

EFEITO DA DESIDRATAÇÃO OSMÓTICA NO ACÚMULO DE PROLINA LIVRE EM DISCOS FOLIARES DE VINTE CULTIVARES DE FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.)*

Regina C.R. Machado
Alemar Braga Rena
Clibas Vieira**

1. INTRODUÇÃO

O acúmulo de prolina livre em decorrência do déficit hídrico está agora bem estabelecido (1, 2, 4, 5, 10, 11, 13, 14, 15, 16). O mecanismo desse acúmulo, entretanto, carece de maiores esclarecimentos (9), embora tenha sido sugerido anteriormente que ele ocorre às expensas de outros aminoácidos, durante o murchamento de folhas destacadas (3).

Tem-se observado que o acúmulo de prolina em decorrência do déficit hídrico ocorre em diversos órgãos da planta, porém as maiores concentrações foram encontradas na lâmina foliar de plantas de cevada (15) e na metade superior do caule de plantas de girassol (17). Constatou-se, também, que a capacidade de acumular prolina, em discos foliares, é maior nas folhas jovens (1, 4) e que menores acúmulos foram atingidos em folhas senescentes (1).

Recentemente, foi sugerida uma possível correlação positiva entre o acúmulo de prolina em plantas murchas e a resistência à seca, em várias espécies vegetais (7, 8, 12). Neste sentido, outros trabalhos evidenciaram a ocorrência de diferenças entre variedades quanto ao acúmulo de prolina em iguais condições de déficit hídrico, em plantas de cevada (12, 15) e de feijão (10).

O objetivo do presente estudo foi determinar diferenças entre cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidos a desidratação osmótica, com base no acúmulo de prolina livre em discos foliares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 cultivares de feijão provenientes dos Estados de Minas Gerais, Bahia e Sergipe (Quadro 1).

* Parte da tese apresentada pelo primeiro autor à U.F.V., como um dos requisitos para a obtenção do grau de «Magister Scientiae» em Fitotecnia.

Recebido para publicação em 14-06-1976.

** Respectivamente, Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Professor Adjunto e Professor Titular da U.F.V.

QUADRO 1 - Procedência das variedades de feijão utilizadas no presente trabalho.

Minas Gerais	Bahia	Sergipe
Ricopardo 896	Mulatinho Vagem Roxa	Milagre de São Antônio
Vermelho Rajado 1162	Sipeal - 2	Mulatinho Roxinho
Caraota 260	Favinha	Mulatinho Sempre Verde
Ricobaio 1014	Mulatinho Irecê	
Manteigão Fosco 11	Vila Nova	
Carioca	Enrica Homem	
Rico 23	Mulatinho Simétrico	
Cornell 49-242		
Seleção Cuva 168-N		
S - 182 - N		

Sete sementes de cada cultivar foram semeadas em recipientes plásticos, contendo, aproximadamente, 1,5 kg de terriço, tratado previamente com brometo de metila. Aproximadamente uma semana após o plantio, a planta mais uniforme em cada vaso era selecionada e mantida na casa-de-vegetação. Irrigaram-se diariamente todos os vasos, de forma a manter-se um teor adequado de água no solo.

Quando as folhas primárias das plantas de feijão alcançaram o tamanho máximo (aproximadamente aos 15 dias após a semeadura), as plantas foram levadas ao laboratório no dia anterior à realização dos experimentos. As amostras para a determinação de prolina consistiram em grupos de cinco discos com 1 cm de diâmetro, obtidos das folhas primárias. A determinação do peso da matéria seca dos discos foi feita após a secagem em estufa, com ventilação forçada, a 65°C, durante 3 dias.

Estudou-se a variação do teor de prolina livre nos 20 cultivares, usando-se discos obtidos das folhas túrgidas. Com esta finalidade, os discos eram removidos e submersos, rapidamente, em 2 ml de uma solução de metanol, clorofórmio e água (M.C.A., 12:5:1 v/v/v).

Nos estudos com tecidos desidratados, o déficit hídrico era obtido colocando-se grupos de 15 discos de cada cultivar para flutuar diretamente em 15 ml de solução de manitol, dentro de placas de Petri, sob luz fluorescente contínua de 4,5 klux. Foram estudados os efeitos da desidratação produzida por solução de manitol de -10 atm por 30h e -20 atm por 15 e 30h. Todas as soluções de manitol utilizadas foram preparadas em tampão Tris. Cl, 50mM, pH 7.0. Após as diversas modalidades de desidratação, três grupos de 5 discos eram tomados, ao acaso, de cada placa de Petri, de forma a se obterem três repetições, submersos em 2 ml de M.C.A., e mantidos a -15°C, até o momento das análises químicas.

