

Universidade Federal do Ceará
Pós-Graduação em Bioquímica

REGULAÇÃO METABÓLICA
DA ACUMULAÇÃO DE PROLINA EM FOLHAS
CAJUEIRO EXPOSTAS AO ESTRESSE SALINO

Iza Marineves Almeida da Rocha

N.Cham. T 574.192 R573r

Autor: Rocha, Iza Marineve

Título: Regulação metabólica da acumulaç



013839073

Ac. 70037

BCT

Fortaleza — Ceará
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**REGULAÇÃO METABÓLICA DA ACUMULAÇÃO DE
PROLINA EM FOLHAS DE CAJUEIRO EXPOSTAS AO
ESTRESSE SALINO**

IZA MARINEVES ALMEIDA DA ROCHA

FORTALEZA - CEARÁ
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

IZA MARINEVES ALMEIDA DA ROCHA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOAQUIM ALBENÍSIO GOMES DA SILVEIRA

de
REGULAÇÃO METABÓLICA DA ACUMULAÇÃO DE
PROLINA EM FOLHAS CAJUEIRO EXPOSTAS AO
ESTRESSE SALINO

TESE APRESENTADA À COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DO CEARÁ, COMO PARTE DOS REQUISITOS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR
EM CIÊNCIAS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:
BIOQUÍMICA VEGETAL

FORTALEZA - CEARÁ
2003

R13839073 (EXEMPLAR ATIVO)

A70037

T
574.192

R573r

R573r Rocha, Iza Marineves Almeida da.

Regulação metabólica da acumulação de prolina em folhas de cajueiro expostas ao estresse salino/ Iza Marineves Almeida da Rocha. - Fortaleza, 2003.

xii, 104f.:il.

Tese (doutorado) em Bioquímica. - Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira.

1.Prolina. 2.Estresse salino. 3.Cajueiro.

CDD.572.45

Tese apresentada, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração Bioquímica Vegetal, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e se encontra à disposição dos interessados na Biblioteca Central da Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta Tese será permitida desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Iza Marineves Almeida da Rocha

Tese aprovada em 09 de 10/ 2003

Joaquim Albenísio Gomes da Silveira, Dr.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Orientador

José Ronaldo Magalhães, Dr.

CNGL EMBRAPA
Co-Orientador

Benildo Sousa Cavada, Dr.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

José Tadeu Abreu de Oliveira, Dr.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
Universidade Federal do Ceará
Conselheiro

Ricardo Almeida Viégas, Dr.

Universidade Federal da Paraíba
Conselheiro

**"Quem escuta esquece,
Quem vê lembra,
Mas quem faz aprende"**

Provérbio Chinês

Ao meu Pai, Manoel Ribeiro da Rocha (*in memorium*), por orientar
seus filhos para interesses intelectuais;
A minha Mãe, Delzuita Almeida da Rocha, por sua extraordinária
dedicação à sua família.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

De maneira especial ao meu orientador, professor Dr. Joaquim **Albenísio** Gomes da Silveira, pela confiança em mim depositada e pelo saber a mim oferecido para realização deste trabalho, também pela inestimável amizade, além de ser para mim um exemplo de cientista.

Ao professor Dr. José **Tadeu** Abreu de Oliveira, pelas correções e por me ensinar os primeiros passos da minha vida acadêmica durante a minha iniciação científica quando estive sob sua orientação.

Ao professor Dr. **Benildo** Sousa Cavada, pela pronta disponibilidade para revisão deste trabalho, bem como pela amizade, admiração e respeito conquistados durante toda minha vida acadêmica, principalmente durante o mestrado quando estive sob sua orientação.

Ao Dr. **Ricardo** Almeida Viégas, pelas inúmeras sugestões e conhecimentos científicos que contribuíram de forma significativa para a realização deste trabalho, bem como pela constante amizade apesar da distância.

Ao Dr. José **Ronaldo** Magalhães, pela disponibilidade e interesse na revisão deste trabalho.

Aos membros da "Família Labplant", **Jean, Tânia, Joyce, Batista, Lucilene, Nega, Sérgio, Carihstine, Josemir, Flávia, Luiz, Roberta, João Paulo, Abel e Sandro**, que sempre me apoiaram e onde encontro companheirismo, amizade, trabalho e realização; meu "muito obrigada!".

De forma particular aos bolsistas **Jean e Joyce** e a funcionária **Ednilda** (Nega), pela contribuição indispensável em inúmeros experimentos realizados durante este trabalho.

À minha irmã e amiga **Tânia**, pelo companheirismo e eterna amizade que nos une.

Aos amigos de "todas" as horas, **Kátia, Fernanda, Márcio, Lia, Beatriz, Rolando e Edson**, abrigada por vocês existirem.

Aos meus irmãos, **Marco, Heloiza e Francisco** pela eterna "torcida organizada", e que a distância e o tempo nunca desfaçam os laços que nos unem.

A todos os professores e colegas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela cooperação e estímulo.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, através de concessão de bolsa de Pós-Graduação à autora desta Tese.

Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará.

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

SUMÁRIO

	PÁGINA
<u>LISTA DE TABELA</u>	V
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	VI
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	X
<u>RESUMO</u>	XI
<u>ABSTRACT</u>	XII
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	01
<u>2. OBJETIVO GERAL</u>	04
<u>3. MATERIAL</u>	05
<u>3.1. MATERIAL VEGETAL</u>	05
<u>3.1.1. OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS</u>	05
<u>4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS</u>	07
<u>5. MÉTODOS</u>	11
<u>5.1. CONCENTRAÇÃO DE SÓDIO</u>	11
<u>5.2. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS</u>	11
<u>5.3. CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES (N-α-AMINO)</u>	11
<u>5.4. CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO LIVRE</u>	12
<u>5.5. CONCENTRAÇÃO DE PROLINA LIVRE</u>	13
<u>5.6. SEPARAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES POR HPLC</u>	13
<u>5.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE (GS)</u>	14
<u>5.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ORNITINA δ-AMINOTRANSFERASE (OAT)</u>	16
<u>5.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA L-GLUTAMATO DESIDROGENASE (GDH)</u>	16
<u>5.10. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA L-GLUTAMATO SINTASE (GOGAT)</u>	16
<u>5.11. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROLINA DESIDROGENASE (PDH)</u>	17
<u>CAPÍTULO 1 - ACUMULAÇÃO DE PROLINA E DE SEUS PRECURSORES EM DISCOS DE FOLHAS DE PLÂNTULAS DE CAJUEIRO EM RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO</u>	18
<u>1.1. INTRODUÇÃO</u>	19
<u>1.2. OBJETIVOS</u>	22
<u>1.3. DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS</u>	22
<u>1.4. EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE AS VARIÁVEIS ANALISADAS</u>	29
<u>1.5. MÉTODOS</u>	29
<u>1.6. RESULTADOS</u>	30

