a partir de la ornitina comienza con su transformación en GSA por acción de la ornitín amino transferasa (OAT, EC 2.6.1.13). El GSA se cicla espontáneamente para dar P5C, que es reducido por la P5CR a prolina, de la misma forma que se sintetiza prolina a partir de glutamato (Fig. 2).

Oxidación de prolina

La oxidación de este iminoácido es menos conocida que su síntesis y no existe un acuerdo en cuanto a la localización celular de las enzimas participantes. La vía de degradación de prolina (Fig. 2) se inicia con la formación del P5C por una reacción catalizada por la enzima prolina deshi-

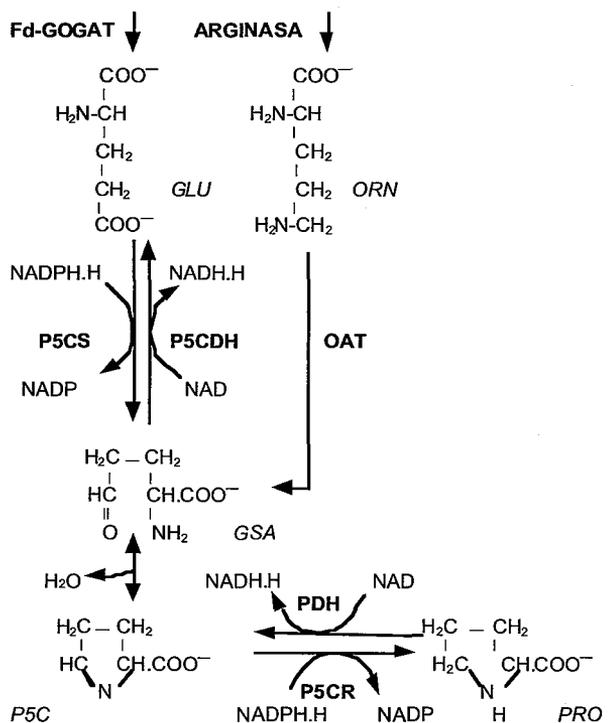


Figura 2. Representación de la vía de síntesis y oxidación de la prolina (adaptada de Thompson, 1990 y Yoshiba *et al.*, 1997). Glutamato sintasa ferredoxina dependiente (Fd-GOGAT), glutamato (GLU), ornitina (ORN), pirrolín 5-carboxilato (P5C), P5C sintetasa (P5CS), P5C deshidrogenasa (P5CDH), ornitín amino transferasa (OAT), glutamato semi aldehído (GSA), prolina deshidrogenasa (PDH), P5C reductasa (P5CR) y prolina (PRO).

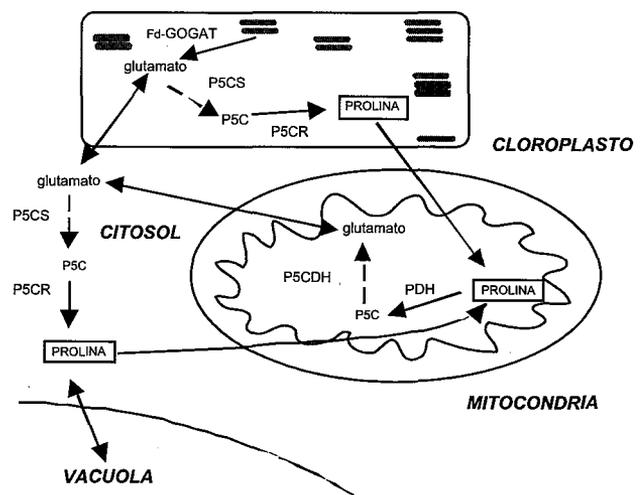


Figura 3. Compartimentos celulares involucrados en el metabolismo de prolina en vegetales (Adaptado de Forlani *et al.* 1997 y Borsani, 1998).

drogenasa (PDH, EC 1.5.99.8). La posterior oxidación de P5C a GSA es catalizada por la enzima P5C deshidrogenasa (P5CDH, EC 1.5.1.12), de localización mitocondrial, que utiliza NADH⁺ como donador de electrones (Forlani *et al.*, 1997).