A extração e dosagem de prolina foram realizadas exatamente como descritas por RENA e MASCIOTTI (10). Todos os experimentos foram conduzidos de

acordo com um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teor de Prolina Livre em Folhas Túrgidas

O teor de prolina livre extraído de discos foliares túrgidos, logo após sua remoção da planta, encontra-se no Quadro 2. Os teores de prolina variaram de 0,15 a 0,31 mg. g⁻¹P.S., sendo que os cultivares 'Vermelho Rajado 1162' e 'Manteigão Fosco 11' apresentaram os valores mais elevados, enquanto o 'Mulatinho Vagem Roxa' e o 'Ricopardo 896' apresentaram os valores mais baixos. Em termos quantitativos, esses resultados concordam com os encontrados por SINGH *et alii* (12), em folhas túrgidas de cevada, mas, com relação a diferenças entre variedades, são concordantes com os dados encontrados por PROTSENKO *et alii* (8), em trigo.

QUADRO 2 - Teor de prolina livre em discos foliares túrgidos, imediatamente após sua remoção das plântulas (1)

Cultivares	Prolina livre (mg . g ⁻¹ .P.S.)
Vermelho Rajado 1162	0,316 a
Manteigão Fosco 11	0,284 ab
Vila Nova	0,275 ab
S - 182 - N	0,270 abc
Mulatinho Sempre Verde	0,265 abcd
S. Cuva 168 - N	0,258 abcde
Milagre de Santo Antônio	0,256 abcde
Carioca	0,255 abcde
Mulatinho Irecê	0,243 abcde
Caraota 260	0,236 abcde
Cornell 49-242	0,236 abcde
Enrica Homem	0,228 abcde
Mulatinho Simétrico	0,226 abcde
Sipeal - 2	0,223 abcde
Ricobaio 1014	0,218 abcde
Mulatinho Roxinho	0,218 abcde
Favinha	0,201 bcde
Rico 23	0,169 cde
Ricopardo 896	0,165 de
Mulatinho Vagem Roxa	0,158 e

(1) As médias compreendidas por uma mesma letra não diferem significativamente (P<0,05), pelo teste de Tukey.

Neste trabalho, os cultivares 'Vermelho Rajado 1162', 'Vila Nova' e 'Manteigão Fosco 11' diferiram ($P < 0,05$) do 'Rico-23', 'Ricopardo' e 'Mulatinho Vagem Roxa', sendo que o 'Vermelho Rajado 1162' diferiu também ($P < 0,05$) do 'Favinha'. Essas diferenças significativas na concentração de prolina livre, em discos foliares túrgidos estão, indubitavelmente, associadas às características do próprio cultivar.

3.2. Efeito da Desidratação Sobre o Acúmulo de Prolina Livre

As concentrações de prolina livre em discos foliares submetidos à desidratação osmótica severa, pela flutuação em soluções aquosas de manitol a -20 atm de potencial hídrico, durante 30 h, são apresentadas no Quadro 3. Observa-se que os acúmulos de prolina, em condições de déficit hídrico severo, são muito mais elevados que os teores do controle túrgido (Quadros 2 e 3 e Figura 1), à semelhança do que tem sido observado em feijão e em outras espécies cultivadas (1, 4, 8, 10, 12, 17). Os resultados referentes aos acúmulos de prolina em discos foliares submetidos à desidratação suave, pela flutuação em solução aquosa de manitol a -10 atm por 30 h, e à desidratação severa -20 atm por 15 h encontram-se na Figura 1. Nota-se que os valores de prolina sob déficit suave são relativamente altos para os cultivares em geral, entretanto, os valores mais altos são apresentados pelos cultivares 'Enrica Homem', 'S — 182 — N', 'Manteigão Fosco 11' e 'Milagre de Santo Antônio'. Os cultivares 'Rico 23', 'Carioca', 'Caraota 260' e 'Ricopardo 896' não apresentam diferenças muito acentuadas em prolina acumulada sob desidratação suave e severa. Nesta situação, admite-se que esses cultivares tenham perdido água com mais rapidez, mesmo nas condições de desidratação suave, e que no déficit hídrico severo tenha ocorrido irregularidade em certos aspectos metabólicos (8), sem contudo haver grandes acúmulos de prolina livre.