<u>1.7. DISCUSSÃO.....</u>	42
<u>CAPÍTULO 2 - CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO DE PROLINA E DE SEUS PRECURSORES EM DISCOS E FOLHAS, PARTE AÉREA DESTACADA E PLÂNTULAS INTACTAS DE CAJUEIRO.....</u>	45
<u>2.1. INTRODUÇÃO.....</u>	46
<u>2.2. OBJETIVOS.....</u>	47
<u>2.3. DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....</u>	48
<u>2.4. MÉTODOS.....</u>	53
<u>2.5. RESULTADOS.....</u>	54
<u>2.5.1 CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO DE PROLINA E SEUS PRECURSORES EM DISCOS DE FOLHAS.....</u>	54
<u>2.5.2 CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO DE PRECURSORES E PROLINA EM FOLHAS DE PARTE AÉREA SEM RAIZ.....</u>	60
<u>2.5.3 CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO DE PRECURSORES E PROLINA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS INTACTAS.....</u>	63
<u>2.6 DISCUSSÃO.....</u>	67
<u>CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS COM A ACUMULAÇÃO DE PROLINA E NÍVEIS DE PRECURSORES EM DISCOS FOLIARES E FOLHAS DE PLÂNTULAS INTEIRAS.....</u>	71
<u>3.1. INTRODUÇÃO.....</u>	72
<u>3.2. OBJETIVOS.....</u>	73
<u>3.3. DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....</u>	74
<u>3.4. MÉTODOS.....</u>	79
<u>3.5. RESULTADOS.....</u>	80
<u>3.6. DISCUSSÃO.....</u>	93
<u>6. CONCLUSÕES.....</u>	97
<u>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	98

TABELA

TABELA

01

Efeito de diferentes precursores (10 mmol. L⁻¹) nas concentrações de ornitina, arginina, glutamato, glutamina, AALT e NH₃ (mmol kg⁻¹ MS) em discos de folhas de cajueiro incubados durante 24 horas.

PÁGINA

41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
01	Sementes do genótipo de cajueiro (<i>Anacardium occidentale</i> L.) CCP06.	06
02	Casa de vegetação do Labplant (A) e estande com plântulas de cajueiro anão CCP06 (B).	08
03	Câmara com condições controladas de temperatura, umidade e intensidade de luz (A) e plântulas de cajueiro em sistema de hidroponia (B).	09
04	Aspectos de discos de folhas (A) e segmento de raízes de cajueiro (B) em contato com tampão Hepes 10 mmol. L ⁻¹ pH 6,0.	10
05	Protocolo de extração para aminoácidos livres.	15
06	Vias de síntese da prolina	21
07	Protocolo experimental (experimento 01)	24
08	Protocolo experimental (experimento 02 e 03)	25
09	Protocolo experimental (experimento 04)	27
10	Protocolo experimental (experimento 05)	28
11	Concentração de sódio e prolina em raízes (▲) e folhas (●). Discos de folhas e segmentos de raízes destacados (A) e (C) e folhas e raízes de plântulas intactas (B) e (D) de cajueiro submetidos a doses crescentes de NaCl durante 24 horas para segmentos de raízes e discos de folhas destacados e 48 horas para plântulas.	31
12	Concentração de sódio (A), prolina (B) e percentagem de danos em membranas (K ⁺) (C) em discos de folhas de cajueiro submetidos a 200 (■) e 300 (▲) mmol. L ⁻¹ de NaCl, a 30°C por 24 horas.	32
13	Variações nas percentagens de sódio (■) e prolina (●) (A), aminoácidos livres totais (■) e prolina (●) (B) em folhas de plântulas de cajueiro submetidos a 200 mmol. L ⁻¹ de NaCl.	35
14	Variações na temperatura (▲), umidade (■) conteúdo de prolina (●) em folhas de plântulas de cajueiro mantidos em condições de casa de vegetação durante um dia típico em Fortaleza (quanto a temperatura, umidade e radiação solar). A radiação solar (μ Em ⁻² sec ⁻¹) variou entre um mínimo de 150 a um máximo de 550.	36

15	Aspectos de discos de folhas de cajueiro em presença de 0 mmol. L ⁻¹ NaCl (A), 100 mmol. L ⁻¹ NaCl (B), 200 mmol. L ⁻¹ NaCl (C), 300 mmol. L ⁻¹ NaCl (D) e 400 mmol. L ⁻¹ NaCl (E) em tampão Hepes 10 mmol. L ⁻¹ pH 6,0 durante 24 horas.	37
16	Sintomas visuais das injúrias causadas pelo estresse salino: murchamento (A), "queima" dos bordos das folhas (B), morte das folhas apicais (C), degradação da clorofila (D) e manchas necróticas (E) e (F).	38
17	Variações nas concentrações de glutamato (▲), glutamina (■), ornitina (▲) e arginina (■) em discos de folhas de cajueiro submetidos a doses crescentes de NaCl durante 24 horas (A) e (C), e 48 horas para plântulas (B) e (D).	40
18	Protocolo experimental (experimentos 06, 07 e 08).	49
19	Protocolo experimental (experimentos 09).	51
20	Protocolo experimental (experimentos 10).	52
21	Variações nas concentrações de glutamato, ornitina e prolina em discos de folhas de cajueiro submetidos a doses crescentes de glutamato (A) e (C) (●, ▲) ou doses crescentes de ornitina (B) e (D) (●, ▲) na ausência ou na presença de 300 mmol L ⁻¹ de NaCl durante 24 horas.	55
22	Variações nas concentrações de glutamato (▲) e glutamina (■) (A), arginina (■) e ornitina (▲) (B) e prolina (●) (C) em discos de folhas de cajueiro na presença de 10 mmol L ⁻¹ de glutamato e NaCl 300 mmol L ⁻¹ .	57
23	Variações nas concentrações de arginina (■) e ornitina (▲) (A), glutamato (▲) e glutamina (■) (B) e prolina (●) (C) em discos de folhas de cajueiro na presença de 10 mmol L ⁻¹ de ornitina e NaCl 300 mmol L ⁻¹ .	59
24	Variações nas concentrações de glutamato (●), glutamina (■), arginina (■), ornitina (●), aminoácidos livres totais (■) e proteínas solúveis (●) em discos de folhas de cajueiro na presença de 10 mmol L ⁻¹ de glutamato (A) e (C) ou 10 mmol L ⁻¹ de ornitina (B) e (D), e aminoácido livres totais e proteínas (E) em doses crescentes de NaCl durante 24 horas.	61
25	Variações nas concentrações de glutamato (■), prolina (●), glutamina (▲) e ornitina (■) em folhas de plântulas de cajueiro com o sistema radicular destacado, em função do tempo de contato com 10 mmol L ⁻¹ de glutamato (A) e (C) ou com 10 mmol L ⁻¹ de ornitina (B) e (D) em tampão Hepes 10 mmol L ⁻¹ pH 6,0.	62