La PDH y P5CDH catalizan las reacciones inversas a las catalizadas por la P5CS y P5CR respectivamente, aunque la localización y regulación son muy diferentes (Yoshida *et al.*, 1997) (Fig. 2). De esta forma, en mitocondrias, las mismas reacciones que ocurren en el cloroplasto pero en sentido contrario, constituyen una vía alternativa para la síntesis de glutamato, que no tendría relevancia en condiciones normales, pero podría ser importante en situaciones de estrés (Samaras *et al.*, 1995).

La actividad PDH parece estar fuertemente inducida por prolina y reprimida por bajos potenciales hídricos celulares, lo que favorecería la acumulación de prolina durante la situación de estrés. Por el contrario la rehidratación induce la transcripción de esta enzima (Peng *et al.*, 1996), probablemente por el efecto conjunto de dos factores: la falta de represión por estrés hídrico y el alto contenido de prolina acumulada durante el estrés (Kiyouse *et al.*, 1996). De esta forma, la prolina acumulada es rápidamente oxidada durante la rehidratación celular y podría ser usada como fuente de carbono y nitrógeno durante la superación del déficit hídrico (Samaras *et al.*, 1995).

CONTROL DE LA ACUMULACION DE PROLINA DURANTE EL ESTRES OSMOTICO

Para explicar el fenómeno de acumulación de prolina o hidroxiprolina en respuesta al estrés es necesaria la regulación a nivel de distintas enzimas para evitar la generación de un ciclo fútil.

En condiciones de estrés, los principales ajustes metabólicos implicados en la acumulación de prolina son la estimulación de su síntesis, la disminución de su oxidación y el enlentecimiento en la síntesis de proteínas.

En hojas de plantas de *L. corniculatus* sometidas a estrés hídrico (Borsani *et al.*, 1999) y en hojas de tomate sometidas a estrés salino (Berteli *et al.*, 1995) el incremento de prolina se acompañó de un incremento de la actividad y cantidad de la proteína Fd-GOGAT. También en plantas de arveja no sometidas a estrés, se encontró que la actividad Fd-GOGAT (Mahoh and Takahashi, 1982) y la cantidad de esa enzima se incrementa en presencia de luz (Susuki *et al.*, 1987; Pajuelo *et al.*, 1995).

En trigo, cebada y en la planta halófila *M. Crystallinum*, sometidas a estrés salino con alternancia de períodos de luz y oscuridad, se observó que la prolina se acumulaba durante el período de luz y era utilizada durante el período de oscuridad (Sanada *et al.*, 1995). Esto sugiere que en plantas estresadas, la luz es un factor clave en la regulación de la acumulación de prolina.

El paso metabólico catalizado por la Fd-GOGAT constituye un punto de conexión entre el metabolismo del carbono y el metabolismo del nitrógeno en vegetales. En definitiva, los esqueletos carbonados son drenados en forma de glutamato para la síntesis *de novo* de prolina. La función esencial de la Fd-GOGAT en esta interrelación metabólica fue puesta de manifiesto por Kendall *et al.* (1986) en plantas de cebada.

Si bien hay abundante información sobre el glutamato como principal precursor de la biosíntesis de prolina (Hanson and Hitz, 1982; Rhodes *et al.*, 1986) son escasos los trabajos que estudian la respuesta de la Fd-GOGAT en situaciones de estrés osmótico. Sin embargo, se cuenta con mayor información sobre las enzimas P5CS y P5CR, que participan en la biosíntesis de prolina, y sobre la enzima PDH, responsable de su oxidación.

En trabajos realizados en raíces de plantas de poroto (Hu *et al.*, 1992) y en hojas de *A. thaliana* sometidas a estrés salino, se encontró que los niveles de ARNm de la enzima P5CS se incrementan (Strizhov *et al.*, 1997). También en raíces de plantas de *Vigna aconitifolia* sometidas a estrés salino o hídrico se encontraron incrementos en los niveles ARNm-P5CS (Yoshida *et al.*, 1995; Igarashi *et al.*, 1997).

