

EVOLUÇÃO DO TEOR DE PROLINA EM CULTIVARES DE MILHETO (*Pennisetum americanum* L.) E SORGO [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] EM RESPOSTA AO ESTRESSE HÍDRICO.

Increase of proline content in sorghum and millet cultivars in response to water stress

João Licínio Nunes de Pinho*

Dominique Ansel**

Universidade Federal do Ceará, CP 12.168, Fortaleza, CE, 60451-970, Brasil

RESUMO

A acumulação da prolina nos tecidos das plantas submetidas ao estresse hídrico pode estar associada à capacidade de adaptação dos vegetais à seca. O comportamento de cultivares de milheto (ICMVIS 85327 e ICMVIS 86330) e sorgo (ICSV 1063 e MIG SOR 86-30-3), no que tange a alterações do teor de prolina, quando submetidas a um estresse hídrico lento e progressivo ($\Psi_H = -2,5$ MPa ao final de quinze dias). A pesquisa foi conduzida em condições controladas de fitotron. As dosagens de prolina foram efetuadas nas folhas, utilizando-se o método de Bates et al (1973), no início, metade e final do estabelecimento do estresse, bem como 24 e 48 horas após a reidratação das plantas. De uma maneira generalizada, o teor de prolina aumentou significativamente em todas as cultivares em resposta ao estresse. No entanto, esse aumento foi mais acentuado na cultivar de milheto ICMVIS 86330 e nas de sorgo MIG SOR 86-30-3, respectivamente, com 90 e 70 $\mu\text{mol.g.MS}^{-1}$ ambas classificadas como resistentes à seca, contra 65 e 55 $\mu\text{mol.g.MS}^{-1}$, para ICMVIS 85327 e ICSV 1063, tidas como sensíveis. Os teores de prolina retornaram a níveis compatíveis ao observados antes do estabelecimento do estresse, 48 horas após a reidratação das plantas.

PALAVRAS-CHAVE: Prolina, tolerância à seca, estresse hídrico, *Pennisetum americanum* (L.), *Sorghum bicolor* [(L.) Moench].

ABSTRACT

Proline accumulation in plant tissues subjected to water stress can be associated with plant drought adaptation. The behavior of millet cultivars ICMVIS 85327 and ICMVIS 86330, and sorghum cultivars ICSV 1063 and MIG 86-30-3, were studied with respect to changes in proline content when the plants were subjected to a slow and progressive increase of water shortage ($\Psi_w = -2,5$ MPa). The study was conducted in controlled conditions in a phytotron and the plants were subjected to a 15 days water stress period. Proline levels were measured in leaves according to method described by Bates et al (1973), at the beginning, middle and end of the stress period, and 24 and 48 hours after the plants were rehydrated. Proline levels increased significantly for all cultivars in response to stress. However, the increase was higher in millet cultivar ICMVIS 86330 (90 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of dry matter) and sorghum cultivar MIG SOR 86-30-3 (70 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of dry matter), both known as drought resistant. The more sensitive water stress cultivars ICMVIS 85327 and ICMS 1063 showed a smaller proline increase, with 65 and 55 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ of dry matter, respectively. Proline content returned to normal levels 48 hours after the water stress was relieved.

KEY-WORDS: Proline, drought tolerance, water stress, *Pennisetum americanum* (L.), *Sorghum bicolor* [(L.) Moench].

* Prof. Adjunto do Centro de Ciências Agrárias da UFC

**Prof. da Université PARIS XII - França

INTRODUÇÃO

Vários fatores endógenos estão ligados à capacidade de adaptação fisiológica das plantas à seca. Pode-se citar, entre outros, a acumulação de compostos orgânicos como os açúcares solúveis e aminoácidos, responsáveis pelo ajustamento osmótico em condições de déficit hídrico.