26	Variações nas concentrações de glutamato (▲), prolina (●), ornitina (▲) e glutamina (■) em folhas de plântulas de cajueiro submetidos a 300 mmol L ⁻¹ de NaCl durante 48 horas e pulverizadas durante 24 horas com uma solução de Triton X-100 0,01% contendo 10 mmol L ⁻¹ de glutamato (A) e (C) ou 10 mmol L ⁻¹ de ornitina (B) e (D).	65
27	Variações nas concentrações de ornitina, prolina, glutamato e glutamina em folhas de plântulas de cajueiro cultivados na ausência de NaCl (controle ■) ou na presença de 300 mmol L ⁻¹ de NaCl (■), após serem pulverizados durante 24 horas com uma solução de Triton X-100 0,01% contendo 10 mmol L ⁻¹ de glutamato (A) ou 10 mmol L ⁻¹ de ornitina (B).	66
28	Protocolo experimental (Experimento 11)	75
29	Protocolo experimental (Experimento 12)	76
30	Protocolo experimental (Experimento 13 e 14)	78
31	Efeito direto de doses crescentes de NaCl nas atividades das enzimas OAT (▲) e PDH (●) (A), GS (▲) e GOGAT (●) (B) em extratos brutos de folhas de plântulas de cajueiro com 35 dias de idade.	81
32	Variações nas atividades das enzimas GS (▲), GOGAT (●), GDH (●) e OAT (▲) em discos de folhas de cajueiro submetidos a soluções isosmóticas de NaCl (300 mmol L ⁻¹) (A) e (C) ou PEG 6000 (35,5%) (B) e (D), em função de diferentes tempos de exposição. Os discos representam amostras compostas de n = 4 plântulas.	82
33	Aspectos dos sintomas em folhas de plântulas de cajueiro submetidos a soluções isosmóticas de PEG 6000 (29,5%) (A) e (B) e NaCl (200 mmol.L ⁻¹) (C) e (D) em solução nutritiva diluída 1:10 durante 72 horas de exposição.	84
34	Variações nas atividades das enzimas GS (▲), GOGAT (●), GDH (●) e OAT (▲) em folhas de plântulas de cajueiro submetidos a soluções isosmóticas de NaCl (200 mmol.L ⁻¹) (A) e (C) ou PEG 6000 (29,5%) (B) e (D), em função de diferentes tempos de exposição.	85
35	Variações nos conteúdos de sódio (■), prolina (●), aminoácidos livres totais (■) e amônia (●) em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a soluções isosmóticas de NaCl (200 mmol.L ⁻¹) (A) e (C) ou PEG 6000 (29,5%) (B) e (D), em função de diferentes tempos de exposição.	86
36	Variações nos conteúdos de glutamato (●), glutamina (■), ornitina (▲) e arginina (■) em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a soluções isosmóticas de NaCl (200 mmol.L ⁻¹) (A) e (C) ou PEG 6000 (29,5%) (B) e (D), em função de diferentes tempos de exposição.	87

- 37 Variações nas atividades das enzimas GS (▲), GOGAT (●) (A), GDH (●) e OAT (▲) (B) e conteúdos de sódio (■) e prolina (●) (C), aminoácidos livres totais (■) e amônia (●) (D) em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a doses crescentes de NaCl durante 48 horas. 88
- 38 Aspectos de folhas de plântulas de cajueiro submetidas a 200 mmol.L⁻¹ de NaCl em função de diferentes tempos de exposição (A) e detalhes dos sintomas em folhas nos dias 1,2,3,4 e 5 (B). 90
- 39 Variações nas atividades das enzimas GS (▲), GOGAT (●) (A), GDH (●) e OAT (▲) (B) e conteúdos de sódio (■) e prolina (●) (C), aminoácidos livres totais (■) e amônia (●) (D) em de folhas de plântulas de cajueiro submetidas a 200 mmol.L⁻¹ de NaCl durante diferentes tempos de exposição. 91
- 40 Variações nos conteúdos de proteínas solúveis em discos de folhas de cajueiro (A) submetidos a soluções isosmóticas de NaCl (300 mmol.L⁻¹ ●) ou PEG 6000 (35,5% ▲) e folhas de plântulas de cajueiro (B) submetidas a soluções isosmóticas de NaCl (200 mmol.L⁻¹ ●) ou PEG 6000 (29,5% ▲), em função de diferentes tempos de exposição. 92

LISTA DE ABREVIATURAS

- Arg - Arginina
- ATP - Adenosina 5'-trifosfato
- CCP - Clone Cajueiro Pacajus
- DTT - Dithiothreitol
- EDTA - Ácido Etilenodiaminotetraacético
- EMPBRAPA / CNPAT - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / Centro Nacional de Pesquisa de Agricultura Tropical
- GDH - L-Glutamato-Desidrogenase
- Gln - Glutamina
- Glu - Glutamato
- GOGAT - L-Glutamato-Sintase
- GS - Glutamina Sintetase
- HPLC - High Performance Liquid Chromatography
- MS - Massa seca
- NAD - Nicotinamida Adenina di-nucleotideo
- NADH - Nicotinamida Adenina di-nucleotideo (reduzida)
- NADP - Nicotinamida Adenina di-nucleotideo Fosfato
- OAT - Ornitina δ -Aminotrasferase
- Orn - Ornitina
- P5CR - Δ^1 -Pirrolina-5-carboxilato-redutase
- P5CS - Δ^1 -Pirrolina-5-carboxilato-sintetase
- PDH - Prolina-Desidrogenase
- PEG 6.000 - Polietilenoglicol
- PITC - Fenilisotiocianato
- Pro - Prolina
- TCA - Ácido Tricloroacético

REGULAÇÃO METABÓLICA DA ACUMULAÇÃO DA PROLINA EM FOLHAS DE CAJUEIRO EXPOSTAS AO ESTRESSE SALINO

Doutoranda: Iza Marineves Almeida da Rocha
Orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes Silveira

RESUMO

Os mecanismos bioquímicos que levam à acumulação de prolina em tecidos de plantas expostas ao estresse salino não são totalmente conhecidos. Neste trabalho testou-se a hipótese que a acumulação de prolina em folhas de cajueiro sob estresse salino pode ser devida ao aumento na disponibilidade de precursores "secundários" (arginina, amônia e glutamina) e manutenção das atividades das enzimas da assimilação de NH_3 (glutamina sintetase - GS, glutamato sintase - GOGAT e glutamato desidrogenase - GDH), associado com a atividade de ornitina δ -aminotransferase (OAT). O trabalho foi dividido em três partes. No primeiro, procurou-se validar o sistema de discos isolados de folhas como modelo de estudo. No segundo, comparou-se a cinética e a eficácia dos precursores Glu e Orn na acumulação de prolina em três sistemas: discos de foliares, folhas intactas de parte aérea livre de raiz e folhas de plântulas intactas. No terceiro, procurou-se estabelecer o tipo de resposta das atividades de GS, GOGAT, GDH e OAT ao NaCl e PEG 6000 em diferentes sistemas: extrato bruto livre de células, discos de folhas e folhas de plantas intactas. Neste estudo, as respostas foram comparadas com as mudanças nas concentrações dos precursores Gln, Glu, Orn, Arg e amônia livre. Todos os experimentos foram realizados sob condições controladas de luminosidade, temperatura e umidade relativa. Os resultados indicaram que o sistema de discos de folhas é adequado para respostas mais diretas do NaCl sobre o metabolismo. Entretanto, o mesmo se mostrou adequado para estudo de cinética de absorção e acumulação de precursores e prolina e respostas das enzimas ao NaCl ou ao PEG. Ornitina se mostrou um precursor mais eficaz na indução de acumulação de prolina do que Glutamato. O estresse salino parece induzir inicialmente uma acumulação de amônia em paralelo com a de glutamina. Aparentemente, isso estimularia a atividade da via GS/GOGAT/GDH com destaque para GS no suprimento de glutamina para a síntese dos precursores de prolina, glutamato e ornitina. Por sua vez, a via da OAT parece ser muito importante no suprimento de P5C para a biossíntese de prolina em folhas de cajueiro. A atividade de prolina desidrogenase foi muito baixa sugerindo que a baixa oxidação de prolina também contribui para sua própria acumulação. No conjunto, os resultados suportam a hipótese de que a acumulação de prolina em folhas de cajueiro é decorrente principalmente de distúrbios metabólicos no *pool* de aminoácidos livres e que a manutenção dos níveis e fluxos de intermediários e precursores é essencial para a manutenção das atividades das enzimas envolvidas diretamente na síntese de prolina.