También se encontró que plántulas de *Triticum durum* sometidas a estrés hídrico, incrementaron el contenido de prolina y que la actividad P5CR se duplicó (Mattioli *et al.*, 1997). A su vez, plantas de *A. thaliana* (Vebruggen *et al.*, 1993) incrementaron la cantidad de ARNm de P5CR tanto en hojas como en raíces, y la actividad P5CR en *Penisetum typhoides* (Huber, 1974) y en *M. rodiflorum* (Trechiel, 1996) en condiciones de estrés salino. En plantas de cebada sometidas a estrés hídrico se encontró aumento de actividad P5CR (Agrandona and Pahlich, 1991).

De todas formas, los incrementos de enzimas de la vía de síntesis de prolina en condiciones de estrés, no explican por sí solos los aumentos de su concentración en los tejidos. Para explicar el aumento de la concentración de prolina, es necesaria la inhibición de su oxidación durante el período de estrés (Vebruggen *et al.*, 1996). Se ha sugerido que la reducción de la actividad PDH en tejidos deshidratados es uno de los factores claves en la acumulación de prolina (Stewart *et al.*, 1977; Dallmier and Stewart, 1992).

En plantas de *Phaseolus aureus*, *L. corniculatus*, trigo, ají dulce y tomate, que acumulan prolina durante el estrés osmótico, se ha observado que la actividad de la PDH descende drásticamente (Vebruggen *et al.*, 1996; Borsani *et al.*, 1999).

En maíz y *L. corniculatus* se observó que la actividad PDH aumentaba en plantas rehidratadas (Rayapati and Stewart, 1991; Borsani *et al.*, 1999) y que ese aumento de actividad en plantas rehidratadas estaría relacionado con los incrementos de PDH-ARNm (Peng *et al.*, 1996; Vebruggen *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1997). De esta forma, la acumulación de prolina en plantas deshidratadas se logra como resultado de la activación de su síntesis e inactivación de la vía oxidativa.

Toda la información que hasta el momento se ha obtenido sobre los ajustes del metabolismo de la prolina durante el estrés osmótico, demuestra que esta molécula incrementa su concentración como una respuesta regulada y dirigida a tolerar el estrés. Sin embargo la acumulación de prolina en bayas de *Vitis vinifera*, no ocurre como consecuencia del estrés hídrico o salino, sugiriendo que otros factores fisiológicos son los responsables de la regulación de tal acumulación (Stines *et al.*, 1999).

ACUMULACION DE PROLINA MEDIADA POR ACIDO ABCISICO

La participación del ácido abscísico (ABA) en la inducción de genes relacionados con el estrés hídrico ha sido bien documentada (Chandler and Robertson, 1994). Como consecuencia de diferentes estreses ambientales, tales como estrés hídrico, salino y baja temperatura, se encontró que el ABA endógeno en las plantas aumentaba.

En *A. thaliana* se encontró que la expresión de la luciferasa bajo el promotor RD29A, que responde individualmente tanto a ABA como a la deshidratación, era sinérgicamente activado por ABA-estrés osmótico y por ABA-bajas temperaturas (Xiong *et al.*; 1999).

En semillas de *A. thaliana* y *Daucus carotta* (Shiota *et al.*, 1998) se encontró que la disminución del contenido de agua durante el desarrollo de la semilla era precedido por un incremento abrupto de los niveles de ABA endógeno.

En relación al ABA exógeno, su aplicación en hojas de cebada, maíz y arroz promovió incrementos de prolina (Pesci, 1996) y en *A. thaliana* produjo incrementos tanto en el contenido de prolina como en los niveles del ARNm de P5CS (Savouré *et al.*, 1997).

