

# **VARIAÇÕES NO TEOR DE AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS E DE PROTEÍNAS EM FOLHAS ISOLADAS DE CINCO CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) SUBMETIDAS À DESIDRATAÇÃO\***

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

## **1. INTRODUÇÃO**

O nível e o estado da água nos tecidos têm influência marcante na estrutura e na atividade das enzimas, das membranas e dos orgânulos celulares. A degradação de proteínas normalmente aumenta (7), enquanto a síntese diminui (1, 7), com o dessecamento. Evidências recentes (6) sugerem que a ação imediata da falta de água nas células vegetais é a redução no teor de polissomos, com o aumento concomitante do teor de monossomos. Os efeitos dos deficit moderados e curtos foram completamente revertidos poucas horas após a reidratação de plântulas de milho, mas existe um atraso que possivelmente depende da duração e da intensidade do deficit anterior (6).

Ainda que todas estas evidências recentes indiquem uma diminuição do teor de proteínas nos tecidos desidratados, esta situação parece não ser geral. Por exemplo, observou-se que em citros o teor de proteínas aumentou com a desidratação (4), de acordo com as fases de ativação, reação e reconstituição propostas por STOCKER (21). É evidente que este problema pode representar variações entre as espécies e/ou técnicas experimentais usadas em cada caso.

Por via de regra, o deficit de água causa grande aumento no teor de aminoácidos livres totais (1, 4, 14, 15, 18, 20). 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 (8) demonstraram que o aumento de prolina livre excedeu consideravelmente o teor de prolina existente nas proteínas de azevém submetido à seca.

Este trabalho teve como objetivo estudar as variações nos teores de ami-

---

\* 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.

Recebido para publicação em 15-06-1976.

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

noácidos livres totais e proteínas solúveis e insolúveis em folhas destacadas das plantas de cinco cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidos a diversos níveis de desidratação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizados os cultivares de arroz IAC-5100 IAC-1246, IAC-435, Batatais e ESAV-27. As técnicas de cultivo das plantas, desidratação das folhas, armazenamento do material para as análises químicas e determinação do teor relativo de água foram essencialmente iguais às descritas por MADRUGA e RENA (11). Os aminoácidos livres totais e as proteínas solúveis e insolúveis foram extraídos de acordo com a técnica descrita por RENA e MASCIOTTI (17). Os aminoácidos livres totais foram determinados pelo método de MOORE e STEIN (13), as proteínas solúveis pelo método de SCHACTERLE e POLLACK (19) e as proteínas insolúveis pela reação de Nessler (24).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Efeito do Período de Desidratação sobre o Teor de Aminoácidos Livres Totais

O teor dos aminoácidos livres totais aumentou com o tempo (Quadro 1) e o grau de desidratação (Figura 1). Estes aumentos variaram desde cerca de 4,8 até aproximadamente 7,7 vezes no tempo de 40 h em relação às determinações feitas a 0 h nos cinco cultivares estudados. Estes resultados são semelhantes aos observados no comportamento da prolina livre nas folhas destacadas de arroz (11). No entanto, os aumentos de aminoácidos livres totais e os aumentos da prolina livre (11) entre as folhas murchas e túrgidas foram bem diferentes, quantitativamente, em relação ao controle túrgido. Outra diferença marcante entre a prolina livre e os aminoácidos livres totais ocorre com o aumento dessas substâncias nas folhas destacadas túrgidas. O teor de aminoácidos livres totais aumentou sensivelmente com o tempo, nessas folhas, quando comparado com as

QUADRO 1 - Efeito do período de desidratação sobre o teor de aminoácidos livres totais em folhas destacadas de cinco cultivares de arroz\*

Período de desidratação horas	Teor de aminoácidos livres totais - $\mu\text{moles.g}^{-1}\text{P.S.}$				
	Cultivares				
	ESAV-27	IAC-1246	Batatais	IAC-5100	IAC-435
0	77,7 a**	71,6 a	77,0 a	70,2 a	83,1 a
10	209,5 a	251,4 ab	316,8 b	262,7 ab	286,9 ab
30	394,6 a	515,7 b	453,5 ab	384,1 a	505,1 a
40	430,7 ab	548,0 c	505,0 bc	390,1 a	395,3 a

\* 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  $P > 0,05$ , pelo teste de Tukey.

