

EFEITO DO DEFÍCIT HÍDRICO SOBRE O METABOLISMO DO NITROGÊNIO E O CRESCIMENTO DE QUATRO CULTIVARES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)*

Alemar Braga Rena
Guillermo Z. Masciotti**

1. INTRODUÇÃO

Em 1954, KEMBLE e MACPHERSON (6) observaram pela primeira vez que prolina é o único aminoácido sintetizado de novo em plantas de azevém (*Lolium perenne*) submetidas à desidratação, e recentemente foi sugerido que o acúmulo de prolina em plantas submetidas à seca está correlacionado com a resistência ao déficit hídrico em várias espécies (12, 13, 20, 22). Acredita-se que os cultivares mais resistentes acumulam mais prolina nestas condições (12). Este tema tem merecido atualmente grande interesse e foi recentemente revisto (7).

O acúmulo de prolina livre, quando as plantas entram em murchamento, está agora bem documentado (2, 3, 19, 20, 23, 24, 25, 29). No entanto, o mecanismo deste acúmulo é ainda desconhecido e deverá aguardar a elucidação do processo bioquímico de síntese e degradação de prolina nas plantas superiores (14).

Por exemplo, em folhas de feijão (27), o déficit hídrico leva ao acúmulo de prolina mediante a diminuição da síntese e do aumento da degradação de proteínas, e a função dos hidratos de carbono é evitar a perda da prolina acumulada por meio da sua oxidação no ciclo de Krebs. Resultados semelhantes foram também observados em grama Bermuda (2) e raízes de milho (1). Evidências recentes sugerem que prolina pode de fato ser oxidada por meio do ciclo de Krebs (15) via Δ^1 -pirrolino-5-carboxilato (16) pela atividade da deshidrogenase da prolina (17, 18).

A degradação de proteínas normalmente aumenta (5) e a síntese diminui (2,5) com o dessecamento das plantas. Evidências recentes (4) sugerem que a ação imediata da falta d'água nas células vegetais é a redução no teor de polissomos, com o aumento concomitante do teor de monossomos. Os efeitos dos déficits moderados e curtos foram completamente revertidos em poucas horas após a rehidratação de plântulas de milho, mas existe um atraso que possivelmente depende da duração e da intensidade do déficit anterior (4). Ainda que todas estas evidências recentes indiquem uma diminuição do teor de proteínas nos tecidos desidratados.

* Parte da tese apresentada pelo segundo autor à U.F.V., como um dos requisitos para a obtenção do Grau de «Magister Scientiae» em Fisiologia Vegetal.

Recebido para publicação em 16-06-1976.

** Respectivamente, Prof. Adjunto do Departamento de Biologia da U.F.V. e Prof. Assistente de Botânica Geral e Sistemática da Universidade Nacional del Cuzco, Peru.

tados, esta situação parece não ser universal. Por exemplo, observou-se que em citrus o teor de proteínas aumentou com a desidratação (3) de acordo com as fases de ativação, reação e reconstituição propostas por STOCKER (28). É evidente que este problema pode representar variações entre as espécies e/ou técnicas experimentais usadas em cada caso.

Por via de regra, o déficit d'água causa grande aumento no teor de aminoácidos livres totais (2, 3, 10, 11, 20, 23). Pode-se pensar que o aumento do teor de aminoácidos seja tão somente o resultado da degradação e da redução da síntese de proteínas. No entanto, KEMBLE e MACPHERSON (6) demonstraram que o aumento de prolina excede consideravelmente o teor de prolina existente nas proteínas de azevém submetido à seca.

O objetivo da presente pesquisa foi obter informações sobre o metabolismo de aminoácidos livres e proteínas em vários cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. submetidos a diferentes níveis de desidratação. Ênfase especial foi dada às variações do teor de prolina livre como um provável parâmetro para a seleção de cultivares resistentes à seca.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos Gerais

Os cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), 'Rico 23', 'Manteigão Fosco 11', 'Carioca' e 'Mulatinho' foram cultivados em casa-de-vegetação, em recipiente de 1 litro contendo aproximadamente 1 kg de solo fértil. Cinco sementes foram semeadas, e logo após à germinação selecionaram-se as três plantas mais uniformes. Procedeu-se à irrigação diária de forma a manter o solo com o teor d'água próximo da capacidade de campo até o início dos tratamentos.

Todas as determinações foram feitas em amostras de 5 discos de 1 cm de diâmetro obtidos das folhas primárias com o auxílio de um perfurador de rolhas. Os experimentos foram repetidos pelo menos três vezes. A determinação do peso seco dos discos foi feita após secagem em estufa de circulação forçada a 75° C, durante 48 horas. O teor relativo d'água (Φ) foi determinado em amostras de 5 discos de 1 cm de diâmetro com 3 repetições, de acordo com a técnica proposta por WEATHERLEY (31).

2.2. Estudo com Plantas Inteiras

Dez dias após a semeadura, supriu-se a irrigação de um grupo de plantas dos cultivares 'Manteigão Fosco 11' e 'Carioca', até que as plantas apresentassem sinais visíveis de murcha (o que aconteceu em aproximadamente 6 dias). Discos foram tomados das folhas primárias das plantas murchas e turgidas (controle permanentemente irrigado) para a determinação do Φ , aminoácidos livres totais, prolina livre, proteína solúvel e proteína insolúvel. As plantas murchas foram novamente irrigadas e as determinações repetidas 24 horas após a adição d'água.

