

Maio e Junho de 1977

VOL. XXIV

N.º 133

Viçosa — Minas Gerais

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

VARIAÇÕES NO TEOR DE PROLINA LIVRE EM FOLHAS DESTACADAS DE CINCO CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) SUBMETIDAS À DESIDRATAÇÃO*

L.A.N. Madruga
A.B. Rena**

1. INTRODUÇÃO

A concentração do aminoácido prolina aumenta consideravelmente nas folhas das plantas desidratadas de várias espécies (2, 4, 11, 18). Observou-se que este aumento no teor de prolina livre foi devido principalmente à síntese *de novo*, uma vez que a quantidade encontrada foi maior do que a esperada pela degradação de proteínas (4).

Estudos sobre o acúmulo de prolina em relação a deficiências hídricas são preferencialmente conduzidos em folhas destacadas da planta, em razão da rapidez na obtenção do murchamento, pois, na planta intacta, isto só é conseguido após muitas horas ou mesmo dias, dependendo da taxa relativa de absorção de água e da transpiração (17). Além disso, há mais facilidade de manuseio do material estudado e maior possibilidade de uma desidratação uniforme dos tecidos foliares, mediante o controle das condições ambientes.

Em plantas de fumo sob condições hídricas normais, verificou-se que o teor de prolina era maior nas folhas jovens do que nas folhas velhas (6). Nesta mesma espécie, encontrou-se que, quando do início da floração, havia um gradiente no teor de prolina no caule aumentando da base para o ápice (21).

Ainda não existem evidências experimentais concretas sobre o papel fisiológico do acúmulo de prolina quando a planta, ou determinada parte dela, se encontra em condições de déficit de água. Sugeriu-se que este aminoácido seja um composto armazenador de carbono, e, conseqüentemente, de energia, e de nitrogênio, necessários para a continuação do crescimento, que foi paralisado durante a deficiência hídrica dos tecidos (2, 12, 14, 20). Outras possíveis funções seriam aumentar a hidratação do protoplasma ou neutralizar a amônia acumulada em conseqüência da degradação das proteínas, ocorrida durante o período de seca dos tecidos (10).

* Parte da tese de M.S. apresentada, pelo primeiro autor, à U.F.V., para completar as exigências do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. Projeto n.º 41.029 do Conselho de Pesquisa da U.F.V.

Recebido para publicação em 15-06-1976.

** Respectivamente, Professor Assistente do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas, bolsista de Pós-Graduação da CAPES durante a realização deste trabalho e Professor Titular do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil, bolsista do CNPq.

Presentemente, dá-se grande importância à possibilidade de usar a capacidade da planta para acumular prolina como um parâmetro fisiológico de sua resistência e/ou tolerância à seca (12, 16, 22). A capacidade potencial da planta para acumular prolina parece variar diretamente com a capacidade de produção do genótipo sob condições hídricas adversas (13). Então, mediante essa manifestação da planta, haveria a possibilidade de se estabelecer um método de seleção de cultivares resistentes à seca (9, 13).

Este trabalho teve como objetivo principal estudar as variações do teor de prolina livre em folhas destacadas de cinco cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas ao murchamento em condições de laboratório. São também discutidas as diferenças de velocidade de perda de água pelas folhas destacadas dos cinco cultivares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizados os cultivares de arroz IAC-5100, IAC-1246, IAC-435, Batatais, e Agulha ESAV linha 27. Todos eles foram cultivados em casa-de-vegetação, em vasos de plástico de 15 litros de capacidade, contendo solo fértil misturado com esterco curtido na proporção de 1:1. Em cada vaso foram semeadas sementes suficientes para se obterem cerca de 120 plantas. A quantidade de água do solo foi sempre mantida num nível considerado ótimo para as plantas. Os vasos com plantas de arroz com 18 dias, contados após a semeadura, foram levados da casa-de-vegetação para o laboratório, onde permaneceram algumas horas antes de ser iniciado o experimento. A primeira folha das plantas, contada da base para o ápice, foi destacada, pesada rapidamente numa balança de torsão com precisão de 1 mg, e colocada, suspensa por filó, em bandejas de plástico. Estas continham sob o filó, água livre, e estavam cobertas com uma folha de polietileno flexível e transparente, evitando-se, desta maneira, uma desidratação muito rápida dos tecidos foliares. Em outras bandejas, folhas de arroz foram mantidas como testemunhas nas mesmas condições, porém com suas bases mergulhadas em água. As bandejas foram conservadas continuamente sob luz fluorescente a 4,8 klux, com a temperatura ambiente variando entre 26 e 27°C. A intervalos de tempo de 0, 10, 20, 30 e 40h foram tiradas amostras de folhas, sendo elas pesadas novamente, cortadas em secções de aproximadamente 15 mm e submergidas em 2 ml de uma mistura de metanol-clorofórmio-água (12:5:1 v/v/v) a -10°C. Estas amostras foram utilizadas, posteriormente, para as determinações de prolina livre.