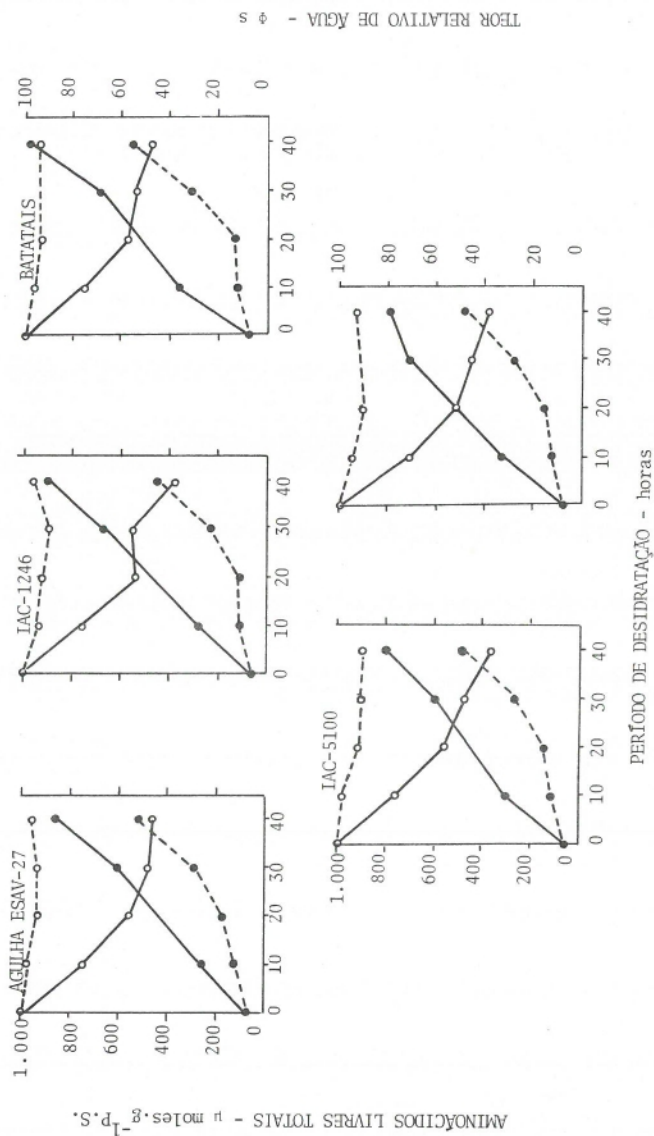


FIGURA 1 - Efeito do período de desidratação sobre o acúmulo de aminoácidos livres totais e teor de água (as) em folhas destacadas de cinco cultivares de arroz. Teor de aminoácidos livres totais nas folhas murchas (—○—) e nas folhas testemunhas (—●—). Teor relativo de água nas folhas murchas (—○—) e nas folhas testemunhas (—●—).

pequenas variações no teor de prolina nas mesmas condições. Foi também observado que o aumento no teor de aminoácidos livres totais nas folhas túrgidas ocorre mais acentuadamente a partir das 20 horas, o que se assemelha ao que foi dito anteriormente com respeito à prolina livre (11).

Outros trabalhos já haviam evidenciado aumentos nos teores de aminoácidos livres totais, tanto nas folhas destacadas de nabo (22) e *Solanum laciniatum* Ait. (14) como nas folhas não destacadas de azevém perene (8), grama-bermuda (1) e creosoto (18), submetidas ao murchamento. Todavia, nas folhas não destacadas de cevada, submetidas ao déficit hídrico (20), foi observado que o aumento dos aminoácidos livres totais resultou exclusivamente do aumento no teor da prolina. No entanto, comparando-se os resultados do presente estudo com os obtidos com a prolina livre (11), verifica-se que o aumento nos teores de aminoácidos livres totais, nos cinco cultivares de arroz, não foi devido somente ao aumento da prolina livre.