METABOLIC REGULATION OF PROLINE ACCUMULATION OF CASHEW LEAVES UNDER SALT STRESS

ABSTRACT

In spite of increasing research interest, the biochemical mechanisms of Pro accumulation in plants upon salinity are not fully known yet. In the current study, attempts were made to check the hypothesis that leaf Pro accumulation of salinized cashew can arrive from increase in availability of secondary precursors (A, B and C) and maintenance of activity of enzymes from NH_3 assimilation (GS, GOGAT and GDH), both together with ornithine-aminotransferase activity. This study has comprised three distinct parts. In the first, a leaf disc system was tested for their effectiveness as a study method. In the second, the Glu and Orn kinetic and efficacy on Pro accumulation were compared in three systems: leaf discs, integer leaf of aerial part free of roots and leaf of intact plants. And, in the third, the activities of GS, GOGAT, GDH and OAT either on NaCl or PEG 6000 were determined upon different systems: leaf extract free of cells, leaf discs and leaf from intact plants. In the current work, the results had compared been with changes occurring in the concentrations of precursors Gln, Glu, Orn, Arg and of free ammonia. The experiments were carried out under controlled conditions of luminosity, temperature and air moisture. The results indicate leaf disc system to be the one more adequate to realize the more direct responses of NaCl on metabolism; however, it also shows to be able to study precursors and Pro uptake kinetic and accumulation and to study enzyme responses to NaCl and PEG 6000. Orn was seen to be more able than Glu to induce Pro accumulation. The NaCl stress seems induce primarily accumulation of ammonia alongside Glu; apparently, it would stimulate the activity of GS/GOGAT/GDH via, and weight is added for the role of GS in supplying Glu to synthesize Pro precursors Glu and Orn. The prolina dehydrogenase activity was very low; therefore, a low Pro oxidation itself has also contributed for its accumulation. The results allow hypothesize that Pro accumulation in leaf of cashew come mainly from metabolic imbalance in the pool of free amino acids, and that maintenance of flow and levels of intermediaries and precursors is essential to retain activity of enzymes of Pro synthesis.

1. INTRODUÇÃO

O cajueiro encontra-se hoje disseminado em praticamente todos os países do mundo tropical, no entanto, em sua maioria, sem nenhuma importância econômica devido a aspectos envolvidos na sua exploração comercial, particularmente com relação à escassez de tecnologias no setor produtivo, organização para a comercialização da matéria-prima e capacidade de competição no mercado internacional de nozes comestíveis. No Brasil, a exploração econômica do cajueiro concentra-se na região Nordeste, com cerca de 94% da produção concentrada nos Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte.

A cultura do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma das principais fontes de divisas para o Ceará e outros Estados do Nordeste, através da exportação da castanha. Além disso, sua cadeia produtiva é responsável pelo emprego de cerca de 300.000 pessoas. Apesar disso, o Centro Internacional de Negócios da FIEC registrou para o Estado do Ceará, na safra de 2001/2002, uma renda de US\$ 87,9 milhões, refletindo um decréscimo de 36% em relação ao ano anterior. Os principais fatores responsáveis por esses resultados são: baixa renovação das áreas plantadas; oscilações de pluviosidade (períodos de secas); baixa qualidade genética dos materiais plantados e pomares produzidos anteriormente a partir de sementes com produção tardia e alta heterogeneidade (BARROS *et al.*, 2000).

Apesar da cajucultura ser praticada intensivamente na faixa litorânea do Nordeste brasileiro e em regiões de clima semi-árido, conseqüentemente em áreas sujeitas às condições de salinização e alcalinização dos solos, os trabalhos sobre os efeitos da salinidade e alcalinidade sobre a produtividade desta cultura são ainda escassos, principalmente no campo da fisiologia, muito embora existam algumas observações que sugerem uma diferenciação entre alguns genótipos quanto a uma maior ou menor sensibilidade à salinidade (SILVA, 1998). Estudos têm evidenciado que o estresse salino em plantas jovens

de cajueiro pode induzir alterações bioquímicas e fisiológicas drásticas, especialmente nos conteúdos de Ca^{2+} e K^{+} das raízes e que essa espécie é capaz de acumular grandes quantidades de prolina nas folhas (SILVEIRA *et al.*, 2000; VIÉGAS *et al.*, 2000). O manejo genético de culturas para condições de excesso de sais ou deficiência hídrica nos solos já é uma realidade, como o caso de uma cultivar de melão geneticamente melhorada, em Israel, para tolerar irrigação com água de alta condutividade elétrica (FAGERIA e GHEYI, 1997).

O estresse causado pelo o excesso de sais dissolvidos na solução no solo causa intensa redução no crescimento das plantas, provocando efeitos drásticos sobre a produção. Esse problema é particularmente agudo nas regiões Áridas e Semi-Áridas, onde a intensa evapotranspiração associada com as baixas precipitações de chuva causam a salinização dos solos (SILVEIRA *et al.*, 2001). Além do uso intensivo dos fertilizantes químicos e da irrigação com água de baixa qualidade, particularmente nas regiões tropicais, essa problemática tende a atingir grandes proporções, tornando-se uma dos mais graves na agricultura e no meio ambiente.

A tolerância ao estresse salino é um caráter genético quantitativo, o qual envolve diversos genes (WINICOV, 1998). Apesar dos efeitos da salinidade sobre as respostas fisiológicas das plantas ser um assunto extensamente estudado, ainda persistem muitas lacunas, em espécies cultivadas destacam-se os trabalhos com arroz, tomate, sorgo, trigo, girassol e tabaco (FLOWERS *et al.*, 1977; CHESSEMAN, 1988; GREEWAY e MUNNS, 1980; NIU *et al.*, 1995; SHANNOM, 1997; YEO, 1998).

Como modelo de pesquisa, destaca-se atualmente a *Arabidopsis* e as plantas transgênicas com genes ligados a tolerância (HARE *et al.*, 1999). O estresse salino é um modelo de pesquisa bastante conveniente, devido às facilidades de controle das variáveis de estresse (ZHU, 2000). Entretanto, a resposta das plantas à salinidade depende de diversos fatores, principalmente: (1) estágio fisiológico no qual é imposto o estresse; (2) duração e

intensidade do estresse; (3) condições ambientais externas e (4) genótipo utilizado (SILVEIRA *et al.*, 2001).