2.3. Estudo com Tecidos Foliares Destacados

Quando as folhas primárias dos quatro cultivares alcançaram o tamanho máximo (aproximadamente 16 dias após o plantio), as plantas foram levadas ao laboratório. Cerca de 400 discos foram removidos das folhas primárias de cada cultivar (em geral 5 discos por folha). Cerca de 200 destes discos foram colocados em bandejas de plástico pequenas, revestidas internamente com 2 camadas de toalhas de papel. Para uma desidratação suave e lenta, quantidade suficiente d'água destilada era adicionada às bandejas, e os discos mantidos sobre suportes de plástico com altura suficiente para evitar o contato direto do disco com água líquida livre. Quando se desejava uma desidratação rápida e severa, não se adicionava água às bandejas. Os discos restantes foram colocados em bandejas semelhantes, mas em contato direto com as toalhas de papel umedecidas (controle turgido). Todas as bandejas foram cobertas com uma lâmina de polietileno flexível e transparente, e expostas continuamente à luz fluorescente de 1.800 lux, a 28°C. Amostras de 5 discos eram tomadas a diferentes intervalos de tempo para a determinação do Φ , aminoácidos livres totais, prolina livre e proteínas. Os tecidos destinados às análises químicas eram mortos por submersão em 2 ml de uma

mistura contendo metanol: clorofórmio: água (MCA) (12:5:1 V/V/V) a -15°C e mantidos nestas condições até o momento da análise.

2.4. Extração e Determinação de Aminoácidos

Aminoácidos foram extraídos mediante uma modificação do método descrito por SINGH *et alii* (23). Os tecidos foram desintegrados em almofariz, à temperatura ambiente, na presença de 2 ml de MCA. A suspensão foi centrifugada por 3 min a 4.500 x g e o sobrenadante coletado por decantação. O precipitado foi novamente suspenso com 2 ml adicionais de MAC, agitado vigorosamente em um «Vortex», durante 30 seg., e a suspensão centrifugada como anteriormente. A operação foi repetida com mais 2 ml de MCA. Os sobrenadantes foram combinados num funil separador de 60 ml e duas fases foram obtidas pela adição de 3,3 ml de água e 2,3 ml de clorofórmio. A fase inferior, contendo clorofórmio, pigmentos e a maioria dos compostos lipossolúveis, foi descartada. A fase superior (cerca de 6,0 ml) continha metanol, água, aminoácidos e a maioria dos compostos polares solúveis das folhas. Os aminoácidos totais foram estimados nesta fase metanólica pelo método de MOORE e STEIN (9), usando-se como padrão uma mistura de glicina, fenilalanina, glutamato e arginina em iguais concentrações.

Prolina livre foi determinada diretamente no extrato metanólico usando-se o método descrito por MESSER (8), com algumas modificações. O reagente ácido de ninhidrina foi preparado, diariamente, do seguinte modo: 600 mg de ninhidrina, 15 ml de ácido acético glacial e 10 ml de ácido ortofosfórico 6 M eram misturados, e a mistura era aquecida a 70°C, até que se completasse a dissolução dos reagentes. A reação foi feita em tubos de hidrólise (1,0 x 12 cm) num meio contendo 1×10^{-2} a 1×10^{-1} µmoles de prolina, 12,6 µmoles de glicina, 2 ml de ácido acético glacial e 2 ml de reagente ácido de ninhidrina, num volume final de 7 ml. O branco continha todos os componentes, menos prolina. Os tubos eram hermeticamente fechados e imersos num banho de água em ebulição, durante 30 min, e a reação terminada num banho de gelo e água. A cor rosa desenvolvida era extraída pela adição de 4 ml de tolueno seguida de agitação no «Vortex», durante 15 seg. Para a completa separação das fases aquosa e toluênica foram necessários, às vezes, 2 min de centrifugação a 4.500 x g. A absorbância da fase toluênica foi determinada a 515 nm em cubetas quadradas de 10 nm, dentro do período de 1 hora após a separação.

2.5. Extração e Determinação das Proteínas Solúveis e Insolúveis

O resíduo insolúvel resultante da extração dos aminoácidos foi extraído 3 vezes com 2 ml de tampão fosfato 200 mM, pH 7,0. Após 3 min de centrifugação a 4.500 x g, os sobrenadantes claros foram combinados e as proteínas solúveis determinadas diretamente pelo método de SCHACTERLE e POLLACK (21).

O teor de nitrogênio do resíduo insolúvel obtido anteriormente foi estimado pelo reagente de Nessler, de acordo com o método descrito por UMBREIT *et alii* (30), porém, sem o uso de catalizador durante a digestão da amostra. O teor de proteinas foi obtido usando-se o fator 6,25.

