

Determinação do aminoácido prolina em plantas de arroz em condições de déficit hídrico⁽¹⁾

Flávia Caldeira do Nascimento⁽²⁾; Rafael Passos Rangel⁽³⁾; Leilson Arruda⁽³⁾; Sônia Regina de Souza⁽⁴⁾; Leandro Azevedo Santos⁽⁵⁾.

⁽¹⁾Trabalho executado com recursos da Capes, CNPq & CPGA-CS; ⁽²⁾Estudante de Mestrado em Solos; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica, RJ, E-mail: flaviacald@yahoo.com.br; ⁽³⁾Estudante de Mestrado em Solos; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; ⁽⁴⁾Professora Adjunta do Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; ⁽⁵⁾Professor Adjunto do Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO: Os cultivos de arroz irrigados e inundados são os predominantes no Brasil. No entanto o país possui grande parte de seu território com a produção de arroz no sistema sequeiro em regiões que estão sujeitas a frequentes períodos de déficit hídrico. Uma das respostas estudadas em plantas em condições de déficit hídrico, é o acúmulo do aminoácido prolina nas células. O objetivo do trabalho foi identificar os padrões de acúmulo do aminoácido prolina em resposta ao estresse hídrico. Plantas de arroz foram cultivadas em areia lavada, até dez dias após a germinação as plantas foram irrigadas normalmente com solução de Hoagland (Hoagland & Arnom, 1950). Em seguida, as plantas foram divididas em dois grupos, um continuou sendo irrigado normalmente, e o outro grupo foi suspenso a irrigação. Foram feitas duas coletas com base na observação visual das plantas, uma no início do estresse hídrico e outra próximo ao ponto de murcha permanente. Amostras de tecidos radiculares, folhas e bainha foram coletadas e determinados os teores de prolina livre. O aumento da taxa de prolina foi evidente nas três partes da planta, raiz bainha e folha em condições de estresse. Houve um acréscimo significativo nas concentrações de prolina em relação ao tempo em que as plantas foram submetidas ao déficit hídrico. Novos estudos devem ser realizados para melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos que estão relacionados a tolerância a seca.

Termos de indexação: tolerância a seca - resposta ao estresse hídrico – acúmulo de aminoácido

INTRODUÇÃO

O arroz é um dos cereais mais utilizados na alimentação humana em diversas partes do mundo e também no Brasil, principalmente pela população de baixa renda. Segundo dados da Embrapa (2012), o arroz é alimento básico de cerca de 2,4 bilhões de pessoas, possuindo um excelente balanceamento nutricional, fornecendo 20% da energia e 15% da proteína per capita necessária à dieta humana.

Os cultivos irrigados e inundados são os predominantes, localizando em áreas de solos férteis, não sendo sujeitos a adversidades climáticas recebendo assim maiores investimentos e altos índices de produtividade (Khush, 1997). No entanto o país possui grande parte de seu território com a produção de arroz no sistema sequeiro em regiões que estão sujeitas a frequentes períodos de déficit hídrico, como é o caso das regiões nordeste e centro oeste. Variedades tradicionais de arroz com alto potencial produtivo, e com alta qualidades de grãos estão sendo estudadas especificamente para áreas de sequeiro. Utilizando variedades tradicionais de arroz sob manejo adequado é possível alcançar altos índices de produtividade (Atlin et al., 2006).

Em plantas de arroz cultivadas sob condições de sequeiro, o estresse causado pela deficiência hídrica tem efeito em diversos processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos na planta. A resposta mais estudada em plantas em condições de déficit hídrico é o acúmulo do aminoácido prolina nas células. O acúmulo de prolina em células vegetais submetidas a estresse hídrico tem sido sugerida como um mecanismo de ajuste osmótico. É sugerido que o acúmulo deste aminoácido representa um mecanismo compensatório para melhor sobrevivência das plantas durante o período de estresse, atuando como um regulador osmótico, um protetor contra a desnaturação enzimática, reserva de carbono e nitrogênio e como um estabilizador da síntese de proteína. (Delauney & Verma, 1993)

O trabalho teve como objetivo, identificar os padrões de acúmulo do aminoácido prolina em resposta ao estresse hídrico, pois a identificação e a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca podem ser fundamentais no desenvolvimento de novas cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no departamento de solos da UFRRJ. Foram utilizadas plantas de arroz (*Oryza sativa* L. cv Piauí). As sementes de arroz foram

desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos e depois lavadas várias vezes com água destilada. Em seguida foram transferidas para potes contendo somente água destilada. Cinco dias após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos com volume de 700 ml com quatro plantas por vaso, contendo areia lavada. Até dez dias após a germinação as plantas foram irrigadas normalmente com solução de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) modificada com $\frac{1}{2}$ da força iônica total com 2 mM de NO_3^- e 0,5 mM de NH_4^+ como fonte de N. Em seguida, as plantas foram divididas em dois grupos, um continuou sendo irrigado normalmente, e o outro grupo foi suspenso a irrigação (**Figura 1**).