Em geral, os efeitos da salinidade são agrupados principalmente nas seguintes áreas: (a) estresse osmótico e redução no estado hídrico da planta; (b) redução no processo fotossintético; (c) desbalanço na absorção e nos níveis endógenos dos nutrientes minerais e (d) toxicidade dos íons salinos. As pesquisas em fisiologia do estresse salino concentram-se, principalmente, nos diferentes mecanismos de adaptação à salinidade.

Dentre esses mecanismos estão o ajustamento osmótico e a biossíntese de osmoprotetores, destacando-se numerosos estudos sobre a indução e biossíntese dos solutos compatíveis, particularmente prolina (KISHOR *et al.*, 1995; YOSHIBA *et al.*, 1995; PENG *et al.*, 1996; LIU e ZHU, 1997; IGARASHI *et al.*, 1997; HARE *et al.*, 1999), a glicina-betaina (RHODES e HANSON, 1993; INGRAN e BERTELS, 1996; YEO, 1998) e outros compostos da classe dos carboidratos, açúcar-álcoois, poliaminas, etc. (INGRAN e BERTELS, 1996; SHEVELEVA *et al.*, 1997; WINICOV, 1998; ROOSENS *et al.*, 1998). Além disso, são crescentes a quantidade de trabalhos com proteínas e peptídeos induzidos pelo estresse salino os quais desempenhariam papel importante na proteção de estruturas bioquímicas (INGRAN e BERTELS, 1996; RICCARDI *et al.*, 1998).

Alguns resultados em termos da identificação e transferência de genes simples ligados a enzimas envolvidas com a biossíntese de glicina-betaina, prolina e enzimas ligadas ao estresse oxidativo mostraram-se animadores (WINICOV, 1998; HARE *et al.*, 1999). Em geral, plantas que super expressam esses genes têm mostrado maior tolerância ao estresse salino (YEO, 1998). Entretanto, a maioria dos trabalhos ainda é realizada em condições limitadas de laboratório e ambientes artificiais. Outros estudos têm demonstrado que a expressão desses genes é muito complexa, dependendo da idade da planta e do tempo de exposição ao estresse (WINICOV, 1998; HARE *et al.*, 1999). Por outro lado, nem sempre as

cultivares que expressam maior atividade dessas enzimas ou maior acumulação de seus produtos, exibem maior tolerância para a salinidade (LUTTS *et al.*, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2001).

Os trabalhos com ajustamento osmótico de plantas submetidas ao estresse salino indicam que os íons salinos (Na^+ , Cl^-) são os mais importantes quantitativamente na manutenção do potencial osmótico em baixos níveis, particularmente nos vacúolos (ASHRAF e O'leary, 1995; DAVENPORT *et al.*, 1997; SILVEIRA *et al.*, 1999). Apesar de algumas dificuldades metodológicas de determinação da concentração real dos solutos nos vacúolos e citosol, existe um certo consenso de que os solutos orgânicos compatíveis são quantitativamente menos importantes no ajustamento osmótico (BOHNERT e JENSEN, 1996). Entretanto, como sua localização está restrita mais ao citosol é possível que sua importância seja subestimada nas avaliações atuais. De qualquer maneira, esses compostos, dentre os quais a prolina, exercem diversos efeitos favoráveis ao ajustamento osmótico e a adaptação das plantas ao estresse salino.

2. OBJETIVO GERAL

Os objetivos gerais deste trabalho estão identificados com a necessidade de explicar as principais alterações metabólicas relacionadas com a acumulação de prolina induzidas pelo estresse salino em plantas superiores do tipo glicófitas, utilizando como modelo de estudo o cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.).

3. MATERIAL

3.1 MATERIAL VEGETAL

As sementes do genótipo CCP06 de cajueiro anão (*Anacardium occidentale* L.), utilizadas nos experimentos, foram fornecidas pela EMBRAPA/ CNPAT (CE) (Figura 01). As plântulas foram obtidas após germinação em vermiculita, em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Nutrição de Plantas e Estresse Ambiental - LABPLANT do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará (UFC).

3.1.1. OBTENÇÃO DE PLÂNTULAS

As sementes de *Anacardium occidentale* L. foram superficialmente esterilizadas em uma solução comercial de hipoclorito de sódio 10% (v/v), com contínua aeração, durante 10 minutos, quando foram exaustivamente lavadas com água destilada para uma completa remoção do agente esterilizante. Logo após, as sementes foram imersas em água destilada, por um período de 24 horas, para acelerar o processo de germinação. Em seguida, as sementes foram acondicionadas para germinarem, em recipientes plásticos (40 x 30 x 25 cm), contendo vermiculita, com o nível de umidade do substrato mantido próximo a 70% da sua capacidade máxima de retenção de água, a partir de adições diárias de água destilada (VIÉGAS, 1999). As plântulas foram irrigadas com água até a queda dos cotilédones, quando então passaram a ser irrigadas com solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950), modificada, apresentando a seguinte composição: 4 mmol.L⁻¹ KNO₃, 3 mmol.L⁻¹ Ca(NO₃)₂, 1 mmol.L⁻¹ CaCl₂, 1 mmol.L⁻¹ MgSO₄, 1 mmol.L⁻¹ K₂HPO₄, 4 μmol.L⁻¹ B³⁺, 0,9 μmol.L⁻¹ Mn²⁺, 1,8



FIGURA 01 - Sementes do genótipo de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) CCP06.

$\mu\text{mol.L}^{-1}$ Cl_2^- , $0,03 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Cu^{2+} , $0,07 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Zn^{2+} e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ Fe^{3+} -EDTA . As plântulas, obtidas em condições controladas de casa de vegetação, foram submetidas aos tratamentos, decorridos 35 dias de idade (Figuras 02A e 02B).

4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Este trabalho de tese foi constituído de uma série de experimentos, os quais foram conduzidos em condições controladas de câmara de germinação (Figuras 03A e 03B), no caso de plântulas, e em condições laboratoriais no caso dos experimentos onde foram utilizados discos de folhas e/ou segmentos de raízes (Figura 04).

Os dados foram ajustados com equações de regressão, sendo os efeitos dos tratamentos avaliados tendo como referência o desvio padrão das médias.



FIGURA 02 - Casa de vegetação do Labplant (A) e estande com plântulas de cajueiro anão CCP06 (B).



FIGURA 03 - Câmara com condições controladas de temperatura, umidade e intensidade de luz (A) e plântulas de cajueiro em sistema de hidroponia (B).