2.6. Estudos de Crescimento

Plantas dos quatro cultivares foram obtidas conforme se descreveu anteriormente. Dez dias após a semeadura, as plantas de cada cultivar foram divididas em dois grupos. Um deles foi irrigado diariamente (controle irrigado) e o outro mantido sem irrigação. As seguintes observações foram efetuadas diariamente: (a) comprimento da folha primária e (b) largura da base da folha primária. Três dias após a suspensão da irrigação, quando todas as plantas mostravam sinais visíveis de murchamento, água foi novamente adicionada, diariamente, e a recuperação do crescimento seguida por mais 3 dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise de Prolina

Serão feitas algumas considerações iniciais sobre o método de análise de pro-

lina livre, por ser este aminoácido de difícil quantificação em materiais biológicos. As determinações de prolina livre do presente trabalho foram feitas segundo a técnica descrita por MESSER (8), ligeiramente adaptada. Este método modificado apresentou grande sensibilidade (limite inferior de 10 nmoles) e altíssima reprodutibilidade. Um dos graves problemas da quantificação colorimétrica de um determinado aminoácido, pela reação com nihidrina, é a possível interferência de outros aminoácidos presentes. Ainda que o reagente ácido de nihidrina seja relativamente específico para prolina, cerca de 15 aminoácidos podem interferir com a cor rosa formada, às vezes aumentando, às vezes reduzindo sua intensidade. Glicina não desenvolveu cor com nihidrina em meio ácido, porém sua presença no meio de reação aumentou a sensibilidade cerca de 50% e eliminou a interferência de 17 aminoácidos, inclusive de glutamina, triptofano, tirosina e histidina, em várias concentrações, fazendo o método utilizado no presente estudo mais eficiente que o do originalmente proposto por MESSER (8). Além do mais, admite-se que, nas condições do presente estudo, a interferência de qualquer composto que possa reagir com nihidrina é desprezível em comparação com os grandes aumentos observados na concentração de prolina livre.

3.2. Efeito da Desidratação Rápida e Intensa sobre a Composição Protéica e de Aminoácidos Livres de Discos Foliares

Os teores médios de prolina livre de discos foliares desidratados de quatro cultivares de feijão são apresentados no Quadro 1. Durante as 3 primeiras horas de desidratação, o teor de prolina foi o dobro do existente nos discos turgidos, mas diferenças estatísticas foram observadas somente às 6 horas ($P<0,01$), quando o teor do aminoácido era o triplo daquele observado a 0 horas. Observa-se que, sob condições de desidratação rápida e intensa, o metabolismo dos discos foi prontamente modificado no sentido de acumular prolina livre. Uma idéia de conjunto do comportamento dos 4 cultivares pode ser obtida pela análise da Figura 1. Vê-se, claramente, que o cultivar 'Manteigão Fosco 11' se destaca dos demais quanto ao acúmulo de prolina.

QUADRO 1 - Efeito do período de desidratação sobre o teor médio de prolina de quatro cultivares de feijão (1)

Período de desidratação (horas)	Teor relativo de água (Φ)	Teor de prolina ($\mu\text{moles.g}^{-1}\text{PS}$)
0	83 - 95	2,54 a
3	46 - 56	6,16 ab
6	34 - 49	9,53 b
20	25 - 29	33,98 c

(1) As médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente ($P<0,01$), pelo teste de Tukey.

O teor dos aminoácidos livres totais também aumentou significativamente com a desidratação (Figura 2). Não foi feita, no presente estudo, a determinação dos teores dos aminoácidos individuais. No entanto, sabe-se que o teor de alguns aminoácidos diminui, e o de outros aumenta, sendo a intensidade e o padrão destas variações uma função da espécie e do grau de desidratação (2, 3, 20, 23).

Observou-se, com surpresa, que o teor das proteínas solúveis aumentou consistentemente com o crescimento do déficit hídrico, nos 4 cultivares (Figura 3). De acordo com as informações existentes (5), o nível protéico deveria ser menor nos discos submetidos ao déficit hídrico, como consequência da redução da síntese de proteínas, e do aumento da atividade das enzimas proteolíticas. Variações semelhantes às do presente experimento foram observadas nas folhas, caules e raízes de plântulas de 2 espécies de citrinos (3), e possivelmente representam diferenças específicas e/ou da metodologia empregada.

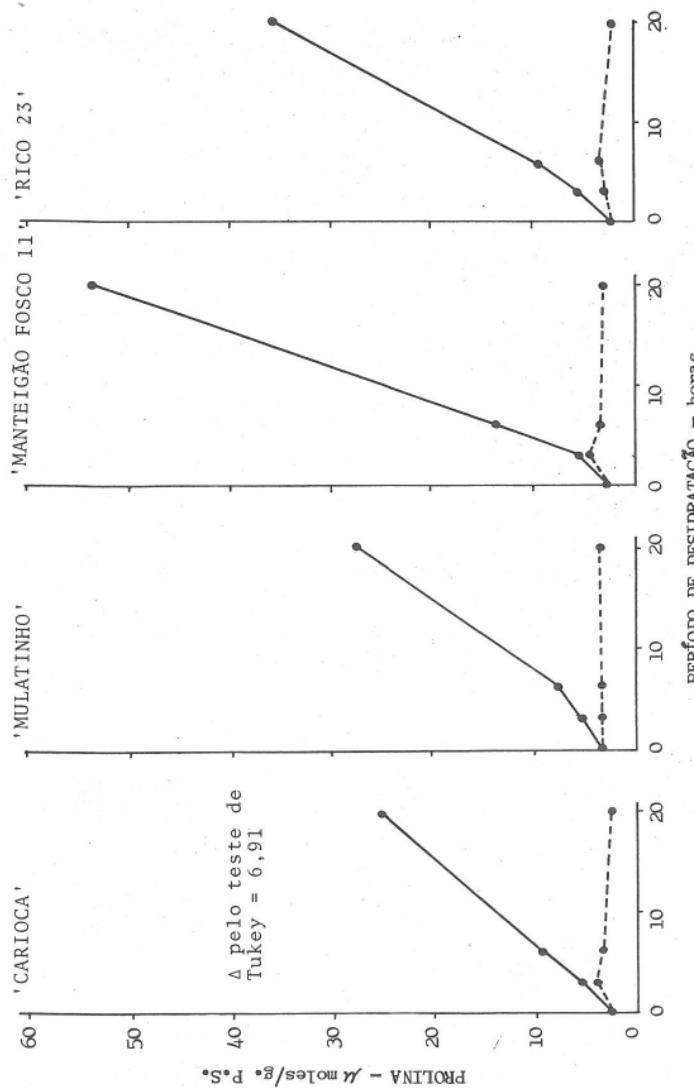


FIGURA 1 - Efeito da desidratação rápida e intensa sobre o acúmulo de prolina em quatro cultívares de feijão. Controle turgido (---●---); discos desidratados (—●—).