Por otra parte, en plantas de maíz, el agregado de ABA a los mismos niveles que los encontrados en plantas estresadas, no consiguió inhibir a la enzima PDH (Dallmier and Stewart, 1992), enzima involucrada en la oxidación de prolina, y por tanto también en su acumulación, como podría haberse esperado.

El hecho que en muchos casos el agregado de ABA no es efectivo en la inducción génica si no se dan condiciones de estrés hídrico, hace pensar que no es directamente esta molécula la que está involucrada en tal inducción y que otros factores regulatorios deben cooperar.

Estas observaciones han permitido postular al ABA por un lado, como un transductor entre el estrés y las señales relacionadas con respuestas frente a éste, y por otro con la tolerancia a la deshidratación (Yoshida *et al.*, 1997; Piao *et al.*, 1999).

FUNCIONES DE LA PROLINA EN PLANTAS ESTRESADAS

La acumulación de prolina por síntesis *de novo* es una respuesta común en una amplia variedad de organismos

(Chiang and Dandekar, 1995) y es probable que esta estrategia haya permanecido desde las bacterias hasta las plantas debido a la multiplicidad de funciones de esta molécula en relación con la protección ante situaciones de estrés. Entre estas funciones se encuentra la capacidad de estabilizar proteínas (Paley *et al.*, 1984), reaccionar con especies reactivas del oxígeno (Smirnov and Cumbes, 1989), ser fuente de carbono y nitrógeno cuando se restablece el potencial hídrico (Samaras *et al.*, 1995) y regular el potencial redox celular (Hare *et al.*; 1998; Verslues and Sharp, 1999).

Si bien durante mucho tiempo se pensó que la principal función de la prolina era la de actuar como osmolito, nuevas evidencias apuntan a una diversidad de funciones de esta molécula, que en conjunto contribuyen a tolerar el estrés osmótico.

Es probable que la prolina interactúe con diferentes proteínas, entre ellas enzimas, para preservar la estructura y por lo tanto la actividad biológica. En estudios *in vitro*, se encontró que compuestos que funcionan como osmolitos citoplasmáticos, retardan la desnaturalización térmica de enzimas (Pollard and Wyn Jones, 1979) y tendrían un rol importante en la protección frente a algunas formas de desnaturalización debidas al radical hidroxilo (Smirnov and Cumbes, 1989; Ortega *et al.*, 1999).

Altas concentraciones de prolina y glicín-betaína en citoplasma, serían una eficiente protección contra la perturbación inducida por deshidratación (Paley *et al.*, 1984; Laurie and Stewart, 1990). En hojas de cebada, se encontró que la inhibición de la malato deshidrogenasa por NaCl era levantada por el agregado de glicín-betaína. En la misma especie, se encontró que la desnaturalización de la glutamina sintetasa (GS) por polietileno-glicol se evitaba con el agregado de prolina. Sin embargo en garbanzo, la glicín-betaína, pero no la prolina, es responsable de la estabilidad térmica de la GS (Laurie and Stewart, 1990).

Lutts y Guerrier (1995) encontraron que la prolina puede estabilizar a la enzima peroxidasa durante el estrés salino, lo que también relaciona indirectamente a esta molécula con las defensas antioxidantes.

Si bien son muchos los trabajos sobre la acumulación de prolina como respuesta a situaciones de estrés osmótico, la utilización de esta molécula una vez restablecido el potencial hídrico es un proceso poco estudiado (Vebruggen *et al.*, 1996). De todas formas, su rápida oxidación podría estar relacionada con la utilización de esta molécula como fuente de carbono y nitrógeno, durante el restablecimiento del potencial hídrico (Rayapati and Stewart, 1991; Samaras *et al.*, 1995; Borsani *et al.*, 1999).

La acumulación de prolina también debe ser considerada en el mantenimiento del potencial redox celular. Hare y Cress (1997) han sugerido que la prolina, sintetizada a partir de glutamato y NADPH⁺ en condiciones de estrés hídrico es transportada a otras células con altos requerimientos energéticos, donde es usada como fuente de poder reductor.