Com base nos trabalhos realizados com citros (4), concluiu-se que os aumentos de nitrogênio solúvel foliar eram devidos à translocação de compostos nitrogenados das raízes. Entretanto, os resultados encontrados com folhas destacadas submetidas a déficit hídrico permitem atribuir o aumento dos aminoácidos livres totais à hidrólise das proteínas ou à sua síntese *de novo*. THOMPSON *et alii* (22) admitem que o aumento dos aminoácidos livres tem origem na proteólise que ocorre nas folhas destacadas, murchas ou não, tendo estes compostos uma função protetora (16) para os tecidos durante o período de seca.

### 3.2. Efeito do Período de Desidratação sobre o Teor de Proteínas Insolúveis

Verifica-se, na Figura 2, que houve contínua queda no teor de proteínas insolúveis das folhas desidratadas. Nas folhas túrgidas testemunhas, o teor das proteínas insolúveis também diminuiu, porém com uma velocidade muito menor. Nota-se, ainda, que, nas últimas 10 horas do experimento, a queda do teor dessas proteínas, nas folhas destacadas submetidas à desidratação, foi menos acentuada.

A diminuição do teor das proteínas insolúveis devida aos déficits hídricos foi o resultado da proteólise e da diminuição da síntese protéica, como se observou em azevém perene (8), nabo (22) e grama-bermuda (1). O déficit hídrico provocou aumento da atividade da ribonuclease em folíolos de tomateiro (5), sendo este resultado semelhante ao que se obteve com o corte de tecidos foliares de aveia (23), o que certamente diminui a síntese de proteínas. Além desses fatores metabólicos, há a considerar variações no teor das proteínas associadas com alterações estruturais, provocadas pela senescência foliar (9). Em cotilédones de pepino, encontrou-se uma rápida queda no teor de clorofila e proteína com o desenvolvimento da senescência (10). É possível que o decréscimo no teor desses dois componentes esteja associado à deterioração dos cloroplastos (9). Então, os fatores murchamento e senescência foram provavelmente os principais causadores da diminuição do teor de proteínas insolúveis neste experimento, mediante a proteólise, a paralisação da síntese de proteínas e as mudanças estruturais sobrevividas nos tecidos foliares.

### 3.3. Efeito do Período de Desidratação sobre o Teor de Proteínas Solúveis em Tampão Fosfato

Os resultados do estudo do efeito do período de desidratação sobre o teor das proteínas solúveis em tampão fosfato das folhas destacadas dos cinco cultivares de arroz são apresentados na Figura 3. Observa-se que houve uma diminuição inicial do teor de proteínas solúveis, à exceção do cultivar Batatais. Após essa diminuição inicial, ocorreu aumento desta proteína, fato semelhante ao encontrado em quatro cultivares de feijão (17). Nas folhas murchas de plantas inteiras de cevada houve, entre 10 e 20 h de déficit hídrico, um leve aumento das proteínas solúveis que se estabilizou a seguir, para, no final do experimento, apresentar uma leve queda (20); estas informações diferem dos resultados do presente experimento.