A prolina é um composto orgânico não glutâmico cuja contribuição é bastante expressiva na osmorregulação dos tecidos vegetais submetidos ao estresse hídrico (Lawlor & Leach¹⁰). Ela se acumula nos tecidos das plantas submetidas ao estresse hídrico (Aspinal & Paleg²; Turner & Stewart¹⁹). Essa acumulação pode resultar de sua síntese, a partir do ácido glutâmico, da inibição de sua oxidação (provavelmente devido a alterações em nível das mitocôndrias) e, também, pela diminuição da síntese ou aumento na degradação das proteínas (Stewart & Hanson¹⁶; Kramer⁹; Lawlor & Leach¹⁰). A inibição da oxidação da prolina em condições de estresse hídrico foi observada na cevada (Stewart *et al.*¹⁷) e no fumo (Iwai *et al.*⁸).

Diversos autores encontraram uma significativa acumulação de prolina em resposta ao estresse hídrico. Ela foi detectada no algodoeiro (Souza¹⁵; Pham Thi & Vieira da Silva¹³), no tomateiro (Aloni & Rosenstein¹), na soja (Fukutoku & Yamada⁵), na cevada (Turner & Stewart¹⁹), nas células da batatinha (Corcuera *et al.*⁴). Mohamed & Sen¹¹ estudando 65 espécies do deserto indiano submetidas ao estresse hídrico encontraram acumulação de prolina em 54 delas. Treichel *et al.*¹⁸ observaram, durante sete meses consecutivos, a presença de prolina em 61 das 96 espécies pertencentes a 26 famílias de plantas da região desértica da Namíbia. Segundo os autores, essa acumulação foi mais significativa durante os anos de déficit pluvial. Ilahi & Dörffling⁷ observaram no decorrer de um estresse hídrico no milho uma maior acumulação de prolina nas cultivares sensíveis à seca quando comparadas às resistentes.

Handa *et al.*⁶ observaram nas células do tomateiro submetidas ao estresse hídrico, uma rápida acumulação de prolina, primariamente ligada à diminuição do conteúdo relativo de água. No entanto, como esta acumulação prosseguiu após a recuperação da turgescência celular, devido ao ajustamento osmótico, os autores concluíram que a acumulação de prolina está ligada não somente ao abaixamento do potencial hídrico mas, principalmente, ao ajustamento osmótico. Segundo esta hipótese, a prolina desempenha um papel importante na adaptação das células submetidas às variações do potencial hídrico.

O objetivo deste trabalho é verificar o comportamento de cultivares de milho e sorgo submetidas a um estresse hídrico controlado no que concerne à acumulação de prolina.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de PARIS XII, na França. Foram utilizadas duas cultivares de milho: ICMVIS 85327 (M27) e ICMVIS 86330 (M30) classificadas, respectivamente, como sensível e resistente à seca, e duas de sorgo: ICSV 1063 (S63) sensível e MIG SOR 86-30-3 (MSor) resistente à seca. Todo esse material é de origem africana. As plantas foram semeadas em vasos plásticos (na razão de cinco sementes/vaso), com capacidade para dois litros, contendo uma mistura turfa/vermiculita (2/3 - 1/3). As plantas eram irrigadas automaticamente por um sistema de gotejamento. Semanalmente era colocada na água de irrigação uma solução nutritiva comercial. O desbaste foi efetuado quinze dias após a germinação, deixando-se apenas uma planta/vaso. A pesquisa foi conduzida em câmara climatizada (fitotron) nas seguintes condições ambientais: intensidade luminosa - 500 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de densidade de fluxo de fótons - PFD, obtida de lâmpadas OSRAM HQI-E de 400 w de potência, utilizando-se um fotoperíodo de 12 horas; temperatura 35/25° C - dia/noite; umidade relativa do ar -60/80 % dia/noite. Decorridos 50 a 60, dias após a germinação, as plantas foram submetidas a um estresse hídrico gradual, entre 15 e 20 dias. A imposição do estresse foi controlada através da pesagem do conjunto vaso/planta, diariamente, e da determinação do potencial hídrico nas folhas ao final do período escuro (Ψ_H de base). O potencial hídrico também foi determinado por ocasião das coletas de material. Para a determinação do potencial hídrico utilizou-se a prensa à membrana (J-14 press).