Ya en 1988 Kohl *et al.*, habían sugerido que en plantas

de soja sometidas a estrés hídrico, la prolina se sintetizaba en el citosol de las células de los nódulos y era oxidada en los bacteroides, constituyendo así en una fuente de energía para la fijación de nitrógeno.

Verslues y Sharp (1999) han agregado nuevas evidencias respecto a la propuesta de Hare y Cress (1997). Trabajando en raíces primarias de maíz encontraron que la prolina se sintetiza en células de la zona de elongación y es transportada a la región meristemática donde es usada como fuente de energía.

Por otra parte, es probable que la prolina en vegetales tenga un rol importante en la inducción específica de genes relacionados con la tolerancia al estrés (Iyer and Caplan, 1998). Es más, Nanjo *et al.* (1999) aportan evidencias sobre el rol regulador de esta molécula en la morfogénesis, dado que la prolina es el mayor constituyente de las proteínas estructurales de pared.

Estudios tendientes a relacionar la acumulación de prolina con otras respuestas al estrés, como la inducción de proteínas de *heat-shock* y defensas antioxidantes, serían de importancia para comprender mejor la tolerancia al estrés. Los conocimientos básicos sobre el metabolismo de la prolina y su regulación en condiciones de estrés son una herramienta muy promisoriosa para el mejoramiento de plantas tolerantes a diferentes tipos de estrés.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA) y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República (CSIC).

BIBLIOGRAFIA

- AGRAN DONA, V. and PAHLICH, E. 1991. Water stress on proline content and enzymes activities in barley seedlings. *Phytochemistry* 30:1093-1094.
- ALLARD, F.; HOUDE, M.; KRÖL, M.; IVANOV, A.; HUNER, N. and SARHAN, F. 1998. Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol.* 39:1194-1202.
- AL-SULAITI, A.; BLACKWELL, R.; LEA, P. and DAVIES, W. 1990. Capacity for proline accumulation during water deficit and its relation with growth of barley photorespiratory mutants. *J. Exp. Bot.* 41:4.14.
- BAKER, J.; STEELE, C. and DURE, L III. 1988. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* 11:277-291.
- BARNNET, N. and NAYLOR, A. 1966. Amino acid and protein metabolism in bermuda grass during water stress. *Plant Physiol.* 11:1222-1230.
- BARTELS, D.; HANKE, C.; SHNEIDER, K.; MICHEL, D. and SALAMINI, F. 1992. A desiccation-related elip-like gene from resurrection plants *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 181:27-34.
- BECANA, M; APARCIO-TEJO, P and SÁCHEZ-DÍAZ, M. 1986. Nitrate metabolism in alfalfa root nodules under water stress. *J. Exp. Bot.* 137:798-806.
- BERTELI, F.; CORRALES, E.; GUERRERO, C.; ARIZA, M.; PLIEGO, F. and VALPUESTA, V. 1995. Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. *Physiol. Plant.* 93:259-264.
- BOGGES, S.; ASPINALL, D. and PALEG, L. 1976. Stress metabolism IX. The significance of end-product and inhibition of proline biosynthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. *Aust. J. Plant Physiol.* 3:513-525.
- BONHERT, H. and SHEVELEVA, E. 1998. Plant stress adaptations-making metabolism move. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:267-274.
- BONHERT, H.; NELSON, D. and JENSEN, R. 1995. Adaptation to environmental stresses. *Plant Cell* 7:1099-1111.
- BORSANI, O. 1998. Respuestas bioquímicas inducidas por estrés hídrico en *Lotus corniculatus*. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay. 79 pp.
- BORSANI, O.; DÍAZ, P. and MONZA, J. 1999. Proline is involved in water stress responses of *Lotus corniculatus* nitrogen fixing and nitrate fed plants. *J. Plant Physiol.* 155:269-273.
- BRAY, E. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103:1035-1040.
- CHANDLER, P. and ROBERTSON, M. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 45:113-141.
- CHIANG, H. and DANDEKAR, M. 1995. Regulation of proline accumulation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh during development and in response to desiccation. *Plant Cell Environment.* 18:1280-1290.
- DALLMIER, K. and STEWART, C. 1992. Effect of exogenous abscisic acid on proline dehydrogenase activity in maize (*Zea mays* L.). *Plant Physiol.* 99:762-764.
- DELAUNEY, A. and VERMA, D. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4:215-223.
- FORLANI, G.; SCAINELLI, D. and NIELSEN, E. 1997. Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from cultures cells of potato. *Plant. Physiol.* 113:1413-1418.
- FOYER, C.; NOCTOR, G. and MOROT-GAUDRY, J. 1997. L'Oxygene: bienfait ou danger pour les plantes? *Biofutur* 169:27-29.
- GODDIJN, O. and VAN DUN, K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* 4:315-319.
- HANSON, A. and HITZ, W. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33:163-203.
- HANSON, A.; RATHIANASABAPATHI, B.; RIVOAL, J.; BURNET, M.; DILLON, M. and GAGE, D. 1994. Osmoprotecti-