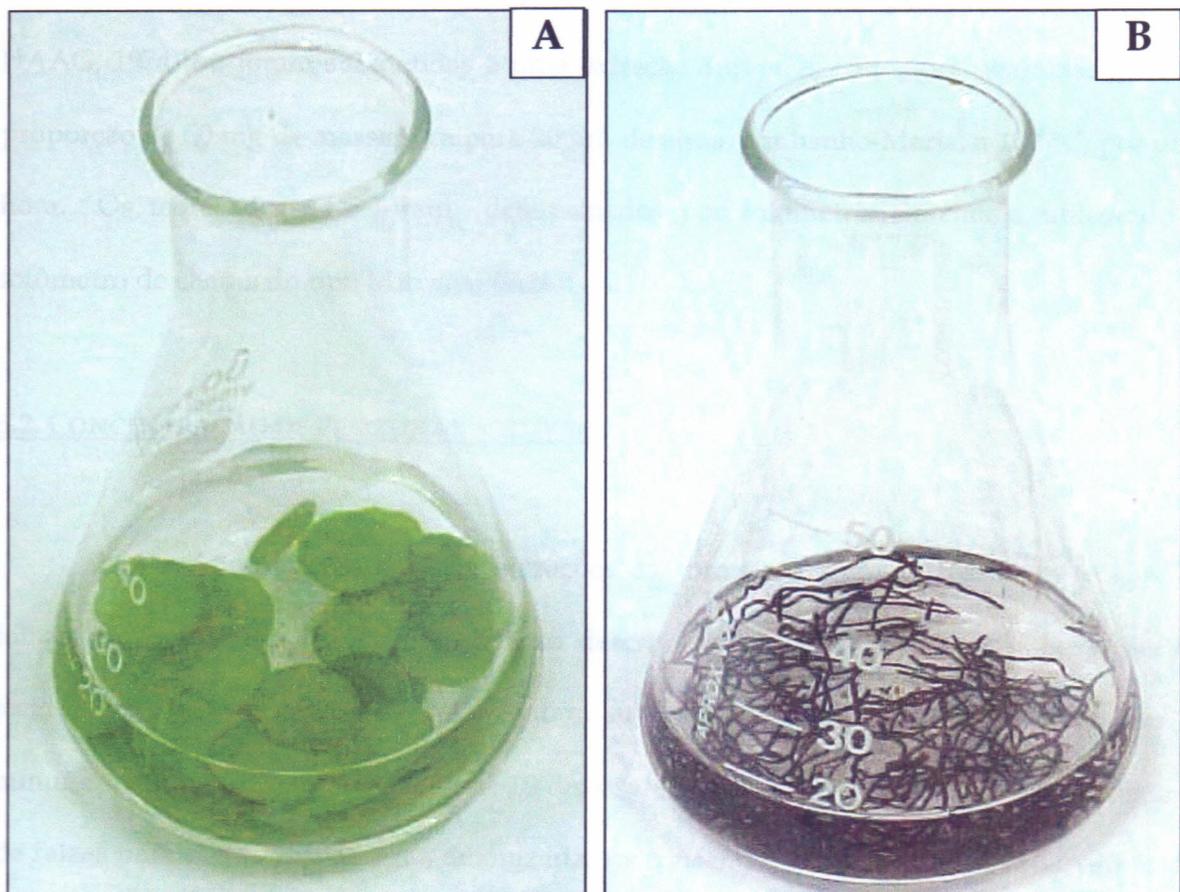


FIGURA 04 - Aspectos de discos de folhas (A) e segmentos de raízes de cajueiro (B) em contato com tampão HEPES 10 mmol.L^{-1} pH 6,0.

5. MÉTODOS

5.1. CONCENTRAÇÃO DE SÓDIO

Após liofilização do material vegetal (folhas e raízes), amostras de 100 mg foram mineralizadas por via úmida, empregando-se a digestão nitricoperclórica (SARRUGE e HAAG, 1974) ou foram submetidas a uma extração à quente, com água deionizada, numa proporção de 50 mg de massa seca para 20 mL de água, em banho-Maria, a 100 °C, por uma hora. Os teores de sódio foram determinados por fotometria de chama utilizando-se fotômetro de chama do tipo Micronal B426.

5.2. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

Para a determinação das concentrações das proteínas solúveis totais em tecidos de folhas e de raízes foi utilizado o método descrito por BRADFORD (1976). Amostras de tecidos frescos de folhas ou de raízes foram submetidas a uma extração à quente, por 30 minutos, a 100 °C, numa proporção de 10 discos de folhas de 10 mm de diâmetro ou 100 mg de raízes para cada 5 mL de água deionizada. As concentrações das proteínas solúveis totais foram calculadas com base em uma curva padrão ajustada a partir de doses crescentes de albumina de soro bovino (BSA) p.a. (Sigma), a 595 nm, em espectrofotômetro tipo Spectronic 20 Genesys.

5.3. CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES TOTAIS (N- α -AMINO)

A concentração dos aminoácidos livres totais foi determinada pelo método de PEOPLES *et al.*, (1989). Amostras de tecidos frescos de folhas ou de raízes foram submetidas

a uma extração à quente, por 30 minutos, a 100 °C, numa proporção de 10 discos de folhas (10 mm de diâmetro) ou 100 mg de raízes para cada 5 mL de água deionizada. A reação para dosagem de aminoácidos livres totais foi conduzida em tubos de ensaio contendo uma alíquota de 0,1 mL de extrato, em presença de 0,25 mL de uma solução tamponada a pH 5,0 contendo 0,2 mol.L⁻¹ de citrato, 0,25 mL do reagente de ninhidrina (KCN 0,10 mmol.L⁻¹; e ninhidrina 5% em methoxyetanol) e 0,4 mL de água destilada. Após homogeneização, os tubos, hermeticamente fechados, foram acondicionados em banho-maria, a 100 °C, por um período de 15 minutos. A reação foi interrompida pela redução da temperatura do meio mediante contato dos tubos de ensaio com água, a 2 °C e adicionados 1,5 mL de etanol 50% (v/v). As absorbâncias foram feitas a 570 nm em espectrofotômetro do tipo Spectronic 20 Genesys. Os teores de aminoácidos livres totais foram determinados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de L-glutamina.

5.4. CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIO LIVRE

A concentração de amônio livre foi determinado segundo FELKER (1977). Amostras de tecidos frescos de folhas ou de raízes foram submetidos a uma extração à quente, por 30 minutos, a 100 °C, numa proporção de 10 discos de folhas (10 mm de diâmetro) ou 100 mg de raízes para cada 5 mL de água deionizada. De cada extrato obtido, uma alíquota de 400 µL foi transferido para tubos de ensaio contendo 2,5 mL da solução de reação A (5g de fenol e 0,025 g de e água deionizada para 500 mL de solução). Após agitação, foram acrescentados 2,5 mL da solução de reação B (2,5 g de NaOH e 12,6 mL de hipoclorito de sódio comercial e água deionizada para 500 mL de solução) ao meio de reação e, posteriormente, foram incubados em banho-maria, por 20 minutos, a 37 °C. Decorridos 60 minutos do término do procedimento de incubação, as absorbâncias foram lidas, em 625 nm, em espectrofotômetro

do tipo Spectronic 20 Genesys. A concentração de amônio livre foi determinada utilizando-se uma curva padrão ajustada com concentrações crescentes de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