É interessante notar que o cultivar 'Vermelho Rajado 1162', que acumulou muita prolina em desidratação severa, aparece com um valor relativamente baixo de prolina, no déficit hídrico suave. Parece que no feijão ocorrem, como na cevada (15), reações metabólicas diferentes entre genótipos, quando submetidos a iguais condições de déficit hídricos, mesmo que sejam suaves.

Quando os discos foliares flutuaram em solução de manitol (-20 atm por 15 e 30 h, Figura 1), as concentrações de prolina foram mais elevadas que as obtidas em discos túrgidos e nos desidratados suavemente (Quadro 2, Figura 1). Nota-se que os cultivares 'Vermelho Rajado 1162' e 'Manteigão Fosco 11' não diferem entre si ($P > 0,05$) no controle túrgido nem nas condições de desidratação severa induzida por manitol (-20 atm por 30 h). É interessante observar que esses cultivares foram os que apresentaram maior teor de prolina quando túrgidos e quando submetidos à desidratação severa. Esses resultados, entretanto, não concordam com os encontrados por PROTSENKO *et alii* (8), em plantas de trigo, em que o cultivar que apresentou maior teor de prolina em condições ótimas de turgidez foi o que menos acumulou este aminoácido, quando submetido ao déficit hídrico.

Os valores da Figura 1 mostram que o aumento no teor de prolina foi, em geral, muito grande logo nas primeiras 15 h de desidratação severa; entretanto, o 'Manteigão Fosco 11' acumulou relativamente pouca prolina neste período. O aumento no teor de prolina livre, das 15 às 30 h de desidratação osmótica, foi relativamente pequeno, em todos os cultivares, à exceção do 'Manteigão Fosco 11', que acumulou quase o dobro do valor determinado nas primeiras 15 h. Como os cultivares, em geral, apresentaram maior acúmulo de prolina durante o primeiro período de desidratação severa (-20 atm/15 h), é provável que eles tenham perdido água com maior velocidade, em relação ao 'Manteigão Fosco 11'. É possível, também, que o 'Manteigão Fosco 11' acumule prolina mais lentamente, enquanto os demais cultivares acumulam-na mais rapidamente durante as primeiras horas do déficit hídrico, aumentando muito pouco o teor de prolina posteriormente.