Foi realizado um experimento com folhas destacadas de diferentes idades para verificar a influência da idade do tecido foliar sobre o acúmulo de prolina. Para isto, usaram-se a primeira, a segunda, a terceira e a quarta folhas, contadas a partir da base, de plantas do cultivar IAC-435, com 30 dias de idade, procedendo-se como no experimento com folhas destacadas, descrito anteriormente.

A extração e a dosagem da prolina livre foram realizadas conforme o método descrito por RENA e MASCIOTTI (11). A perda de umidade pelos tecidos foi determinada pelas pesagens das amostras no início e no fim do período de desidratação, obtendo-se, deste modo, o peso fresco (PF) e o peso murcho (PM), respectivamente. Por meio desses valores, calculou-se o teor relativo de água simplificado (Φ s), aplicando-se a equação

$$\Phi s = \frac{PM}{PF} \times 100$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito do Período de Desidratação sobre a Perda de Água pelas Folhas

Os teores relativos de água simplificados das folhas são apresentados no Quadro 1. Verifica-se que houve uma perda de água demasiadamente intensa no início do experimento, ocasionando um significativo déficit de saturação das folhas nas primeiras 20 h. Isto ocorreu, principalmente, como resultado da alta luminosidade do ambiente em que foi conduzido o experimento. Seria desejável que a desidratação inicial fosse mais lenta, o que possibilitaria a obtenção de uma faixa de valores mais adequada aos estudos a serem realizados.

QUADRO 1 - Efeito do período de desidratação sobre o teor relativo de água de folhas destacadas de cinco cultivares de arroz*.

Período de desidratação horas	Teor relativo de água (\pm s)%				
	Cultivares				
	ESAV-27	IAC-1246	Batatais	IAC-5100	IAC-435
0	100,0 a**	100,0 a	100,0 a	100,0 a	100,0 a
10	76,2 a	76,7 a	76,1 a	77,6 a	72,0 b
20	57,0 ab	55,5 ab	58,6 b	57,2 ab	52,3 a
30	48,7 b	56,4 a	54,6 a	48,1 b	46,4 b
40	47,6 b	38,5 a	49,1 b	38,6 a	39,1 a

* Valores médios de 4 repetições, com duas folhas cada uma.

** Os valores seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente entre cultivares, ao nível $P > 0,05$, pelo teste de Tukey.

Observa-se também que houve diferenças significativas, entre cultivares, com relação à intensidade de perda de água. Estas diferenças foram devidas, provavelmente, aos diferentes comportamentos dos genótipos, pois não deve ter havido grandes variações nos fatores ambientes, tais como temperatura e umidade relativa, por causa das pequenas dimensões das bandejas que continham as amostras. Isto resultou em que os teores de água, depois de determinados períodos de desidratação, foram muito diferentes. Por exemplo, os cultivares ESAV-27 e IAC-1246 diferiram significativamente em 30 e 40 h de desidratação, porém, como se observa no Quadro 1, com ordens diferentes.

Resultados mais satisfatórios quanto às respostas esperadas na desidratação poderiam ter sido alcançados com o emprego de meios osmóticos adequados, como manitol ou Carbowax-4000. Estes possibilitariam mais baixos teores de água dos tecidos, porém mais uniformes. No presente trabalho esta técnica não foi usada em razão de dúvidas existentes quanto a possíveis alterações do metabolismo dos tecidos ocasionadas por tais substâncias. Entretanto, trabalhos recentes feitos em coleóptilos de aveia mostram que a desidratação com manitol e Carbowax-4000 interfere na síntese de proteínas do mesmo modo que uma deficiência hídrica (3). Isto indica que esses compostos agem sobre a atividade metabólica da planta, mas de maneira indireta, isto é, mediante o desenvolvimento de um déficit hídrico.