5.5. CONCENTRAÇÃO DA PROLINA LIVRE

Os conteúdos de prolina livre foram determinados segundo a metodologia de BATES (1973). Amostras de tecidos frescos de folhas ou de raízes foram submetidos a uma extração à quente, por 30 minutos, a 100 °C, numa proporção de 10 discos de folhas (10 mm de diâmetro) ou 100 mg de raízes para cada 5 mL de água deionizada. Alíquotas de 1,0 mL do extrato obtido foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1,0 mL de ninhidrina ácida (1,0 g do reagente de ninhidrina em 24,0 mL de ácido acético glacial p.a. e 16,0 mL de ácido fosfórico 6,0 mol.L⁻¹) e 1,0 mL de ácido acético glacial concentrado. Após homogeneização, em vortex, os tubos, hermeticamente fechados, foram acondicionados em banho-maria, a 100 °C durante 1 hora. A reação foi interrompida pela redução da temperatura do meio mediante contato dos tubos de ensaio com água, a 2 °C. Em seguida 2,0 mL de tolueno p.a. foi adicionado ao meio de reação. Após agitação em vortex a fase aquosa superior, de coloração avermelhada, foi recuperada e submetida a leitura a 520 nm em espectrofotômetro do tipo Spectronic 20 Genesys. Os teores de prolina livre foram estimados com base em uma curva padrão ajustada a partir de concentrações crescentes de L-prolina p.a. (Sigma).

5.6. SEPARAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES POR HPLC

A composição dos aminoácidos livres foi conduzida com base na derivatização com fenilisotiocianato (PITC), seguida da separação e quantificação em HPLC, onde amostras de folhas liofilizadas de cajueiro foram preparadas segundo o protocolo da Figura 05. Os produtos da derivatização foram separados em coluna de fase reversa do tipo C-18 (Waters)

pré-equilibrada com tampão acetato pH 6,4, sendo eluídos com um gradiente de acetonitrila (0 - 54%). Os aminoácidos eluídos foram monitorados por um detector ultravioleta ajustado em 254 nm. A concentração de cada aminoácido foi determinada pela área do seu respectivo pico, comparando-se com o pico do mesmo aminoácido padrão utilizado, cuja concentração era de 1mg/mL.

5.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTAMINA SINTETASE (GS)

Amostras de tecido vegetal fresco (folhas) foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, em um meio contendo tampão de extração (fosfato de potássio 0,1 mol.L⁻¹, pH 8,0 contendo EDTA 5,0 mmol.L⁻¹, β-mercaptoetanol 10,0 mmol.L⁻¹, DTT 10,0 mmol.L⁻¹, ácido ascórbico 5,0 mmol.L⁻¹ e PEG 6.000 3%) numa proporção de 1:3 (m/v). Posteriormente, o extrato foi submetido a uma centrifugação, a 10.000 x g, durante 10 minutos, a 4°C. No sobrenadante obtido foi determinada a atividade enzimática da GS (EC 6.3.1.2), segundo KANAMORI e MATSUMOTO (1972). Aliquotas de 0,5 mL de extrato foram incubação adicionadas em tubos de ensaio contendo tampão Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 7,0, ATP 6 mmol.L⁻¹, MgSO₄ 50 mmol.L⁻¹, hidroxilamina-NaOH 0,25 mol.L⁻¹ (1:1), glutamato de sódio 0,5 mol.L⁻¹. Após em banho-maria, por 30 minutos, a 30 °C, a reação foi paralisada pela adição de uma solução 1:1:1 de FeCl₃ 10% em HCl 0,2 mol.L⁻¹, TCA 24% e HCl 50%. Subseqüentemente, a solução foi centrifugada a 10.000 x g, por 10 minutos, à temperatura ambiente, e sua absorbância lida em 540 nm em espectrofotômetro do tipo Spectronic 20 Genesys . A atividade GS foi determinada a partir do ajuste de uma curva padrão com concentrações crescentes de γ-glutamil-hidroximato.

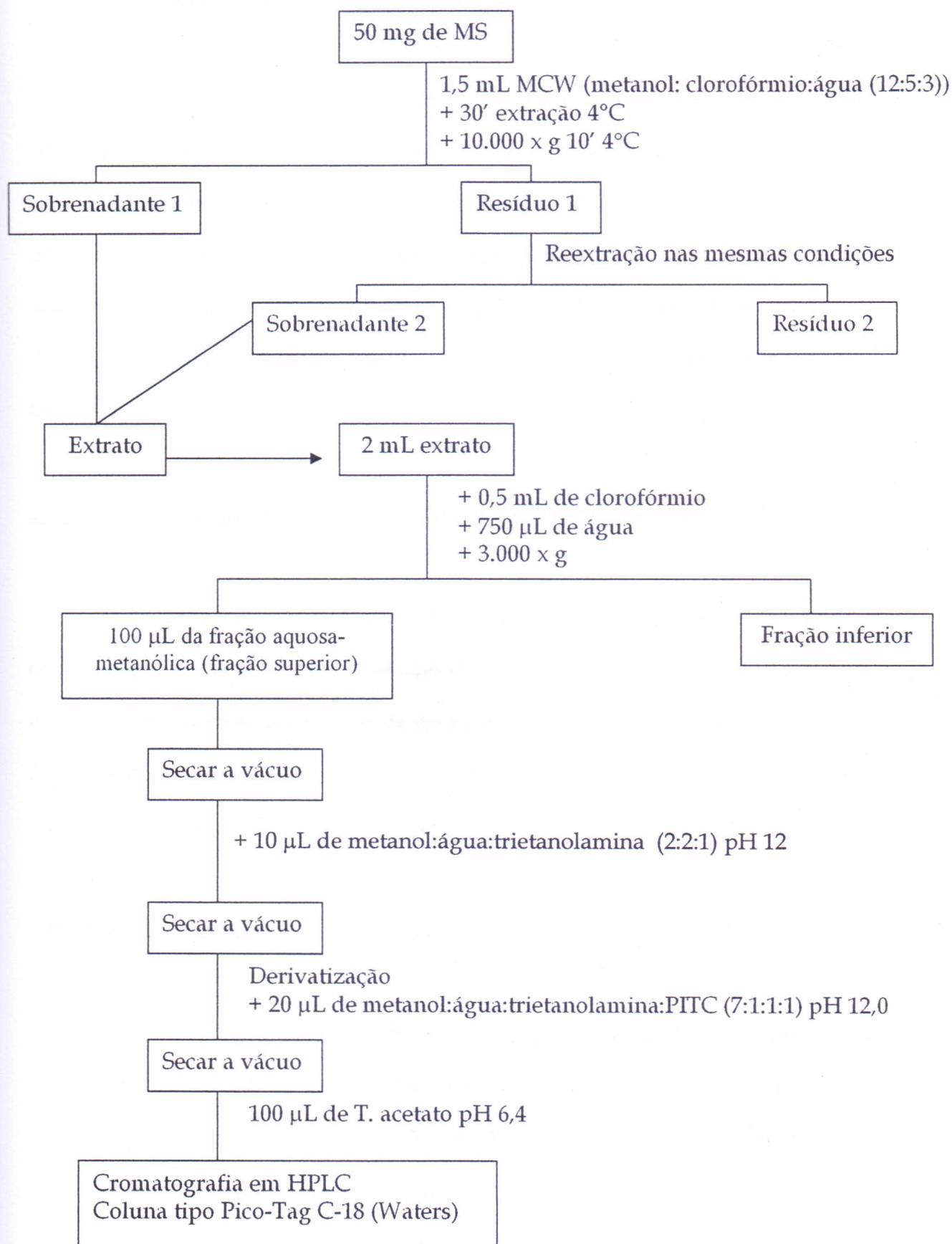


FIGURA 05 - Protocolo de extração para aminoácidos livres.