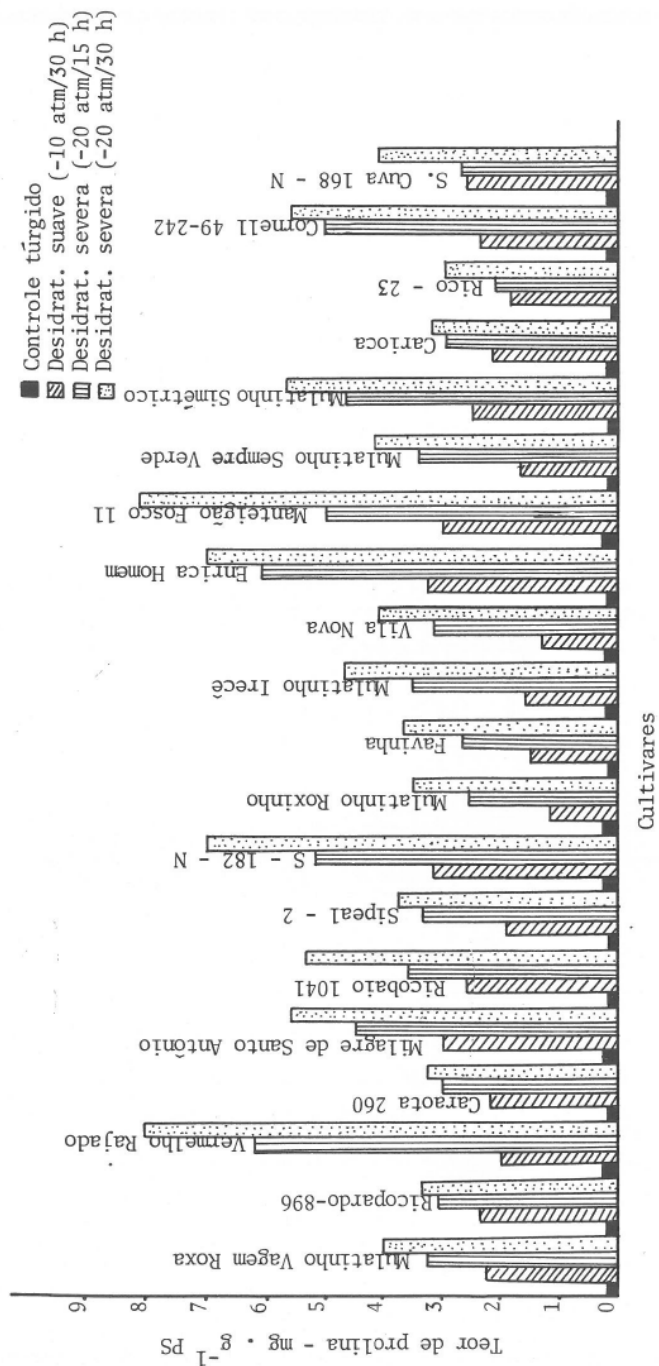
Os resultados da desidratação severa (-20 atm/30 h), vistos no Quadro 3 e na Figura 1, mostram que, nessas condições, o 'Manteigão Fosco 11' e o 'Vermelho Rajado 1162' apresentaram os mais altos valores de prolina, diferindo ($P < 0,05$) de todos os cultivares estudados. Os cultivares 'Enrica Homem' e 'S — 182 — N', embora com acúmulos de prolina inferiores ($P < 0,05$) aos dois primeiros, apresentaram acúmulos superiores ($P < 0,05$) aos demais. Observa-se que os cultivares 'Milagre de Santo Antônio', 'Mulatinho Simétrico', 'Cornell 49-242' e 'Ricobaio 1014' constituem grupos intermediários, com acúmulos e prolina superiores a 5,0 mg por grama de peso da matéria seca. Os cultivares 'Carioca' e 'Rico 23' apresentaram baixíssimos acúmulos de prolina, com relação ao controle túrgido, dife-

QUADRO 3 - Efeito da desidratação ocasionada por solução aquosa de manitol, a -20 atm de potencial hídrico, aplicado por 30 h, sobre o acúmulo de prolina livre em discos foliares de feijão (1)

Nível de acúmulo de prolina	Cultivares	Teor de prolina (mg . g ⁻¹ .P.S.)
ALTO	Manteigão Fosco 11	8,126 a
	Vermelho Rajado 1162	8,029 a
	Enrica Homem	6,994 b
	S - 182 - N	6,961 b
MÉDIO	Milagre de Santo Antônio	5,763 c
	Mulatinho Simétrico	5,725 c
	Cornell 49-242	5,684 c
	Ricobaio 1014	5,453 c
BAIXO	Mulatinho Irecê	4,863 d
	Mulatinho Sempre Verde	4,238 e
	S. Cuva 168 - N	4,130 e
	Vila Nova	4,126 e
	Mulatinho Vagem Roxa	4,020 ef
	Sipeal - 2	3,898 efg
	Favinha	3,804 efgh
	Mulatinho Roxinho	3,647 fghi
	Ricopardo 896	3,456 ghi
	Caraota 260	3,337 hij
	Carioca	3,265 ij
	Rico 23	2,976 j

(1) As médias compreendidas por uma mesma letra não diferem significativamente ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

rindo ($P < 0,05$) de todos cultivares, exceto do 'Caraota 260'. Essas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os cultivares de feijão, em iguais condições de desidratação osmótica, podem ser atribuídas a reações diferentes dos cultivares, em certos aspectos metabólicos, à semelhança do que foi observado em cevada (12, 15) e em feijão (10). Pressupõe-se que os cultivares que acumularam mais prolina em condições de desidratação osmótica reajam melhor aos deficit hídricos (7, 12), considerando-se que a prolina é um aminoácido altamente hidrofílico e capaz de estabilizar colóides e processos metabólicos no tecido (8) e de armazenar carbono, nitrogênio e energia (9).



Cultivares

FIGURA 1 - Efeito do deficit hídrico suave e severo, produzido por solução aquosa de manitol, sobre o teor de prolina livre, em discos foliares de feijão.