3.2. Variação do Teor de Prolina Livre em função do Teor Relativo de Água

A concentração de prolina nas folhas dos cinco cultivares aumentou com a diminuição de Φ_s (Figura 1). Para valores de Φ_s ligeiramente inferiores a 80%, ocorreu uma mudança na taxa de acúmulo de prolina, indicando a existência de um valor limite de teor relativo de água a partir do qual ocorre uma orientação do metabolismo foliar no sentido de acumular prolina. Este valor limite não foi tão nítido como o obtido para plantas intactas de arroz em murchamento (5), provavelmente em razão da rápida desidratação ocorrida nas primeiras fases do déficit hídrico. O limite mínimo de teor de água nos tecidos foliares requerido para o rápido acúmulo de prolina, aparentemente, não diferiu entre os cinco cultivares estudados, semelhantemente ao observado com plantas intactas de arroz (5). A existência de um valor limite para o acúmulo de prolina foi também observada em soja e sorgo (22).

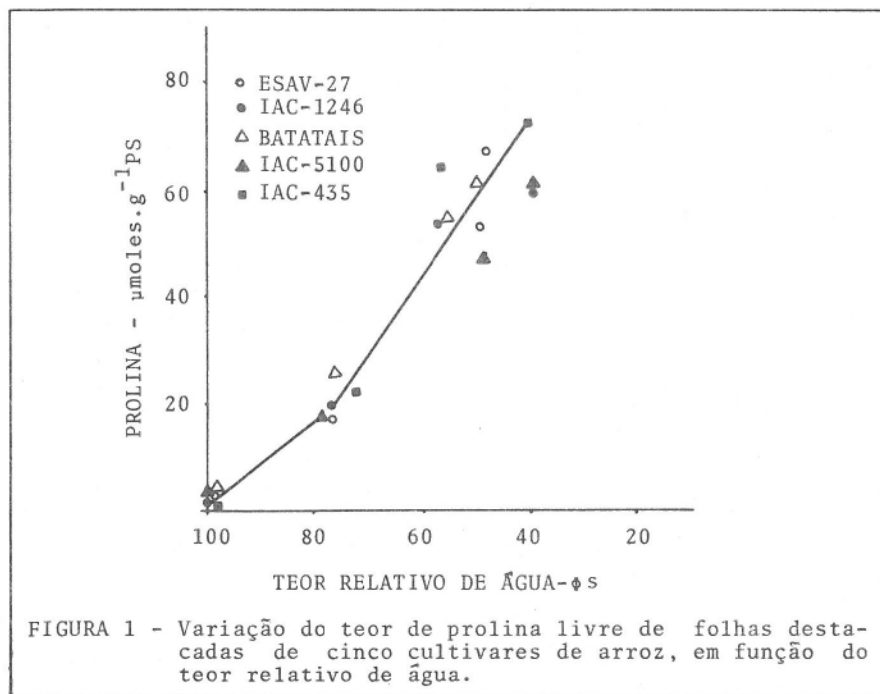


FIGURA 1 - Variação do teor de prolina livre de folhas destacadas de cinco cultivares de arroz, em função do teor relativo de água.

3.3. Efeito do Período de Desidratação sobre o Teor de Prolina Livre

Os resultados obtidos no experimento delineado para verificar o efeito do período de desidratação sobre o teor de prolina livre de folhas destacadas de arroz são apresentados no Quadro 2. Verifica-se que, após 40 h de desidratação, houve um aumento no teor de prolina livre de cerca de 38 vezes no cultivar que menos acumulou a 53 vezes no cultivar que mais acumulou. Esses valores confirmam os resultados encontrados em folhas destacadas de *Solanum laciniatum* Ait. (7), feijão (11, 17, 19) e cevada (15) submetidas a murchamento.

Como se discutiu anteriormente, a grande desuniformidade na perda de água pelas folhas destacadas dos cinco cultivares faz com que seja muito difícil tecer considerações sobre possíveis diferenças existentes entre os cultivares quanto ao acúmulo de prolina. No entanto, as concentrações de prolina livre das folhas destacadas murchas foram bastante semelhantes às das plantas inteiras nos mesmos níveis de desidratação (5).