Figura 1 - Vista do experimento aos 18 dias, conduzido em câmara de crescimento.

Foram feitas duas coletas com base na observação visual das plantas, uma no início do estresse hídrico e outra próximo ao ponto de murcha permanente. Amostras de tecidos radiculares, folhas e bainha foram coletadas e armazenadas em super-freezer à -80°C .

Posteriormente as amostras coletadas foram maceradas com ácido sulfosalicílico 3%, em seguida foram filtradas e homogeneizadas completando o volume para 10 ml com ácido sulfosalicílico 3%. A fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de Prolina livre (Bates, et al., 1976).

Análise estatística

O experimento foi montado com delineamento inteiramente casualizado em um fatorial 2×2 (níveis de estresse, tempo de coleta) com quatro repetições. Os resultados obtidos foram submetidos a testes de normalidade dos dados (Liliefors) e homogeneidade da variância (Cochran) para posterior análise de variância utilizando o programa Sisvar (Programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos - Universidade Federal de Lavras (Ferreira, 2008)).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aumento da taxa de prolina foi evidente nas três partes da planta, raiz, bainha e folha em condições de estresse. Já em comparação ao controle, este padrão de acumulo de prolina não foi verificado. Houve um acréscimo significativo nas concentrações de prolina em relação ao tempo em que as plantas foram submetidas ao déficit hídrico (**Figura 2**).

Na primeira coleta as plantas se encontravam no início do estresse, apresentando assim menores teores de prolina. Já na segunda coleta as plantas se encontravam em um estado mais severo de estresse hídrico, justificando o aumento de aproximadamente 57% nos teores de prolina em relação a primeira coleta.

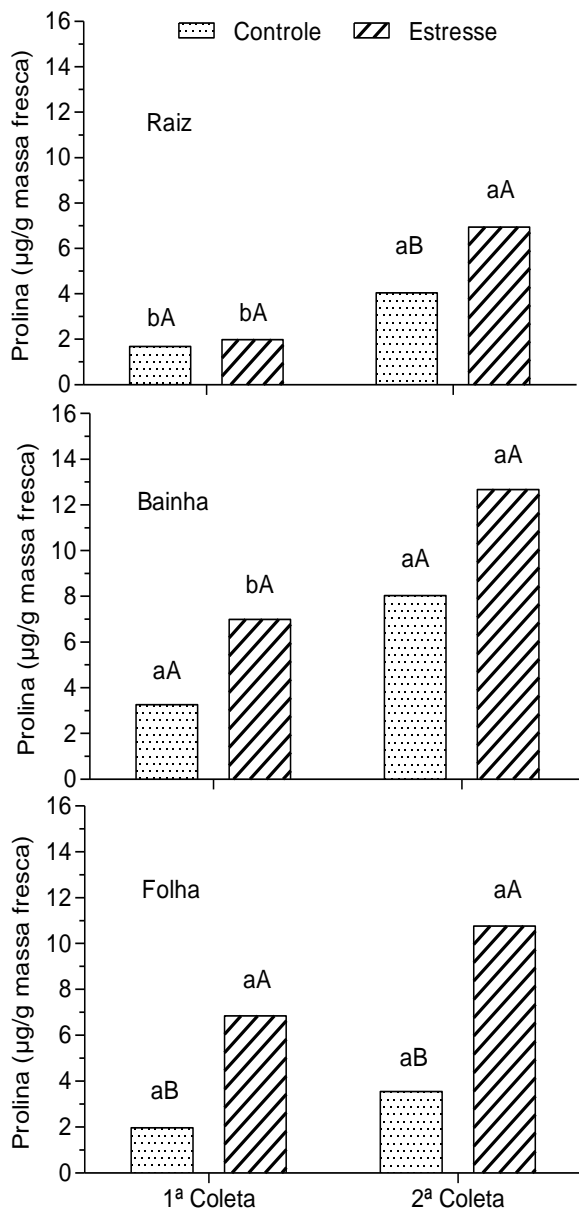


Figura 2 - Concentração de prolina em raiz, bainha e folha de arroz com e sem déficit hídrico, em dois tempos de coleta: 1º Coleta (início do estresse hídrico) e 2º Coleta (próximo ao ponto de murcha permanente). Médias com letras maiúsculas semelhantes para tempos de coleta (1º e 2º coleta) e minúscula para com e sem déficit hídrico, não diferem significativamente pelo teste F com $p < 0,05$

O acúmulo de prolina em condições de déficit hídrico em muitas espécies de plantas é correlacionada com tolerância a deficiência hídrica, e sua concentração normalmente é mais alta em plantas tolerantes que em plantas sensíveis ao estresse (Ashraf & Foolad, 2007).