- ve compounds in the Plumbaginaceae: A natural experiment in metabolic engineering of stress tolerance. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91:306-310.
- HARE, P. and CRESS, W. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulations in plants. *Plant Growth Regul.* 21:79-102
- HARE, P.; CRESS, W. and VAN STADEN, J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environment.* 21:535-553.
- HATFIELD, P. and VIERSTRA, R. 1990. Protein turnover. En: *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* Dennis, D. and Turpin (Eds.), D. John Wiley and Sons. pp 448-455.
- HAYASHI, H., ALIA, MUSTARDY, L.; DESHNIUM, P.; IDA, M. and MURATA, N. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* 12:133-144.
- HU, C.; DELAUNEY, A. and VERMA, D. 1992. A bifunctional enzyme (pyroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first steps of proline biosynthesis in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89:9354-9358.
- HUBER, W. 1974. Influence of NaCl and abscisic acid treatment on proline metabolism and some further enzymes of amino acid metabolism in seedling of *Pennisetum typhoides*. *Planta* 121:225-235.
- IGARASHI, Y.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., WADA, K. and SHINOZAKI, K. 1997. Characterization of gene for D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Mol. Biol.* 33:857-865.
- INGRAM, J. and BARTELS, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 47:377-403.
- IRIGOYEN, J.; EMERICH, D. and SÁNCHEZ-DÍAZ, M. 1992. Water stress induced changes in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.* 84:55-60.
- IYER, S. and CAPLAN, A. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol.* 116:203-211.
- JOHNSON, K.; HÖFE, H. and CHRISPEEL, M. 1990. An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (*GipF*). *Plant Cell* 2:525-532.
- KENDALL, A.; WALLSGROVE, R.; HALL, N.; TURNER, J. and LEA, P. 1986. Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare*, L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* 168:316-323.
- KIYOSUE, T.; YOSHIBA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOSAKI, K. and SHINOSAKI, 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*. *Plant Cell* 8:1323-1335.
- KJELLBOM, P.; LARSSON, C.; JOHANSSON, I.; KARLSSON, M. and JOHANSSON, U. 1999. Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 4:308-314.
- KOHL, D.; SCHUBERT, K.; CARTER, M.; HAGEDORN, C. and SHEARER, G. 1988. Proline metabolism in N₂-fixing root nodules: energy transfer and regulation in purine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2036-2040.
- LAURIE, S. and STEWART, G. 1990. The effects of compatible solute on the heat stability of glutamine synthetase from chickpeas grown under different nitrogen and temperature regimes. *J. Exp. Bot.* 41:1415-1422.
- LOEWUS, F. and LOEWUS, M. 1983. Myo-inositol: Its biosynthesis and metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 34:137-161.
- LUTTS, S. and GUERRIER, G. 1995. Peroxidase activities of two rice cultivars differing in salinity as affected by proline and NaCl. *Biol. Plant.* 37:577-586.
- MATOH, T. and TAKAHASHI, E. 1982. Changes in the activities of ferredoxin and NADH glutamate synthase during seedling development of peas. *Planta* 154:289-294.
- MATTIOTI, C.; LACERENZA, N.; TROCOLI, A.; DE LEONARDIS, A. and DI FONZO. 1997. Water stress and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiol. Plant.* 101:787-792.
- MORGAN, J.M. 1984. Osmoregulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35:299-319.
- MORIMOTO, R.; TISSIÈRES, A. and GEORGOPOULOS, C. 1990. The stress response, function of the proteins, and perspectives. En: *Stress Proteins in Biology and Medicine.* Cold Spring Harbor Laboratory Press (Ed.) pp. 1-35.
- NANJO, T.; KOBAYASHI, M.; YOSHIBA, Y.; SANADA, Y.; WADA, K.; TSUKAYA, H.; KAKUBARI, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., and SHINOZAKI, K. 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 18:185-193.
- NOLTE K.; HANSON A. and CAGE D. 1997. Proline accumulation and methylation to proline betaine in *Citrus*: Implications for genetic engineering of stress resistance. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 122:8-13.
- ORTEGA, J. ROCHE D and SENGUPTA-GOPOLAN, C. 1999. Oxidative turnover of soybean soot glutamine synthetase. *In vitro* and *in vivo* studies. *Plant Physiol.* 119:1483-1495.
- PAJUELO, P.; PAJUELO, E. y MÁRQUEZ, A. 1995. Expresión durante el desarrollo de la ferredoxina - glutamato sintasa de cebada. En: *Avances en el metabolismo del nitrógeno inorgánico.* M. García Guerrero (Ed.) Secretariado de Publicaciones. Universidad de Sevilla. 44:123-129.
- PALEG, L.; STEWART, G. and BRADBEER, J. 1984. Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiol.* 75:974-978.