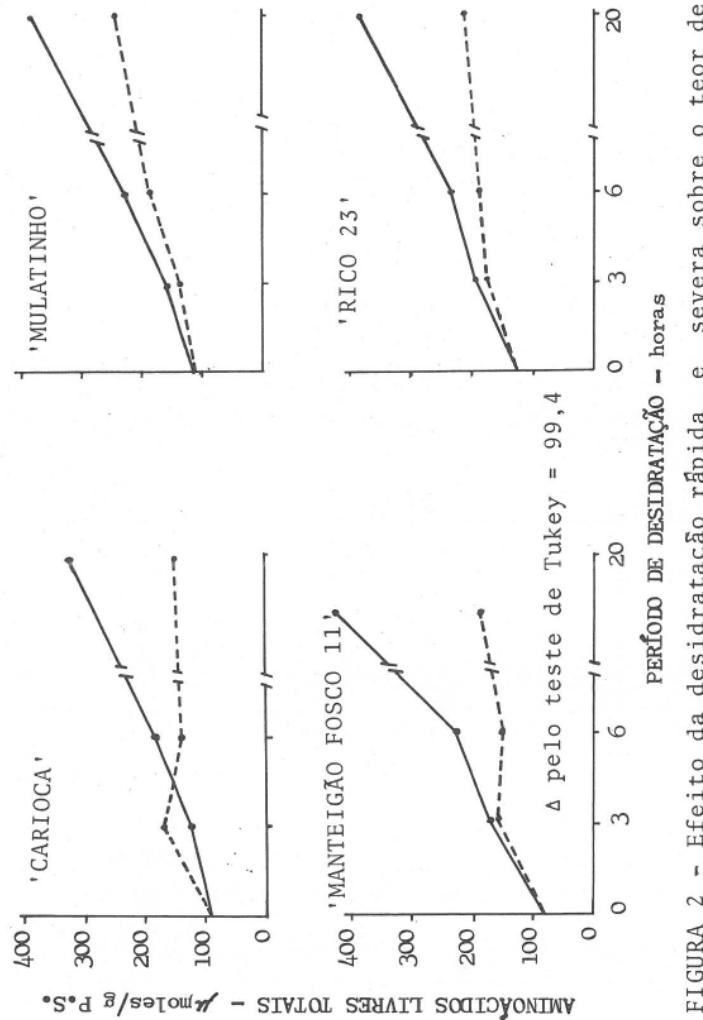


FIGURA 2 - Efeito da desidratação rápida e severa sobre o teor de aminoácidos livres totais em quatro cultivares de feijão. Controle turrido (—●—); discos desidratados (—○—).