Neste trabalho, usaram-se como testemunhas folhas destacadas mantidas no mesmo ambiente experimental, porém, com suas bases mergulhadas em água. Também houve um aumento no teor de prolina, sendo que, após 40h, este aumento variou de aproximadamente 7 vezes no cultivar que menos aumentou a 15 vezes no cultivar que mais aumentou, em relação à determinação feita a 0 h. No entanto, estes valores são consideravelmente menores do que aqueles encontrados para folhas murchas, como se pode verificar por meio do Quadro 3. Neste experimento, mesmo procurando-se manter túrgidas as folhas destacadas das testemunhas durante o intervalo experimental, houve uma pequena desidratação (Quadro 3). Essa pequena perda no teor de água foi, possivelmente, uma das causas responsáveis pelo aumento do teor de prolina das folhas testemunhas (túrgidas) no decorrer do experimento, mas não a única. Esta conclusão baseia-se no fato de que estas folhas testemunhas, mantidas por 40h nessas condições, apresentaram um significativo aumento em prolina, mesmo estando elas com teores de umidade semelhantes aos de folhas de menor tempo de incubação. PALFI e BITO (8) observaram, porém, que em folhas destacadas túrgidas

das de girassol e feijoeiro não houve aumento no teor de prolina, mesmo estando elas em estado saturado de água. Em experimento semelhante realizado com feijoeiro (11), foi observado que o teor de prolina de discos de folhas primárias túrgidas também aumentou com o tempo, sobretudo a partir de 10 h. Resultados semelhantes foram obtidos com folhas destacadas de cevada (15), as quais acumularam prolina rapidamente após um período de defasagem inicial de 16 h, mesmo estando os tecidos foliares flutuando em água.

QUADRO 2 - Efeito do período de desidratação sobre o teor de prolina livre em folhas destacadas de cinco cultivares de arroz*.

Período de desidratação horas	Teor de prolina - $\mu\text{moles.g}^{-1}\text{P.S.}$				
	Cultivares				
	ESAV-27	IAC-1246	Batatais	IAC-5100	IAC-435
0	1,7 a**	1,1 a	1,2 a	1,6 a	1,7 a
10	16,7 a	19,5 ab	26,0 b	17,2 a	21,8 ab
30	52,9 a	53,3 ab	54,7 ab	47,7 a	63,5 c
40	67,0 ac	58,9 b	61,0 ab	61,2 ab	72,2 c

* Valores médios de 4 repetições, com duas folhas cada uma, após subtração do controle túrgido.

** Os valores seguidos pela mesma letra não diferiram significativamente entre cultivares, ao nível de $P > 0,05$, pelo teste de Tukey.

Pelos motivos recém-expostos, parece que, além do déficit hídrico, outro componente atua no metabolismo, provocando o aumento do teor de prolina a partir de determinado período de tempo. O objetivo deste trabalho não foi avaliar com detalhe a natureza deste componente. Acredita-se, no entanto, que o fenômeno da senescência possa estar, de alguma forma, relacionado com este aumento de prolina em folhas destacadas túrgidas (1).

3.4. Influência da Idade do Tecido sobre o Acúmulo de Prolina de Folhas Destacadas

Para verificar a influência da idade do tecido sobre o acúmulo de prolina em folhas de arroz, removeu-se a primeira, a segunda, a terceira e a quarta folhas de plantas do cultivar IAC-435, com 30 dias de idade, submetendo-as a murchamento por 22h. Os resultados obtidos, bem como as variações nos teores de água tanto das folhas murchas como das túrgidas (testemunha), são apresentadas na Figura 2.

Prolina constitui grande porção do conteúdo de aminoácidos livres em folhas jovens de fumo, enquanto folhas velhas contêm grande quantidade de outros aminoácidos, que não a prolina, conforme os estudos de MIZUSAKI *et alii* (6). Em feijoeiro, também foi verificado maior teor de prolina nas folhas túrgidas mais jovens (1). Pelos resultados mostrados na Figura 2 vê-se que os tecidos mais jovens acumularam mais prolina que os tecidos mais velhos, quando submetidos a murchamento, como se observou em folhas de feijão (1). Então, é possível que o elemento fundamental determinante das diferenças no aumento do teor de prolina da primeira para a quarta folha esteja relacionado com o metabolismo das folhas e não com seu teor de água.