Baba (1954), citado por CHANDRARATNA (3), trabalhando com dois cultivares de arroz, encontrou que o nitrogênio protéico constituía cerca de 7,1 mg/g de peso da matéria fresca da planta. No presente estudo, somando-se os valores

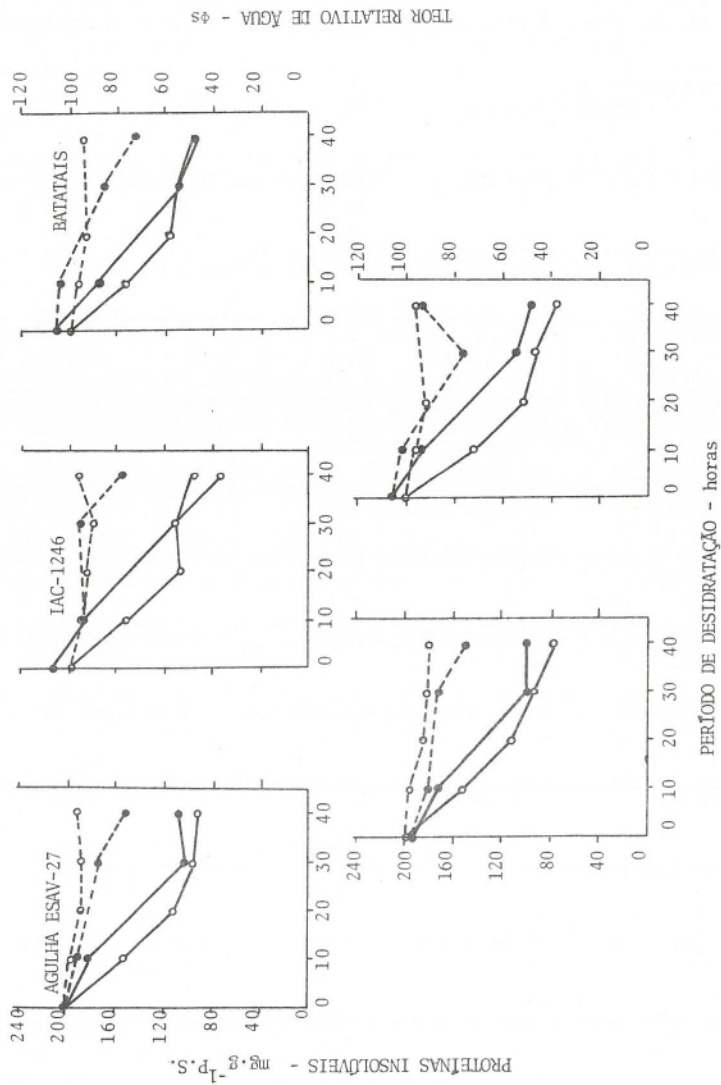


FIGURA 2 - Efeito do período de desidratação sobre o teor de proteínas insolúveis e teor de água (Φs) em folhas destacadas de cinco cultivares de arroz. Teor de proteínas insolúveis nas folhas murchas (●—○) e nas folhas testemunhas (○—○). Teor relativo de água nas folhas murchas (○—○) e nas folhas testemunhas (○—○).