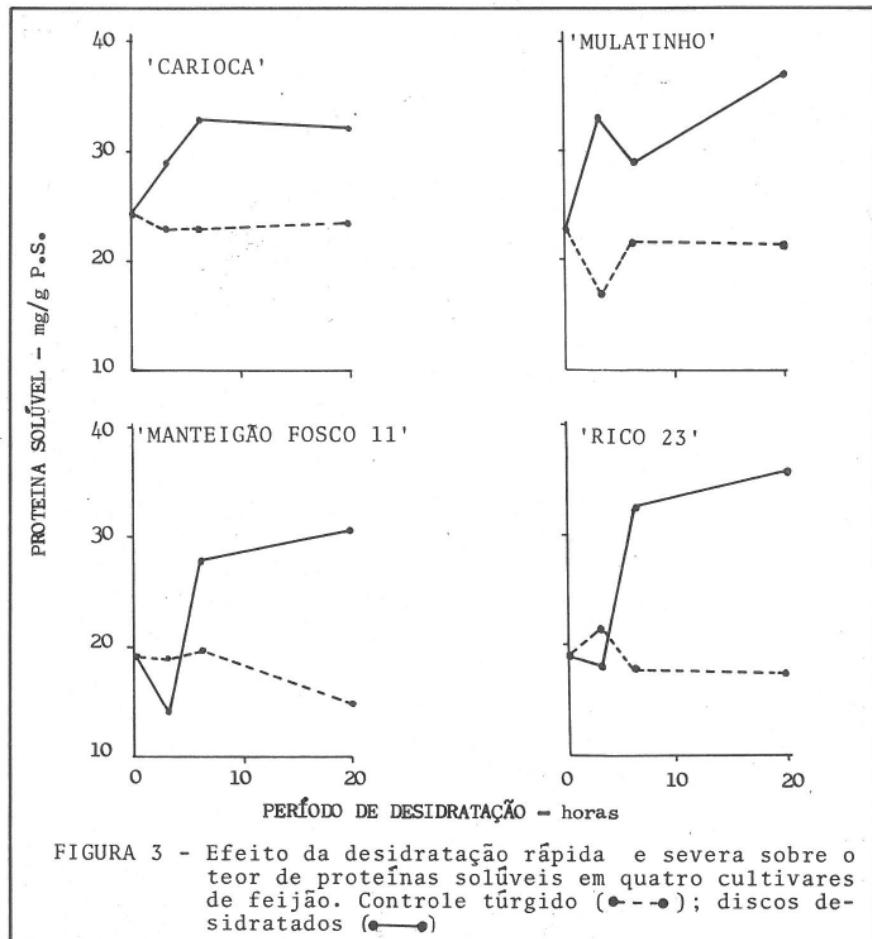


FIGURA 3 - Efeito da desidratação rápida e severa sobre o teor de proteínas solúveis em quatro cultivares de feijão. Controle túrgido (---○); discos desidratados (●—●)

3.3. Efeito da Desidratação Lenta e Moderada sobre o Acúmulo de Prolina Livre em Discos Foliares

Discos foliares obtidos dos cultivares 'Carioca' e 'Manteigão Fosco 11' foram desidratados lentamente numa atmosfera saturada de vapor de água. O valor inicial de ϕ foi de aproximadamente 85%, e, após 20 h de desidratação, alcançou o limite mínimo de 55%, o que permaneceu constante até 30 h. Amostras para as análises químicas foram tomadas a 0,10, 20 e 30 h de desidratação, e os dados obtidos são apresentados na Figura 4. Estes resultados confirmam a observação anterior de que o cultivar 'Manteigão Fosco 11' tem maior capacidade de acumular prolina que o cultivar 'Carioca', mesmo nas novas condições de desidratação (Figura 4). No entanto, a taxa de acúmulo de prolina não foi tão pronunciada como anteriormente (Figura 1), certamente por causa da menor velocidade de desidratação.

3.4. Efeito da Desidratação sobre a Composição de Proteínas e de Aminoácidos Livres das Folhas Primárias de Plantas Intactas

Com este experimento, procurou-se determinar se as plantas dos cultivares 'Manteigão Fosco 11' e 'Carioca', submetidos ao deficit hídrico, se comportavam de maneira semelhante às folhas isoladas. Informação adicional também foi obtida quanto ao comportamento das diversas frações nitrogenadas após a reidrata-

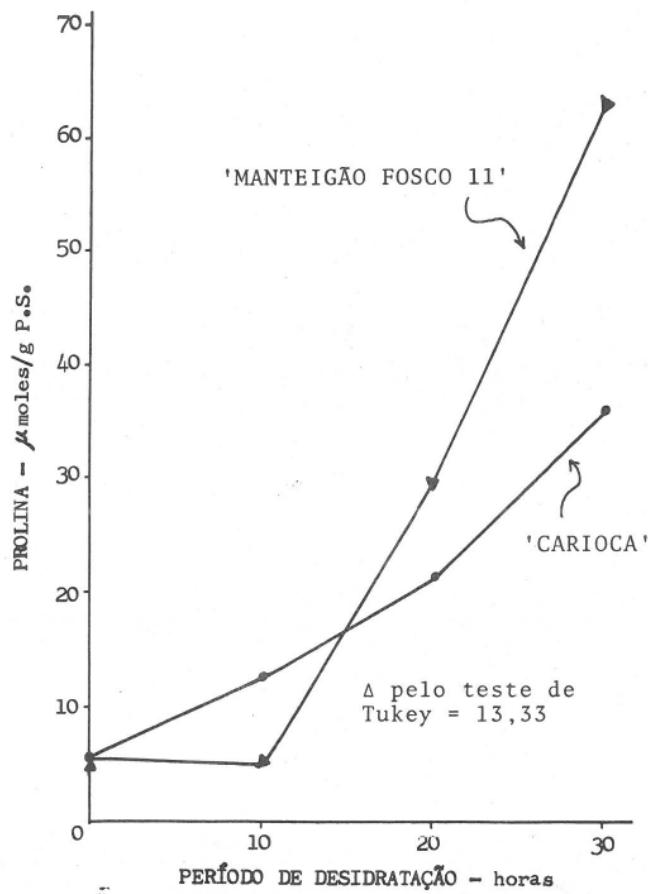


FIGURA 4 - Efeito da desidratação lenta e suave sobre o acúmulo de prolina em dois cultivares de feijão.

ção dos tecidos.

Todos os parâmetros estudados comportaram-se de forma semelhante nos dois cultivares (Quadro 2). Prolina livre, aminoácidos livres totais, proteínas solúveis e insolúveis acumularam-se consideravelmente com a desidratação, porém o seu teor baixou ao nível do controle irrigado, 24 horas após a recuperação da turgescência. Observação interessante foi obtida com relação ao acúmulo de prolina. Com folhas intactas, o cultivar 'Carioca' acumulou mais prolina que o 'Manteigão Fosco 11' (Quadro 2). SINGH *et alii* (25) determinaram que as folhas verdes são os locais de síntese da prolina que se acumula, e o acúmulo observado no caule e nas raízes era a consequência do transporte da prolina foliar. Assim, é possível que o 'Manteigão Fosco 11' ainda tenha acumulado mais prolina que o 'Carioca', como se demonstrou anteriormente, mas também tenha exportado mais aminoácidos para os caules e raízes. No entanto, não se dispõe de evidências para esta hipótese, no presente trabalho.