QUADRO 3 - Efeito do período de incubação de folhas destacadas túrgidas de cinco cultivares de arroz sobre os teores de água e prolina*.

Período de incubação - horas-	Cultivares Batatais				IAC-5100				IAC-435			
	ESAV-27	IAC-1246	Teores **		Teores		Teores		Teores		Teores	
	água prolina	água prolina	água prolina	água prolina	água prolina	água prolina	água prolina	água prolina	água prolina	água prolina	água prolina	água prolina
0	100,0	1,7	100,0	1,1	100,0	1,2	100,0	1,6	100,0	1,7	100,0	1,7
10	98,3	3,0	95,6	2,2	97,6	2,4	99,0	2,8	94,6	3,9	94,6	3,9
20	95,3	2,4	93,4	2,6	94,0	1,6	93,4	2,4	91,6	2,5	91,6	2,5
30	95,1	5,7	90,5	6,5	***	*	91,3	7,4	***	*	93,8	15,1
40	96,5	11,6	96,9	9,7	94,8	17,7	90,6	10,6	93,8	15,1	93,8	15,1

* Valores médios de duas repetições, com duas folhas cada uma.
 ** Teor de água: PM/PF x 100 (ϕ s); teor de prolina: μ moles.g⁻¹P.S.
 *** Não determinado.

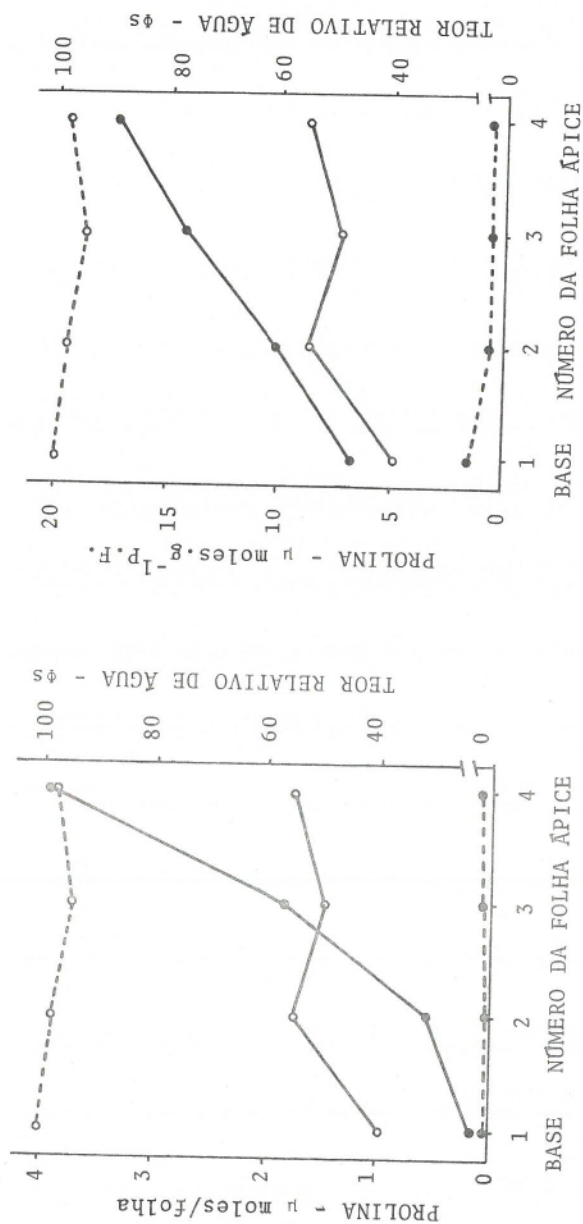


FIGURA 2 - Influência da idade do tecido sobre o acúmulo de prolina em folhas destacadas do cultivar de arroz IAC-435, submetidas a murchamento durante 22 horas. Folhas testemunhas (- - -); folhas murchas (—); teor de prolina (•); teor relativo de água simplificado (○).