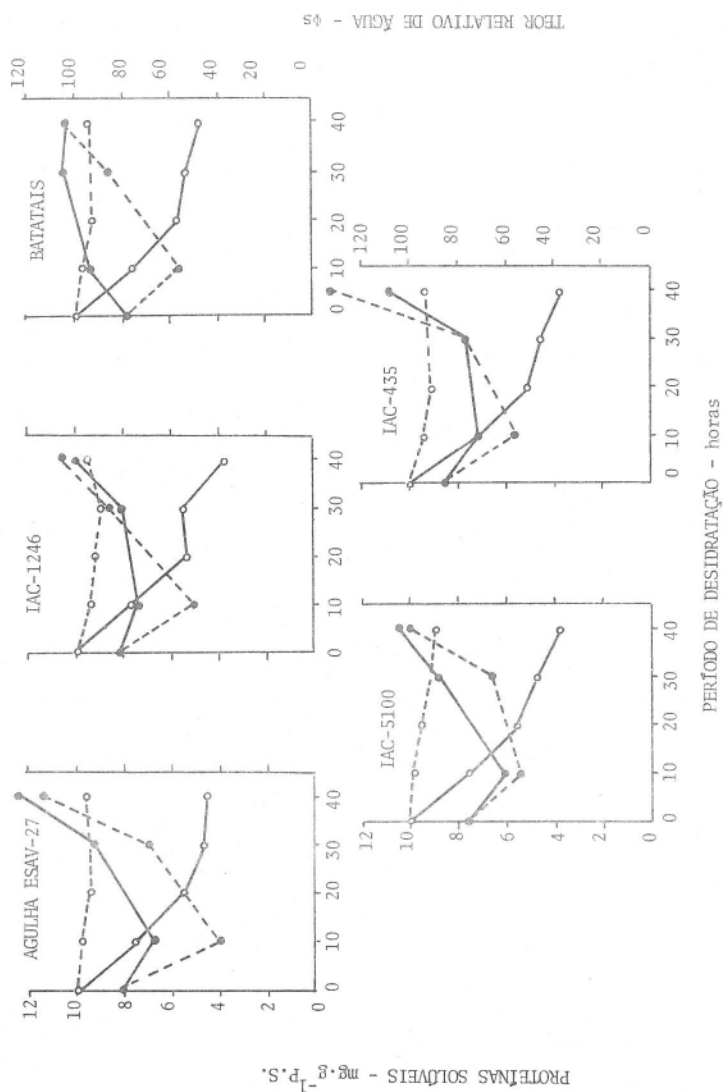


FIGURA 3 - Efeito do período de desidratção sobre o teor de proteínas solúveis e teor de água (φs) em folhas destacadas de cinco cultivares de arroz. Teor de proteínas solúveis nas folhas murchas (—○—) e nas folhas testemunhas (---○---). Teor relativo de água nas folhas murchas (○—○) e nas folhas testemunhas (○---○).

das proteínas solúveis e das insolúveis, e transformando-se os dados para as mesmas unidades, obtêm-se cerca de 7,0 mg/g de peso da matéria fresca da folha, o que, comparando-se os dois valores, indica que os resultados aqui apresentados não estão fora da realidade.

É provável que o aumento do teor das proteínas solúveis após a décima hora tenha sido a consequência conjunta do deficit hídrico, da senescência e da proteólise sobre as membranas celulares (2, 5, 12). Observa-se, na Figura 2, que o teor de proteínas insolúveis diminuiu gradualmente com o tempo. No entanto, o teor de proteínas solúveis diminuiu nas primeiras 10 h, para depois aumentar, tanto na testemunha túrgida como nas folhas murchas (Figura 3); porém, esta diminuição foi menor nas folhas submetidas ao deficit hídrico. Isto sugere que as proteínas estruturais insolúveis passaram à fração solúvel pelo efeito do deficit hídrico, de forma a compensar a proteólise das proteínas solúveis existentes no início dos tratamentos. A maior redução do teor de proteínas solúveis ocorrida nas folhas túrgidas, durante as 10 primeiras horas (Figura 3), deve-se, provavelmente, ao efeito único da senescência e à ausência do componente desidratação.

Estas idéias sugerem novas possibilidades de pesquisa, procurando correlacionar os efeitos do deficit hídrico e da senescência com a degradação da ultra-estrutura celular e a concomitante hidrólise de proteínas.