Oliveira Neto (2008) trabalhando com sorgo sob déficit hídrico observou que essa condição provocou um acréscimo significativo nas concentrações de

prolina após 15 dias de estresse. Correlacionando com esses resultados Ronde et al. (2000) detectaram que a diminuição do índice de água provocou aumento progressivo nos níveis de prolina em seis diferentes cultivares de algodoeiro, e o acúmulo máximo de prolina em condições de seca ocorreu em 11 dias sem água.

O acúmulo desse aminoácido é o resultado do aumento no fluxo de glutamato, que é metabolizado pela Pirrolina-5-Carboxilato Sintetase (P5CS), enzima que regula a taxa de biossíntese de prolina (Hare & Cress, 1997). A enzima Pirrolina-5-Carboxilato Redutase (P5CR), responsável pela transformação da Pirrolina-5-Carboxilato (P5C) em prolina, tem sua expressão regulada por mudanças no potencial osmótico do citoplasma (Williamson & Slocum, 1992).

O decréscimo no potencial osmótico da célula leva a um aumento na síntese de P5C e, conseqüentemente, a um aumento na síntese de prolina. O acúmulo deste aminoácido em células vegetais submetidas a estresse hídrico tem sido sugerida como um mecanismo de ajuste osmótico (Delauney & Verma, 1993).

Entretanto, alguns autores sugerem outras funções para o acúmulo de prolina, como; estabilização de estruturas sub-celulares (Schobert e Tschesche, 1978), eliminação de radicais livres (Saradhi et al., 1995); importante componente da cascata de sinalização molecular em resposta ao estresse (Werner & Finkelstein, 1995); e constituinte principal de proteínas da parede celular de plantas (Nanjo et al., 1999).

CONCLUSÕES

O cultivo de arroz em condições de déficit hídrico leva a um acúmulo do aminoácido prolina em três partes da planta; raiz, bainha e folha.

Novos estudos devem ser realizados para melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos que estão relacionados a tolerância a seca.

AGRADECIMENTOS

CNPQ, CPGA-CS, UFRRJ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHRAF, M & FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59:206-216, 2007.

ATLIN, G. N.; LAFITTE, H. R.; TAO, D.; LAZA, M.; AMANTE, M.; COURTOIS, B. Developing rice cultivars for high-fertility upland systems in the Asian tropics. *Field Crops Research*. 97:43-52, 2006.



BATES, L. S., WALDREN, R. P., TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976.

DELAUNEY, A. & VERMA, D. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4:215-223, 1993.

EMBRAPA – Arroz. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br> Acesso em: 23 de Julho de 2011.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium (Lavras)*, v. 6, p. 36-41, 2008

HARE, P., PLESSIS, S. D., CRESS, W., STADEN, J. V. 1996. Stress-induced changes in plant gene expression. *S. Afr. J. Sci.* ,92:431-439.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural of Experimental Stn. Bull.* 347:1-32, 1950.

KHUSH, G. S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant molecular biology*, 35:25-34. 1997

NANJO, T., KOBAYASHI, M., YOSHIBA, Y. SANADA, Y., WADA, K., TSUKAYA, H., KAKUBARI, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance

revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Jour*

OLIVEIRA-NETO, C.F. Crescimento, produção e comportamento fisiológico e bioquímico em plantas de sorgo (*sorghum bicolor* [L.] moench) submetidas à deficiência hídrica. Dissertação – Universidade Federal Rural da Amazônia, p.114, 2008.

RONDE, J.A., M.H. SPREETH, W.A. CRESS AND J.A. DE-RONDE, 2000. Effect of antisense L- 1-pyrroline-5-carboxylate reductase transgenic soybean plants subjected to osmotic and drought stresses. *Plant Growth Regulation*, 2:13-26, 2000.

SARADHI, P.P, ALIA, ARORA, S., PRASAD, K.V.S.K. 1995. Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 209:1-5.
SCHOBERT, B., TSCHESCHE, H. 1978. Unusual solution properties of proline and its interactions with proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 541:270-277

WERNER, J.E., FINKELSTEIN, R.R 1995. *Arabidopsis* mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol. Plant Mol. Biol.* 34:913-922.

WILLIAMSON, C. L., SLOCUM, R. D. 1992. Molecular cloning and evidence for osmoregulation of the) pyrroline-5-carboxylate reductase (proC) gene in Pea (*Pisu sativum* L.). *Plant Physiol.* 100:1464-1470.