A prolina foi dosada de acordo com o método de Bates *et al.*³. No entanto, efetuou-se uma modificação no referido método, que constou da centrifugação do homogeneizado a 2.000 g/minuto durante 15 minutos. Essa modificação deveu-se ao fato de o filtro de papel Whatman indicado pelos autores reter uma elevada quantidade de prolina. Para a dosagem da prolina utilizaram-se amostras de folhas adultas (5 cm em média) situadas entre a 2ª. e a 5ª. a partir do ápice da planta. Imediatamente após a coleta as amostras foram colocadas em nitrogênio líquido e, em seguida, liofilizadas por um período de 72 horas. Posteriormente as amostras foram conservadas à vácuo a uma temperatura de -180° C até a sua utilização. As coletas das amostras de folha para a dosagem da prolina foram efetuadas no início, metade e final do estresse hídrico e, também, 24 e 48 horas após a reidratação das plantas. Para o milho também foram efetuadas dosagens nas primeiras quatro horas após a reidratação das plantas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de prolina aumentaram de uma maneira generalizada nas cultivares de milho e sorgo em resposta ao estresse hídrico. Resultados semelhantes foram obtidos por Ilahi & Dörffling⁷ em cultivares de milho. No milho o teor de prolina passou de um valor próximo a zero no início da experiência, quando as plantas estavam bem hidratadas, ou seja, quando seus potenciais hídricos eram superiores a -0,5 MPa, para alcançar valores de 65 e 90 mmol.g.MS⁻¹, respectivamente, nos cultivares M27 e M30, quando seus potenciais hídricos se encontravam próximos a -2,5 MPa (Figura 1: a e b).

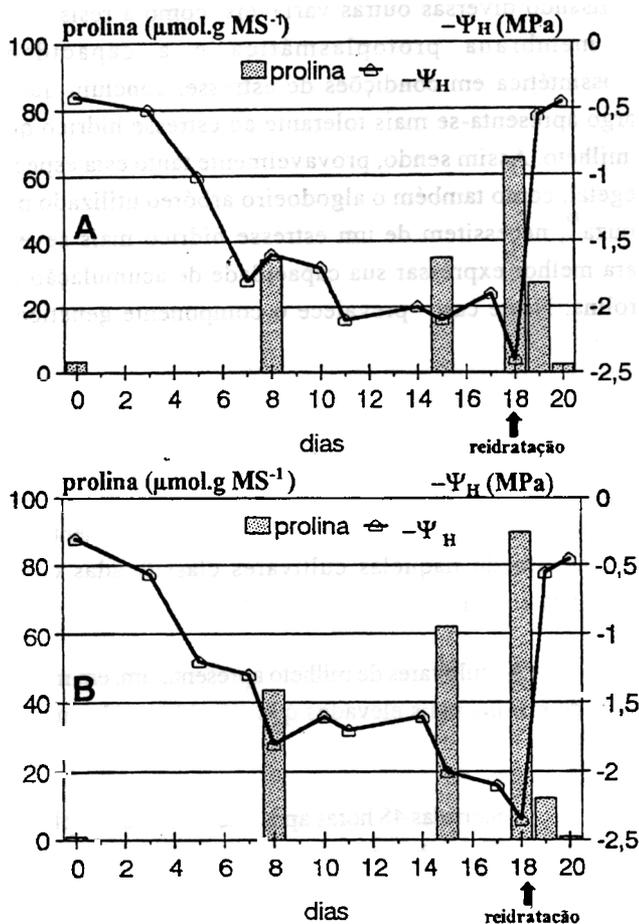


Figura 1 - Evolução do teor de prolina em cultivares de milho: M27 (A) e M30 (B), submetidas a um estresse hídrico controlado.

Também no sorgo, verificou-se um comportamento diferenciado com relação à acumulação da prolina. A cultivar MSor mesmo com um Ψ_H mais elevado que o da S63 destacou-se por apresentar um teor de prolina mais elevado (70 mmol.g.MS⁻¹) contra 55 mmol.g.MS⁻¹ obtido na S63 (Figura 2: a e b).