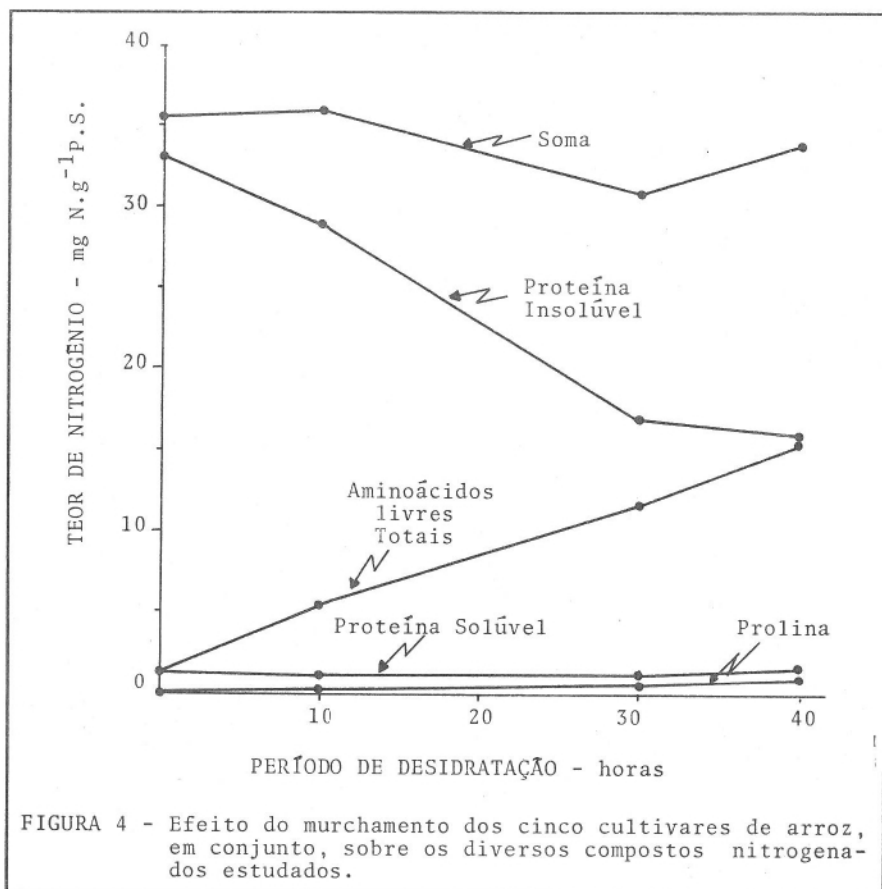
### 3.4. Comportamento dos Cultivares, em conjunto, quanto a Prolina, Aminoácidos Livres Totais e Proteínas Solúveis e Insolúveis, em função do Deficit Hídrico

O comportamento dos cinco cultivares de arroz, em conjunto, quanto a prolina, aminoácidos livres totais e proteínas solúveis e insolúveis em tampão fosfato, bem como quanto à soma desses componentes, é apresentado na Figura 4. Analisando-se esta figura, observa-se que a diminuição ocorrida na proteína insolúvel após 40 h de experimento foi maior do que a soma dos incrementos dos demais compostos. Isto parece indicar que os teores destes últimos aumentaram a partir da degradação das proteínas insolúveis. THOMPSON *et alii* (22), supondo que os níveis iniciais de aminoácidos livres refletem um balanço no metabolismo de uma folha normal, admitem que há acentuado aumento nestes níveis graças à proteólise.

A soma dos elementos nitrogenados estudados mostrou pequeno aumento nas folhas após 10 h de desidratação. Em 30 h, este conteúdo caiu consideravelmente, para aumentar novamente no final do experimento. Estas variações podem ser atribuídas a compostos nitrogenados não determinados, tais como a amônia, existentes nas folhas. A diminuição desta soma pode ter sido consequência das transformações do nitrogênio dos aminoácidos e/ou protéico em amônia. CHEN *et alii* (4) obtiveram resultados mais caracterizados, com relação ao nitrogênio total dos caules e das folhas de duas espécies de citros, observando, inclusive, aumento desse nitrogênio no final do experimento. Entretanto, esses pesquisadores, além de terem medido o nitrogênio total verdadeiro, trabalharam com um sistema aberto, no qual os caules e as folhas estavam continuamente recebendo nitrogênio do solo, pois as plantas eram inteiras quando foram submetidas ao deficit hídrico. THOMPSON *et alii* (22) encontraram uma rápida elevação da amônia nas folhas postas a murchar por 40 h. Ora, ocorrendo isso, é lógico supor que, não se estando medindo este composto, a soma dos demais componentes irá, certamente, diminuir.