A forte redução do teor de prolina dos tecidos foliares, 24 horas após a reidratação, pode ser o resultado do transporte (15, 25) após sua conversão a glutamato, ornitina ou açúcares (15), ou da sua oxidação na própria folha (15, 17). É possível que prolina seja a principal fonte de energia nos primeiros momentos que sucedem à remoção do déficit hídrico (15, 23, 26).

QUADRO 2 - Efeito da desidratação sobre a composição de aminoácidos e proteínas das folhas primárias de plantas intactas dos cultivares de feijão 'Carioca' e 'Manteigão Fosco 11'.

Tratamento	Prolina (μmoles/g P.S.)	Aminoácidos livres totais (μ moles/g P.S.)	Proteína (mg/g P.S.)	
	Solúvel	Insolúvel		
Carioca				
Folhas túrgidas	2,1	112,0	19,8	95,8
Folhas com murcha severa	8,9	113,0	31,8	152,9
Folhas 24 horas após a irrigação	2,3	95,0	24,5	116,3
Manteigão Fosco 11				
Folhas túrgidas	3,0	129,0	14,7	94,4
Folhas com murcha severa	7,0	148,0	24,0	121,1
Folhas 24 horas após a irrigação	2,1	82,0	19,0	114,0

3.5. Efeito do Deficit Hídrico no Crescimento da Folha Primária de Quatro Cultivares de Feijão

Há indicações de que, dentro da mesma espécie, plantas que acumulam mais prolina, quando submetidas a condições desfavoráveis de desidratação, são também as que apresentam maior resistência à seca (7, 12, 22).

Um experimento preliminar foi realizado em casa-de-vegetação para se determinar se esta relação também se aplicava aos cultivares de feijão em estudo. Os resultados que se mostram nas Figuras 5 e 6 indicam que os cultivares 'Manteigão Fosco 11' e 'Rico 23' apresentaram maior crescimento da lâmina foliar durante o período de desidratação, e, após reinício da irrigação, também foram os que mais rapidamente se recuperaram do déficit hídrico. É importante informar

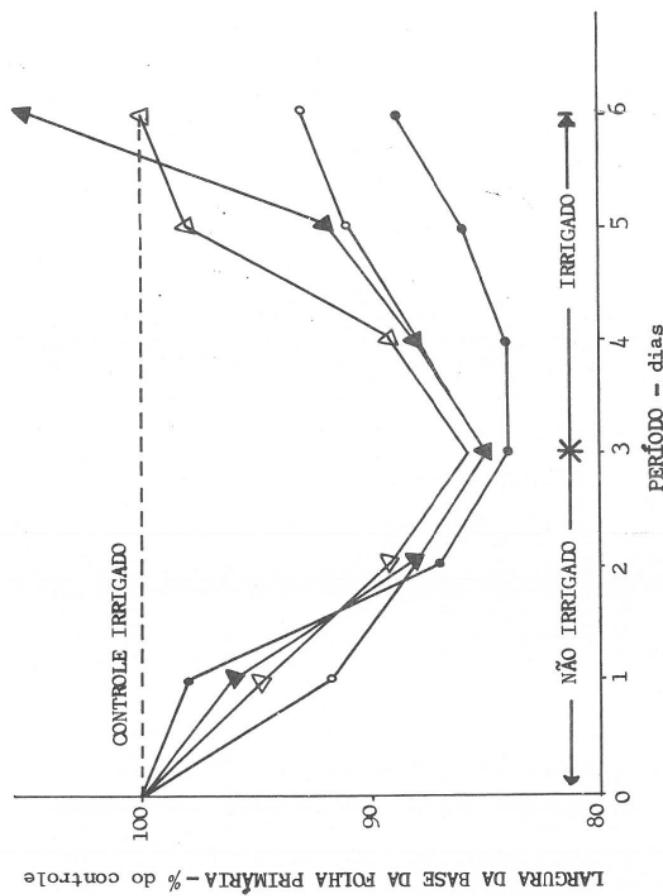


FIGURA 5 - Crescimento da largura da base da folha primária de quatro cultivares de feijão, durante e após um período de desidratação. Os resultados são expressos em percentagem do controle irrigado diariamente. 'Carioca' (●—●); 'Muleatinho' (○—○); 'Manteigão Fosco 11' (▲—▲); 'Rico 23' (△—△).