4. RESUMO

Foram estudadas, no presente trabalho, as variações do teor de prolina livre em folhas destacadas de cinco cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidos ao murchamento. Observaram-se grandes aumentos no teor de prolina dos cinco cultivares com o aumento do déficit hídrico, parecendo existir um valor limite de teor de água das folhas abaixo do qual o metabolismo é orientado no sentido de sintetizar prolina. Este valor limite aparentemente não diferiu entre os cultivares estudados. As folhas destacadas dos cinco cultivares perderam água em diferentes intensidades, provavelmente em razão das diferenças genéticas existentes entre eles. Verificou-se, também, que os tecidos foliares túrgidos mais jovens contêm menos prolina livre que os tecidos de mais idade, e que os tecidos mais jovens acumulam mais prolina livre que os tecidos de mais idade, quando submetidos a déficit hídricos.

5. SUMMARY

Free proline concentration increased in detached leaves of five rice (*Oryza sativa* L.) cultivars subjected to water stress. The data suggest a threshold of water content in the leaves below which the metabolism is oriented toward proline synthesis. This threshold of water content is apparently the same for all the cultivars studied. The leaves of the five cultivars lose water at different rates probably due to genetic differences among them. The younger turgid leaf tissues contain less free proline and accumulated more proline when subjected to water stress than did the older ones.

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.) *Experientiae* 23:53-69. 1977.
2. BARNETT, N.M. & NAYLOR, A.W. Aminoacid and protein metabolism in bermuda grass during water stress. *Plant Physiol.* 41:1222-1230. 1966.
3. DHINDSA, R.S. & CLELAND, R.E. Water stress. I. Differential inhibition of protein synthesis. *Plant Physiol.* 55:778-781. 1975.
4. KEMBLE, A.R. & MACPHERSON, H.T. Liberation of aminoacids in perennial ryegrass during wilting. *Biochem. J.* 58:46-49. 1954.
5. MADRUGA, L.A.N. & RENA, A.B. Variações na concentração de prolina livre em folhas de plantas intatas de cinco cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas à desidratação. *Rev. Ceres* 24:226-236. 1977.
6. MIZUSAKI, S., NOGUCHI, M. & TAMAKI, E. Studies on nitrogen metabolism in tobacco plants. VI. Metabolism of glutamic acid, γ -aminobutyric acid, and proline in tobacco leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 105:599-605. 1964.
7. 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.
8. PÁLFI, G. & BITÓ, 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.
9. PÁLFI, G. & JÚÁSZ, 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.
10. PROTSSENKO, D.F., SHMAT'KO, J.G. & RUBANYUK, E.A. Drought hardi-

ness of winter wheat varieties as related to their amino acid composition. *Fiziol. Rast.* 15:680-687. 1968.

11. 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.
12. SAUNIER, R.E., HULL, H.M. & EHRENREICH, J.H. Aspects of the drought tolerance in creosotebush (*Larrea divaricata*). *Plant Physiol.* 43:401-404. 1968.
13. 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.
14. SINGH, T.N., ASPINALL, D. & PALEG, L.G. Stress metabolism IV. The influence of (2-chloroethyl) trimethylammonium chloride and gibberellic acid on the growth and proline accumulation of wheat plants during water stress. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:77-86. 1973.
15. 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.
16. 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.
17. STEWART, C.R. Effect of wilting on carbohydrates during incubation of excised bean leaves in the dark. *Plant Physiol.* 48:792-794. 1971.
18. STEWART C.R. Effects of proline and carbohydrates on the metabolism of exogenous proline by excised bean leaves in the dark. *Plant Physiol.* 50:551-553. 1972.
19. STEWART, C.R., The effect of wilting on proline metabolism in excised bean leaves in the dark. *Plant Physiol.* 31:508-511. 1973.
20. 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.
21. VALLÉE, J.C., PERDRIZET, E. & VANSUYT, G. Gradient d'induction florale et équilibre em acides aminés libres dans la tige du *Nicotiana xanthia* N.C.: influence des températures supra optimales. *C.R. Acad. Sc. Paris.* 269:1190-1193. 1969.
22. WALDREN, R.P. & TEARE, I.D. Free proline accumulation in drought-stressed plants under laboratory conditions. *Plant Soil.* 40:689-692. 1974.