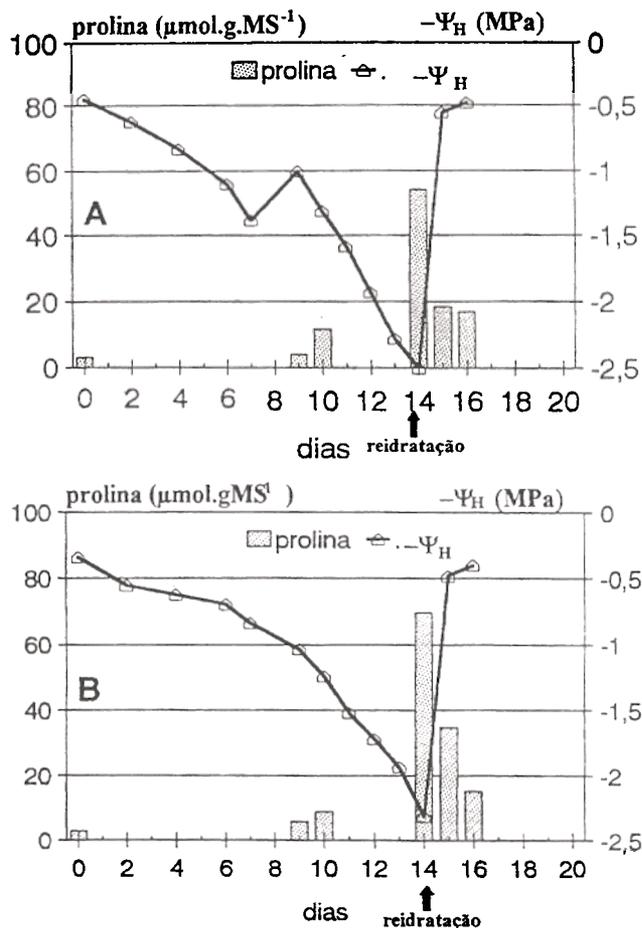


Figura 2 - Evolução do teor de prolina em cultivares de sorgo: Msor (A) e S63 (B), submetidas a um estresse hídrico controlado.

Observou-se, também, que as cultivares de milho apresentaram, em média, teores de prolina mais elevados que as de sorgo em resposta ao estresse.

A diminuição dos teores de prolina ocorreu com a reidratação das plantas. Entretanto, a velocidade na diminuição se diferenciou entre as duas espécies vegetais. No milho, 48 horas após a reidratação, observou-se que os níveis de prolina foram os mesmos daqueles obtidos no início da experiência (Figura 1: a e b). Já no sorgo a diminuição do teor de prolina foi mais lenta (Figura 2: a e b).

Ainda com relação ao milho verificou-se que, nas primeiras quatro horas após a reidratação das plantas, o teor de prolina permaneceu inalterado para as duas cultivares, apesar da rápida elevação registrada nos valores do Ψ_H (Figura 3). Iwai *et al.*⁸, verificaram em discos desidratados de folhas de fumo uma significativa elevação nos níveis de prolina. Segundo os autores, o aumento no teor de prolina prosseguiu ainda por um período de aproximadamente oito horas após a reidratação dos discos, retornando aos níveis originais somente 18 horas após a reidratação.

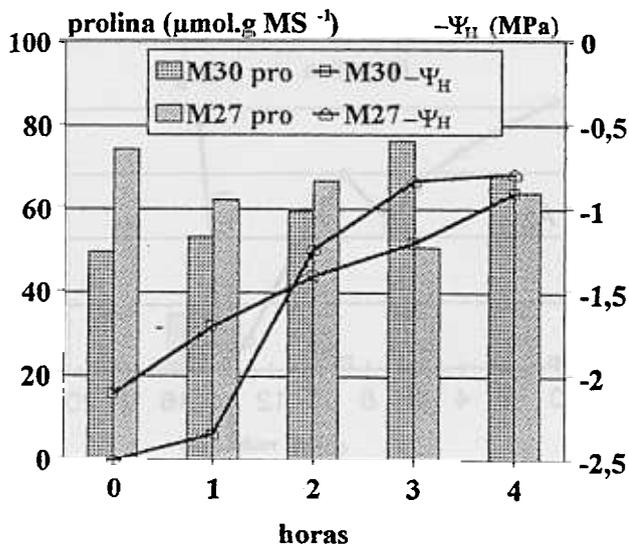


Figura 3 - Evolução do teor de prolina em cultivares de milho (M27 e M30), nas primeiras quatro horas após a reidratação das plantas.