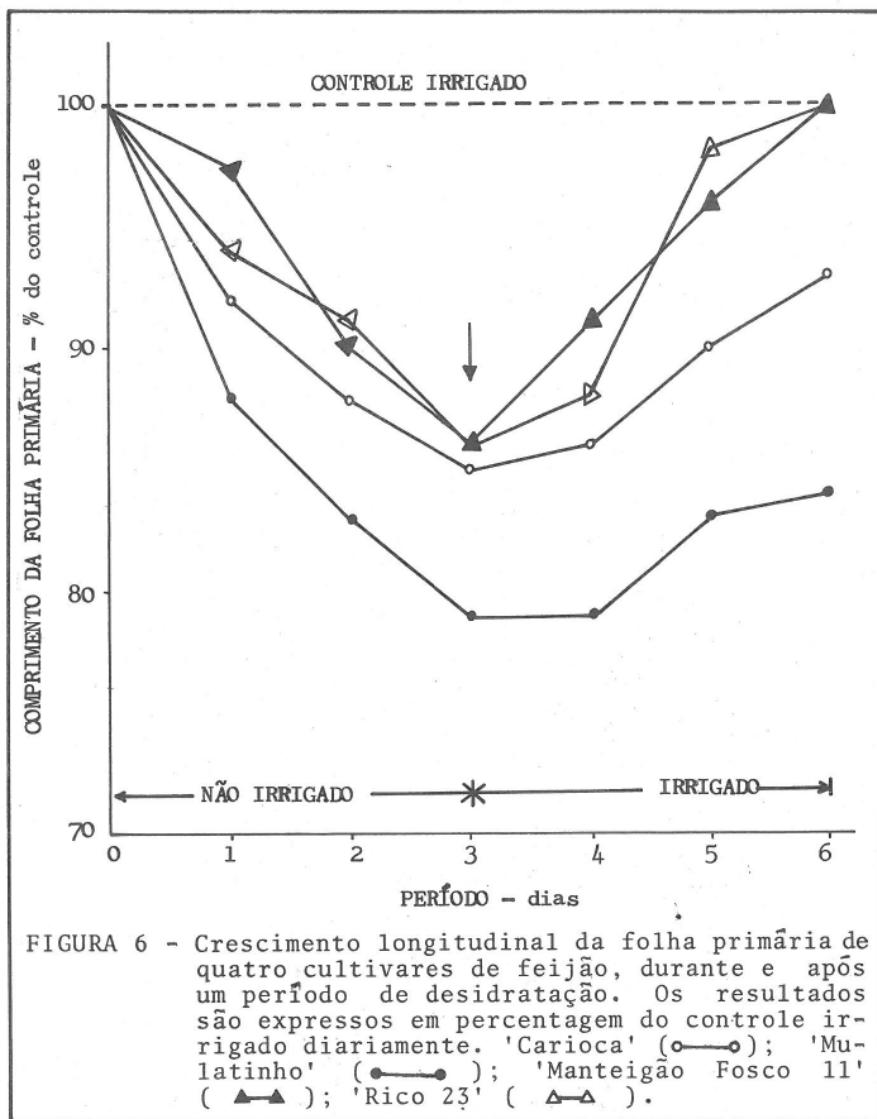


FIGURA 6 - Crescimento longitudinal da folha primária de quatro cultivares de feijão, durante e após um período de desidratação. Os resultados são expressos em percentagem do controle irrigado diariamente. 'Carioca' (○—○); 'Manteigão Fosco 11' (●—●); 'Latinho' (▲—▲); 'Rico 23' (△—△).

que dois dias após a suspensão da irrigação, algumas plantas distribuídas entre os quatro cultivares foram atacadas pelo fungo *Sclerotium rolfsii* Sacc., causando morte dos tecidos na região do coleto, o que às vezes resultou no tombamento, e consequente morte, de toda a planta. Neste particular o cultivar 'Manteigão Fosco 11' foi visivelmente o mais influenciado, e, provavelmente, o seu comportamento durante o déficit foi aquém do esperado em outras condições.

Ainda que este experimento indique que o 'Manteigão Fosco 11' e o 'Rico 23' (aqueles que mais acumularam prolina) sejam os que melhor suportam o déficit hídrico, dados de melhor expressão estatística devem ser obtidos antes de uma afirmação mais categórica.

4. RESUMO

Neste trabalho são discutidas uma técnica simples, precisa e de alta sensibilidade para a extração e quantificação de prolina livre, na presença de vários compostos aminados interferentes e as variações do teor de prolina livre, aminoácidos livres totais e proteínas em discos foliares e plantas inteiras de quatro cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidos a vários níveis de desidratação.

O cultivar 'Manteigão Fosco 11' foi o que mais acumulou prolina nas folhas isoladas, seguido dos cultivares 'Rico 23', 'Mulatinho' e 'Carioca', quando submetidos ao deficit hídrico. Os quatro cultivares comportaram-se de forma semelhante quanto ao acúmulo de aminoácidos livres totais. O teor de proteínas solúveis em tampão fosfato aumentou de forma consistente com a desidratação severa e rápida dos discos foliares, nos quatro cultivares. Quando plantas inteiras foram submetidas ao deficit hídrico, pela suspensão da rega, prolina, aminoácidos livres totais, proteínas solúveis e insolúveis acumularam-se consideravelmente; mas seu teor baixou ao nível do controle irrigado 24 horas após a recuperação da turgescência. Resultados preliminares foram obtidos, sendo que estes aparentemente suportam a hipótese de que o cultivar 'Manteigão Fosco 11', aquele que mais acumulou prolina, foi também o que melhor se comportou durante e após um único ciclo de desidratação das plantas intactas.

5. SUMMARY

A simple and sensitive method for the isolation and estimation of free proline in the presence of various interfering amino acids and the changes in the content of free proline, total free amino acids and proteins in dehydrated leaf discs and intact plants of four bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars are discussed. The cultivar 'Manteigão Fosco 11' accumulated the most proline in leaf discs when subjected to desiccation, followed by the 'Rico 23', 'Mulatinho' and 'Carioca'. Leaf discs of the four cultivars showed a similar pattern of accumulation of total free amino acids and proteins soluble in phosphate buffer, pH 7.0, under severe dehydration. When intact plants were subjected to water stress by withholding water, free proline, total free amino acids, and soluble and insoluble proteins accumulated to a high level, but their content decreased to the level of the watered control 24 hours after the recovering from the water deficit. The cultivar 'Manteigão Fosco 11' grew better under one cycle of desiccation and recovered faster after the water stress had been relieved.