4. RESUMO

Determinou-se o efeito da desidratação osmótica, com manitol, sobre o acúmulo de prolina livre em discos das folhas primárias de vinte cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Em condições de desidratação osmótica, tanto suave (-10 atm/30 h) quanto severa (-20 atm/15 e 30 h), os cultivares, em geral, apresentaram altos acúmulos de prolina livre, com relação ao controle túrgido. Entretanto, os cultivares 'Manteigão Fosco 11' e 'Vermelho Rajado 1162' apresentaram os mais elevados teores de prolina, destacando-se dos demais cultivares estudados. Os dados obtidos permitiram o agrupamento dos cultivares em três níveis de acúmulo de prolina: alto, médio e baixo. Observou-se que, em condições naturais de turgidez, existem diferenças significativas ($P < 0,05$) no teor de prolina entre os cultivares de feijão estudados. Os cultivares 'Manteigão Fosco 11', 'Vermelho Rajado 1162', 'Enrica Homem' e 'S — 182 — N' acumularam mais prolina quando submetidos à desidratação osmótica do que os outros cultivares.

5. SUMMARY

Changes in the content of free proline in osmotic dehydrated discs of the primary leaves of 20 bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars are discussed. There are differences among the cultivars in relation to their content of free proline in turgid leaf discs. All cultivars accumulated high levels of free proline as compared to the turgid control both in the mild (-10 atm /30 hours) and severe (-20 atm/15 e 30 hours) osmotic desiccation. The data indicate that the cultivars could be separated into three groups according to their ability to accumulate proline: high, intermediate and low accumulators. The cultivars 'Manteigão Fosco 11' and 'Vermelho Rajado 1162' accumulated the most and the 'Rico-23' the least proline.

6. LITERATURA CITADA

1. ARCAY, J.J.M. & RENA, A.B. Desidratação, substâncias reguladoras do crescimento, potássio, concentração hidrogeniônica, idade da folha e o acúmulo de prolina em discos foliares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Rev. Ceres* (No prelo). 1977.
2. BARNETT, N.W. & NAYLOR, A.W. Amino acid and protein metabolism in bermuda grass, during water stress. *Plant Physiol* 41:1222-1230. 1966.
3. KEMBLE, D.R. & MACPHERSON, H.F. Liberation of amino acids in perennial ryegrass during wilting. *Biochem J.* 58:46-49. 1954.
4. MADRUGA, L.A.N. & RENA, A.B. Variações no teor de prolina livre em folhas destacadas de cinco cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas à desidratação. *Rev. Ceres.* (No prelo). 1977.
5. PÁLFI, G. & BITO, M. Effect of the cold soil and physiological dryness on the amino acid metabolism of wheat, bean, sunflower and paprika. *Acta Biol. Szeged.* 16:79-91. 1970.
6. PÁLFI, G., BITO, H. & PÁLFI, Z. Free proline and water deficits in plant tissues. *Sov. Plant Physiol* 20:233-238. 1973.
7. PÁLFI, G. & JÚHÁSZ, 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.
8. PROTSENKO, D.F., SHMAT'KO, S.G. & RUBANYUK, E.A. Drought resistance of winter wheats in relation to their amino acid content. *Sov. Plant Physiol.* 15:630-687. 1968.
9. 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*. University of Illinois, 1973. 107 p. (Ph.D. thesis).
10. RENA, A.B. & MASCIOTTI, G.Z. Efeito do deficit hídrico sobre o metabolismo do nitrogênio e o crescimento de quatro cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.) *Rev. Ceres* 23:288-301. 1976.
 11. ROUTLEY, D.G. Proline accumulation in wilted ladino clover leaves. *Crop. Sci.* 6:358-361. 1966.
 12. 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. 1972.
 13. SINGH, T.N., PALEG, L.G. & ASPINALL, D. Stress metabolism. II. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:57-63. 1973.
 14. SINGH, T.N., PALEG, L.C. & ASPINALL, D. Stress metabolism I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:45-56. 1973.
 15. 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.
 16. 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. 1966.
 17. WAMPLE, R.L. & BEWLEY, J.D. Proline accumulation in flooded and wilted sunflower and the effects of benzyladenine and abscisic acid. *Can. J. Bot.* 53:2893-2896. 1975.