De uma maneira geral, as cultivares de milho e sorgo responderam ao estresse no que concerne à elevação nos níveis de prolina. Constatou-se, também, que tanto a cultivar de milho M30 como a de sorgo MSor, classificadas como resistentes à seca, apresentaram teores de prolina mais elevados que o milho M27 e o sorgo S63, classificados como sensíveis. Pálfi *et al*¹² também correlacionaram positivamente o aumento na concentração de prolina com o estresse hídrico em sete híbridos de sorgo, três de milho e dois cultivares de trigo. No entanto, esses resultados divergem dos obtidos por Ilahi & Dörffling⁷, em cultivares de milho. Esses autores verificaram uma maior acumulação de prolina nas cultivares sensíveis à seca quando comparadas às resistentes. Souza¹⁵, trabalhando com algodoeiro dos tipos arbóreo e herbáceo concluiu que a acumulação de prolina não estava correlacionada com uma maior resistência à seca do algodão arbóreo, evidenciada através de outras variáveis estudadas pelo autor, e sim, com o conteúdo relativo de água, que nas mesmas condições experimentais foi inferior no algodão herbáceo, demonstrando que esse tipo tem uma menor capacidade de preservar a hidratação de seus tecidos.

Divergências como estas, nos resultados de pesquisa com estresse hídrico, podem ser atribuídas a diversos fatores, como a espécie vegetal utilizada, idade das plantas, o tempo de duração, severidade e periodicidade do estresse, como também nas diferentes maneiras de sua imposição, seja em campo ou no

laboratório, na aplicação do mesmo na planta inteira ou simplesmente em órgãos ou tecidos isolados. Como exemplo, podem-se verificar as diferenças, tomando-se por base o potencial hídrico, na imposição do estresse nas duas espécies estudadas. No milho (Figura 1: a e b) aplicou-se um estresse mais gradual, que depois de atingido um determinado estágio, permaneceu praticamente constante por um certo período de tempo e, só após, alcançou valores próximos a -2,5 MPa. Já no sorgo (Figura 2: a e b) o estresse foi lento, mas constante. Portanto, as diferenças verificadas entre as duas espécies vegetais, no tocante à capacidade de acumulação de prolina, podem ser devidas às metodologias diversas relacionadas a esse componente ambiental. Pinho¹⁴, analisando diversas outras variáveis, como a resistência da membrana protoplasmática e a capacidade fotossintética em condições de estresse, concluiu que o sorgo apresenta-se mais tolerante ao estresse hídrico que o milho. Assim sendo, provavelmente tanto esta espécie vegetal, como também o algodoeiro arbóreo utilizado por Souza¹⁵, necessitem de um estresse hídrico mais severo para melhor expressar sua capacidade de acumulação de prolina. Neste caso prevalece o componente genético.

CONCLUSÕES

Os teores de prolina aumentaram em resposta ao estresse hídrico para todas as cultivares. Este aumento foi mais acentuado naquelas cultivares classificadas como resistentes à seca.

- As cultivares de milho apresentaram, em média, teores de prolina mais elevados que aqueles obtidos nas de sorgo.

- Decorridas 48 horas após a reidratação das plantas os níveis de prolina reduziram-se rapidamente. Essa redução foi mais significativa no milho quando comparado ao sorgo.

- A rápida recuperação do potencial hídrico, imediatamente após a reidratação, não exerce influência nos teores elevados de prolina nas cultivares de milho.