6. LITERATURA CONSULTADA

1. BARNARD, R.A. & OAKS, A. Metabolism of proline in maize root tips. *Can.J.Bot.* 48:1155-1158. 1970.
2. BARNETT, N.M. & NAYLOR, A.W. Amino acid and protein metabolism in bermuda grass during water stress. *Plant Physiol.* 41:1222-1230. 1966.
3. CHEN, D., KESSLER, B. & MONSELISE, S.P. Studies on water regime and nitrogen metabolism of citrus seedlings grown under water stress. *Plant Physiol.* 39:379-386. 1964.
4. HSIAO, T.C. Rapid changes in levels of polyribosomes in *Zea mays* in response to water stress. *Plant Physiol.* 46:281-285. 1970.
5. HSIAO, T.C. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:519-570. 1973.
6. KEMBLE, A.R. & MACPHERSON, H.T. Liberation of amino acids in perennial ryegrass during wilting. *Biochem. J.* 58:46-50. 1954.
7. LEVITT, J. *Responses of plants to environmental stresses*. New York, Academic Press, 1972. 697 p.

8. MESSER, M. Interference by amino acids and peptides with the photometric estimation of proline. *Anal. Biochem.* 2:353-359. 1961.
9. MOORE, S. & STEIN, W.H. Photometric method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176:367-388. 1948.
10. PÁLFI, G. Changes in the amino acid content of detached wilting leaves of *Solanum laciniatum* Ait. in the light and in the dark. *Acta Agr. Acad. Scient. Hung.* 17:381-388. 1968.
11. PÁLFI, G. & BITÓ, M. Effect of the cold soil and physiological dryness on the amino acid metabolism of wheat, bean, sunflower and paprika. *Acta Biolog. Szeged.* 16:79-91. 1970.
12. PÁLFI, G. & JÚHASZ, J. The theoretical basis and practical application of a new method of selection for determining water deficiency in plants. *Plant Soil.* 34:503-507. 1971.
13. PROTSENKO, D.F., SHMAT'KO, I.G. & RUBANYUK, E.A. Drought hardiness of winter wheat varieties as related to their amino acid composition. *Fisiol. Rast.* 15:680-687. 1968.
14. RENA, A.B. The metabolism of proline, and the isolation and characterization of proline dehydrogenase and pyrroline-5-carboxylate reductase from pumpkin (*Cucurbita moschata*, Poir) seedlings. Ph.D. Thesis. University of Illinois, 1974. 107 p.
15. RENA, A.B. & SPLITTSTOESSER, W.W. The metabolism of proline in cotyledons of pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Plant Cell Physiol.* 15:681-686. 1974.
16. RENA, A.B. & SPLITTSTOESSER, W.E. Δ 1-pyrroline-5-carboxylate: the product of proline dehydrogenase from *Cucurbita moschata* cotyledons. *Phytochem.* 13:2081-2084. 1974.
17. RENA, A.B. & SPLITTSTOESSER, W.E. Proline-dehydrogenase from pumpkin (*Cucurbita moschata*) cotyledons. *Physiol. Plant.* 32:177-181. 1974.
18. RENA, A.B. & SPLITTSTOESSER, W.E. Proline dehydronase and pyrroline-5-carboxylate reductase from *Cucurbita moschata* cotyledons. *Phytochem.* 14:657-66. 1975.
19. ROUTLEY, D.G. Proline accumulation in wilted ladino clover leaves. *Crop. Sci.* 6:358-361. 1966.
20. SAUNIER, R.R., HULL, H.M. & EHRENREICH, J.H. Aspects of the drought tolerance in creosotebush (*Larrea divaricata*). *Plant Physiol.* 43:401-404. 1968.
21. SCHACTERLE, G.R. & POLLACK, R.L. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal. Biochem.* 51:654-655. 1973.
22. SINGH, T.N., ASPINALL, D & PALEG, L.G. Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. *Nature, New Biol.* 236:188-190. 1972.
23. SINGH, T.N., PALEG, L.G. & ASPINALL, D. Stress metabolism. I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:45-56. 1973.
24. SINGH, T.N., PALEG, L.G. & ASPINALL, D. Stress metabolism. III. Variations in response to water deficit in the barley plant. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:65-76. 1973.
25. SINGH, T.N., PALEG, L.G. & BOGESS, S.F. Stress metabolism. II. Changes

- in proline concentration in excised plant tissues. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:57-63.
26. STEWART, C.R., MORRIS, C.J. & THOMPSON, J.F. Changes in amino acid content of excised leaves during incubation. II. Role of sugar in the accumulation of proline in wilted leaves. *Plant Physiol.* 41:1585-1590. 1966.
27. STEWART, C.R. The effect of wilting on proline metabolism in excised bean leaves in the dark. *Plant Physiol.* 51:508-511. 1973.
28. STOCKER, O. Physiological and morphological changes in plants due to water deficiency. In: *Plant-water relationships in arid and semi-arid conditions*. UNESCO. Paris, 1960. p. 63-104.
29. THOMPSON, J.F., STEWART, C.R. & MORRIS, C.J. Changes in amino acid content of excised leaves during incubation. I. The effect of water content of leaves and atmospheric oxygen level. *Plant Physiol.* 41:1578-1584.
30. UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F. *Manometric techniques*. Revised Ed. Burgess. Minn., 1957. 33p.
31. WEATHERLEY, P.E. Studies in the water relations of cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. *New Phytol.* 49:81-97. 1950.