## 4. RESUMO

Foram estudadas as variações nos teores dos aminoácidos livres totais e das proteínas solúveis e insolúveis, nas folhas destacadas de cinco cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidos a diversos níveis de desidratação. Todos os cultivares comportaram-se de maneira semelhante quanto às variações dos compostos estudados. O teor dos aminoácidos livres totais aumentou, e o teor das proteínas insolúveis diminuiu, com o aumento do grau de desidratação. No entanto, o teor das proteínas solúveis diminuiu nas primeiras 10 h de desidratação, para depois aumentar, provavelmente em razão da liberação das proteínas insolúveis das estruturas celulares submetidas ao deficit hídrico.



### 5. SUMMARY

Changes in the content of total free amino acids, and soluble and insoluble proteins have been examined in detached leaves of five rice (*Oryza sativa* L.) cultivars subjected to various degrees of desiccation. All the cultivars showed the same pattern of variation of the compounds studied. The content of total free amino acids increased, and the content of insoluble proteins decreased with increasing water stress. However, the soluble protein content decreased in the first ten hours of dehydration and increased thereafter probably because of liberation of insoluble structural proteins as a result of the desiccation.

### 6. LITERATURA CITADA

1. BARNETT, N.M. & NAYLOR, A.W. Amino acid and protein metabolism in bermuda grass during water stress. *Plant Physiol.* 41:1222-1230. 1966.
2. BUTLER, R.D. The fine structure of senescing cotyledons of cucumber. *J. Exp. Bot.* 18:534-543. 1967.
3. CHANDRARATNA, M.F. *Genetics and breeding of rice*. Longmans. London. 389 p. 1964.

4. 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.
5. DOVE, L.D. Ribonuclease activity of stressed tomato leaflets. *Plant Physiol.* 42:1176-1178. 1967.
6. HSIAO, T.C. Rapid changes in levels of polyribosomes in *Zea mays* in response to water stress. *Plant Physiol.* 46:281-285. 1970.
7. HSIAO, T.C. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24:519-570. 1973.
8. KEMBLE, A.R. & MACPHERSON, H.T. Liberation of amino acids in perennial ryegrass during wilting. *Biochem. J.* 58:46-50. 1954.
9. LEOPOLD, A.C. & KRIEDEMANN, P.E. *Plant growth and development*, 2.<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill. New York. 545 p. 1975.
10. LEWINGTON, R.J., TALBOT, M. & SIMON, E.W. The yellowing of attached and detached cucumber cotyledons. *J. Exp. Bot.* 18:526-534. 1967.
11. 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* 24:217-225. 1977.
12. MARTIN, C. & THIMANN, K. The role of protein synthesis in the senescence of leaves. I. The formation of protease. *Plant Physiol.* 49:64-71. 1972.
13. MOORE, S. & STEIN, W.H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176:367-388. 1948.
14. 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.
15. 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.
16. PROTSENKO, D.F., SHMAT'KO, I.G. & RUBANYUK, E.A. Drought hardiness of winter wheat varieties as related to their amino acid composition. *Fiziol. Rast.* 15:680-687. 1968.
17. 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.
18. SAUNIER, R.E., HULL, H.M. & EHRENREICH, J.H. Aspect of the drought tolerance in creosotebush (*Larrea divaricata*). *Plant Physiol.* 43:401-404. 1968.
19. 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.
20. 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.
21. STOCKER, O. Physiological and morphological changes in plants due to water deficiency. In: *Plant-water relationships in arid and semi-arid*

- conditions*. UNESCO, Paris. p. 63-104. 1960.
22. 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.
  23. UDVARDY, J., FARKAS, G.L. & MARRÉ, E. On RNase and other hydrolytic enzymes in excised *Avena* leaf tissues. *Plant Cell Physiol.* 10:375-386. 1969.
  24. UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F. *Manometric Techniques*. Revised Ed. Burgess, Minn. 338 pp. 1957.