- Pelos resultados obtidos e pela simplicidade e rapidez de determinação, a prolina pode ser utilizada como um dos critérios na seleção entre e dentre espécies vegetais para a tolerância à seca. Para tanto, há a necessidade de se estabelecer, para cada espécie vegetal, o nível de estresse a ser aplicado para que os teores de prolina possam se expressar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONI, B., ROSENSHTEIN, G. Proline accumulation: A parameter for evaluation of tomato varieties to drought stress? Physiol Plant., Copenhagen, v. 61, p. 231-235, 1984.
- 2.ASPINALL, D., PALEG, L. G. Proline accumulation: Physiological aspects. In: PALEG, L. G., ASPINAL, D. The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants. Australia: Academic Press, 1981, p. 206-241.
- 3.BATES, L. S., WALDES, R. P., TEARE, I. D. Rapid determination of proline for water-stress studies. Plant and Soil, v. 39, p. 205-207, 1973.
- 4.CORCUERA, L. J., HINTZ, M., PAHLICH, E. Proline metabolism in *Solanum tuberosum* cell suspension cultures under water stress. J. Plant Physiol., v. 134, p. 290-293, 1989.
- 5.FUKUTOKU, Y., YAMADA, Y. Sources of proline-nitrogen in water-stressed soybean (*Glycine max*). V. Fate of ¹⁵N-labelled protein. Physiol. Plant., v. 61, p. 622-628, 1984.
- 6.HANDA, S., HANDA, A. K.; HASEGAWA, P. M., BRESSAN, R. A. Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. Plant Physiol. v. 80, p. 938-945, 1986.
- 7.ILAH, I., DÖRFFLING, K. Changes in abscisic acid and proline levels in maize varieties of different drought resistance. Physiol. Plant. Copenhagen, v. 55, p.129-135, 1982.
- 8.IWAI, S., KAWASHINA, N., MATSUYAMA, S. Effect of water stress on proline catabolism in tobacco leaves. Phytochemistry, v. 18, p. 1155-1157, 1979.
- 9.KRAMER, P. J. Drought deficits and plant growth. In: KRAMER, P. J. Water Relations of Plants. USA: Academic Press, p. 343-389, 1983.
- 10.LAWLOR, D. W., LEACH, J. E. Leaf growth and waterdeficits: biochemistry in relation to biophysics. In: BAKER, N. R., DAVIES, W. J., ONG, C. K. Control of Leaf Growth. Great Britain: Cambridge University Press, 1985, p. 267-294, 1985.
- 11.MOHAMED, S., SEN, D. N. Proline accumulation in arid zone plants. Journal of Arid Enviroments, v. 13, p. 231-236, 1987
- 12.PÁLFI, G., GULYÁS. S., RAJKI, E. S., CSEUZ, L. The proline test: a method to the demonstration of the tolerance of waterdeficiency and frost - and to the qualifications of pollens. Acta Biol. Szeged, Hungary, v. 34, p. 11-25, 1988.
- 13.PHAM THI, A. T., VIEIRA DA SILVA, J. Influence de la sécheresse sur l'ultrastructure mitochondriale chez le cotonier - Quelques implications métabolique. Z. Pflanzenphysio. Bd., v. 100, p. 351-358, 1980.
- 14.PINHO, J. L. N. de. Étude comparée des mecanismes physiologiques de la resistância à la sécheresse de cultivars de mil (*Pennisetum americanum* L.) et de sorgho [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] sensíveis ou resistentes. Paris: Université PARIS VII, 1992, 158 p. (Tese de Doutorado).
- 15.SOUZA, J. G. de. Influência do déficit hídrico na concentração de prolina livre e no crescimento de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1977. 68 p. (Dissertação de Mestrado).
- 16.STEWART, C. R., HANSON, A. D. Proline accumulation as a metabolic response to water stress. In: TURNER, N. C., KRAMER, P. J. Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress. Canadá: A WILEY-Interscience Publication, 1980, p. 173-190
- 17.STEWART, C. R., BOGGES, S. F., ASPINAL, D., PALEG, L. G. Inhibition of proline oxidation by water stress. Plant Physiol. v. 59, p. 930-932, 1977.
- TREICHEL, S., BRINCKMANN, E., SCHEITLER, B., WILLERT, D. J. Occurence and changes of proline content plants in the Southern Namis Desert in relations to increasing and decreasing drought. Planta. v. 162, p. 236-242, 1984.
- 18.TURNER, L. B., STEWART, G. R. The effect of water stress upon polyamine levels in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. Journal of Experimental Botany, v. 37, p. 175: 170-177, 1986.