- PENG, Z.; LU, Q. and VERMA, D. 1996. Reciprocal regulation of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol. Gen. Genet.* 253:334-341.
- PESCI, P. 1996. Is photosynthetic activity responsible for the stimulating effect of light on ABA-induced proline accumulation in barley leaves?. *J. Plant Physiol.* 147:729-735.
- PIAO, H. PIH, K. LIM, J. KANG, S. JIN, J. KIM, S. and HWANG, I. 1999. An *Arabidopsis* GSK3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress sensitive mutants is induced by NaCl and abscisic acid. *Plant Physiol.* 119:1527-1534.
- PILON-SMITS, E.; EBSKAMP, M.; PAUL, M.; JEUNKEN, M.; WEISBEEK, P. and SMEEKENS, S. 1995. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107:125-130.
- POLLARD, A. and WYN JONES, R. 1979. Enzymes activities in concentrated solutions of glycinebetaine and other solutes. *Planta* 144:294-298.
- RAYAPATI, J. and C. STEWART. 1991. Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochondria. *Plant Physiol.* 95:787-791.
- RAYAPATI, P.; STEWART, C. and HACK, E. 1989. Pyrroline-5-carboxylate reductase is in pea (*Pisum sativum* L.) leaf chloroplast. *Plant Physiol.* 91:581-586.
- RHODES, D.; HANDA, S. and BRESSAN, R. 1986. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 82:890-903.
- SAMARAS, Y.; BRESSAN, R.; CSONKA, M.; GARCÍA-RÍOS, PAINO D'URZO and RHODES. 1995. Proline accumulation during drought and salinity. En: *Environment and Plant Metabolism flexibility and acclimation*. W.J Davies Bios Scientific Publisher UK. (Ed.) pp. 161-186.
- SANADA, Y.; UEDA, H.; KURIBAYASHI, K.; ANDOH, T.; HAYASHI, F.; TAMAI, N. and WADA, K. 1995. Novel light-dark change of proline levels in halophytes (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) and glycophytes (*Horedeum vulgare* L. and *Triticum aestivum* L.) leaves and roots under salt stress. *Plant Cell Physiol.* 36:965-970.
- SAVOURÉ, A.; HUA, X.; BERTAUCHE, N.; VAN MONTAGU, M. and VERBRUGGEN, N. 1997. Abscisic acid-independent and acid abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* 254:104-109.
- SHIOTA, H.; SATOH, R.; WATABE, K.; HARADA, H. and KAMADA, H. 1998. *CABI3*, the carrot homologue of *Arabidopsis ABI3*, is expressed during both zygotic and somatic embryogenesis and functions in the regulation of embryo-specific ABA-inducible genes. *Plant Cell Physiol.* 39:1184-1193.
- SMIRNOFF, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125:27-58.
- SMIRNOFF, N. and CUMBES, Q. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28:1057-1060.
- STEWART, C.; BOGGESS, S.; ASPINALL, D. and PALEG, L. 1977. Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiol.* 59:930-932.
- STINES, A.; NAYLOR, D.; HOJ, P. and VAN HEESWIJCK, R. 1999. Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. *Plant Physiol.* 120:923
- STRIZHOV, N.; ABRAHAM, E.; OKRESZ, L.; BLICKLING, S.; ZILBERSTEIN, A.; SCHELL, J.; KONCZ, C. and 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*. *Plant J.* 23:557-569.
- SUSUKI, A.; AUDET, C. and OAKS, A. 1987. Influence of light on the ferredoxin dependent glutamate synthase in maize leaves. *Plant Physiol.* 84:578-581
- SZOKE, A.; MAIO, G.; HONG, Z. and VERMA, D. 1992. Subcellular location of γ -pyrroline-5-carboxylate reductase in root-nodule and leaf of soybean. *Plant Physiol.* 99:1642-1649.
- TARCZYNSKI, M.; JENSEN, R. and BONHERT, H. 1993. Stress protection of transgenic tobacco plants by production of the osmolyte mannitol. *Science* 259:508-510.
- THOMPSON, J.F. 1990. Arginine synthesis, proline synthesis, and related processes. En: *The biochemistry of plants*. Milin, B. J. Ed. Academic Press. Vol. 5:375-398.
- TREICHEL, S. 1996. The influence of NaCl on γ -pyrroline-5-carboxylate reductase in halophytes. *Plant Physiol.* 67:173-181.
- TURNER, N.; BEGG, J. and TONNET, M. 1978. Osmotic adjustment of sorghum and sunflower crops in response to water deficits and its influence on the water potential at which stomata close. *Aust. J. Plant Physiol.* 5:597-608.
- VERBRUGGEN, N.; VILLAROEL, R. and VAN MONTAGNU, M. 1993. Osmoregulation of a Pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 103:771-781.
- VERBRUGGEN, N.; XUE-JUN, H.; MAY, M. and VAN MONTAGNU M. 1996. Environmental and developmental signals modulate proline homeostasis: Evidence for a negative transcriptional regulator. *Proc. Nat. Acad. Sci, USA* 63:8787-8791.
- VERSLUES, P. and SHARP, R. 1999. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L) Primary roots at low water potentials. II Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiol.* 119:1349-1360.
- XIONG, L., ISHITANI, M. and ZHU, J. 1999. Interacion of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant. Physiol.* 119:205-211.

- YAMADA, S.; KATSUHARA, M.; KELLY, W.B.; MICHALOWSKY, C.B. and BONHERT, H. J. 1995. A family of transcripts encoding water channel proteins: Tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 7:1129-1142.
- YAMAGUSHI-SHINOZAKI, K.; KOIZUMI, M.; URAO, S. and SHINOZAKI, K. 1992. Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis channel protein. *Plant Cell Physiol.* 33:217-224.
- YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; KATAGARI, T.; UEDA, H.; MIZOGUCHI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WADA, K.; HARADA, Y. and SHINOZAKI, K. 1995. Corelation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J.* 7:751-760.
- YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. and SHINOZAKI, K. 1997. Regulation of levels of proline as osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol.* 38:1095-1102.
- ZHANG, C.; LU, Q and VERMA, D. 1995. Removal of feedback inhibition of D 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 270:20491-20496.