5.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ORNITINA δ -AMINOTRANSFERASE (OAT)

Os extratos enzimáticos foram obtidos nas mesmas condições anteriores (item 5.7. pág. 15). A atividade enzimática da OAT (EC 2.6.1.13) foi determinada através da oxidação de NADH segundo CHAREST e PHAN (1990). Alíquotas de 0,2 mL de extrato foram adicionadas em tubos de ensaio contendo tampão Tris-HCl 0,2 mol.L⁻¹, pH 8,0, ornitina 5 mmol.L⁻¹ e α -cetogluturato 10 mmol.L⁻¹ e 0,25 mmol.L⁻¹ de NADH. A reação teve o decréscimo de sua absorbância monitorada em 340 nm, em espectrofotômetro do tipo Genesys 5.

5.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA L-GLUTAMATO DESIDROGENASE (GDH)

A atividade enzimática da GDH (EC 1.4.1.2) foi determinada em extratos de folhas obtidos segundo o item 5.7. pág. 15 através da oxidação de NADH. Alíquotas de 0,2 mL de extrato foram adicionadas em tubos de ensaio contendo tampão Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4 contendo α -cetogluturato 7 mmol.L⁻¹, cloreto de amônio 10 mmol.L⁻¹ e 0,25 mmol.L⁻¹ de NADH. A reação teve o decréscimo de sua absorbância monitorada em 340 nm.

5.10. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA L-GLUTAMATO SINTASE (GOGAT)

A determinação da atividade da L-glutamato-sintase (EC 1.4.1.14) seguiu a metodologia de MATOH e TAKAHASHI (1981). A atividade foi determinada em extratos de folhas obtidas de acordo com o item 5.7. pág. 15. pela oxidação de NADH. Em tubos de ensaio contendo tampão Tris-HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4 contendo EDTA 1 mmol.L⁻¹, glutamina 1 mmol.L⁻¹, α -cetogluturato 5 mmol.L⁻¹ e 0,25 mmol.L⁻¹ de NADH uma alíquota de

0,2 mL de extrato foi adicionada para o início da reação. A reação foi monitorada em espectrofotômetro do tipo Geneys 5, através do decréscimo de sua absorbância a 340 nm.

5.11. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROLINA DESIDROGENASE (PDH)

A atividade da PDH (EC 1.5.1.2) foi determinada em extratos de folhas obtidos segundo o item 5.7. pág. 15 através da oxidação do NAD. No meio de reação, contendo tampão $\text{NaCO}_3\text{-HCl}$ $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 10,3, prolina $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de NAD uma alíquota de 0,2 mL de extrato foi adicionada para o início da reação. A reação foi monitorada em espectrofotômetro do tipo Genesys 5 através do acréscimo de sua absorbância a 340nm.

CAPÍTULO 1

ACUMULAÇÃO DE PROLINA E DE SEUS PRECURSORES EM DISCOS E FOLHAS DE
PLÂNTULAS DE CAJUEIRO EM RESPOSTA AO ESTRESSE SALINO

1.1 INTRODUÇÃO

Estudos bioquímicos têm demonstrado que plantas submetidas aos estresses salino ou hídrico podem acumular uma série de compostos orgânicos, denominados de solutos compatíveis, os quais não interferem no metabolismo vegetal (KUZNETSOV e SHEVYAKOVA, 1997). A acumulação de prolina, em resposta à salinidade ou à deficiência hídrica, tem sido amplamente estudada e, freqüentemente, tem sido envolvida com mecanismos de resistência às diferentes formas de estresse ambiental (LUTTS *et al.*, 1999). A acumulação de prolina, em tecidos vegetais, com perda de turgescência, foi observada, inicialmente, por (KEMBLE e MACPHERSON, 1954), trabalhando com pasto de centeio. A prolina parece ser, largamente, o osmólito mais acumulado sob condições de estresse não somente em plantas, mas também em outros organismos como, por exemplo, as eubactérias, os protozoários, os invertebrados marinhos e as algas (DELAUNEY e VERMA, 1993).

Até o presente momento, o efetivo papel da acumulação de prolina sob a tolerância das plantas à salinidade é ainda controverso (YEO, 1998) A síntese de prolina, induzida pela salinidade, não é sempre rápida, começando somente quando a injúria celular é evidente. Além disso, a acumulação de prolina pode ocorrer, intensivamente, em vários tecidos vegetais como, por exemplo, flores e frutos não sujeitos a nenhuma forma de estresse ambiental. Contudo, não existem informações concretas se a acumulação de prolina, em tecidos vegetais, fornece uma vantagem adaptativa genético-induzida ou, por outro lado, se é apenas uma consequência de outras mudanças induzidas pelo estresse no metabolismo geral da planta (DENAULEY e VERMA, 1993; LA ROSA *et al.*, 1991).

A acumulação de prolina, induzida sob condições de estresse, é mediada por aumentos na síntese de glutamato e ornitina bem como por decréscimos na oxidação desses compostos (HARE e CRESS, 1997). Em comparação com grande parte dos aminoácidos,

prolina tem a vantagem metabólica de ser o produto final de uma via relativamente curta e, sobretudo, altamente regulada. A prolina e seu precursor imediato o Δ^1 - pirroline-5-carboxilato (P5C) não são interconvertidos em um único passo reversível por uma única enzima, mas por duas enzimas distintas com diferentes mecanismos de regulação e diferentes compartimentos subcelulares.

Nas plantas superiores, a prolina pode ser sintetizada a partir do glutamato via Δ^1 -pirroline-5-carboxilase (P5C) por duas reduções sucessivas, que são catalisadas pela Δ^1 -pirroline-5-carboxilase-sintetase (P5CS) e pela Δ^1 -pirroline-5-carboxilase-redutase (P5CR) (HARE *et al.*, 1999) ou, alternativamente, a partir da ornitina via ornitina- δ -aminotransferase (OAT) (ROOSENS *et al.*, 1998; LUTTS *et al.*, 1999) (Figura 06). Contudo, a acumulação de prolina pode ser também associada com o decréscimo na sua oxidação, baixo requerimento para síntese protéica além da acumulação em tecidos vegetais causada por restrições em seu transporte para outras partes da planta (VIÉGAS e SILVEIRA, 1999). Ainda assim, a acumulação de prolina pode resultar de um distúrbio generalizado no metabolismo de aminoácidos associado com o aumento do catabolismo de proteínas e com a senescência induzida precocemente pela salinidade (LUTTS *et al.*, 1996; LUTTS *et al.*, 1999; VIÉGAS e SILVEIRA, 1999).

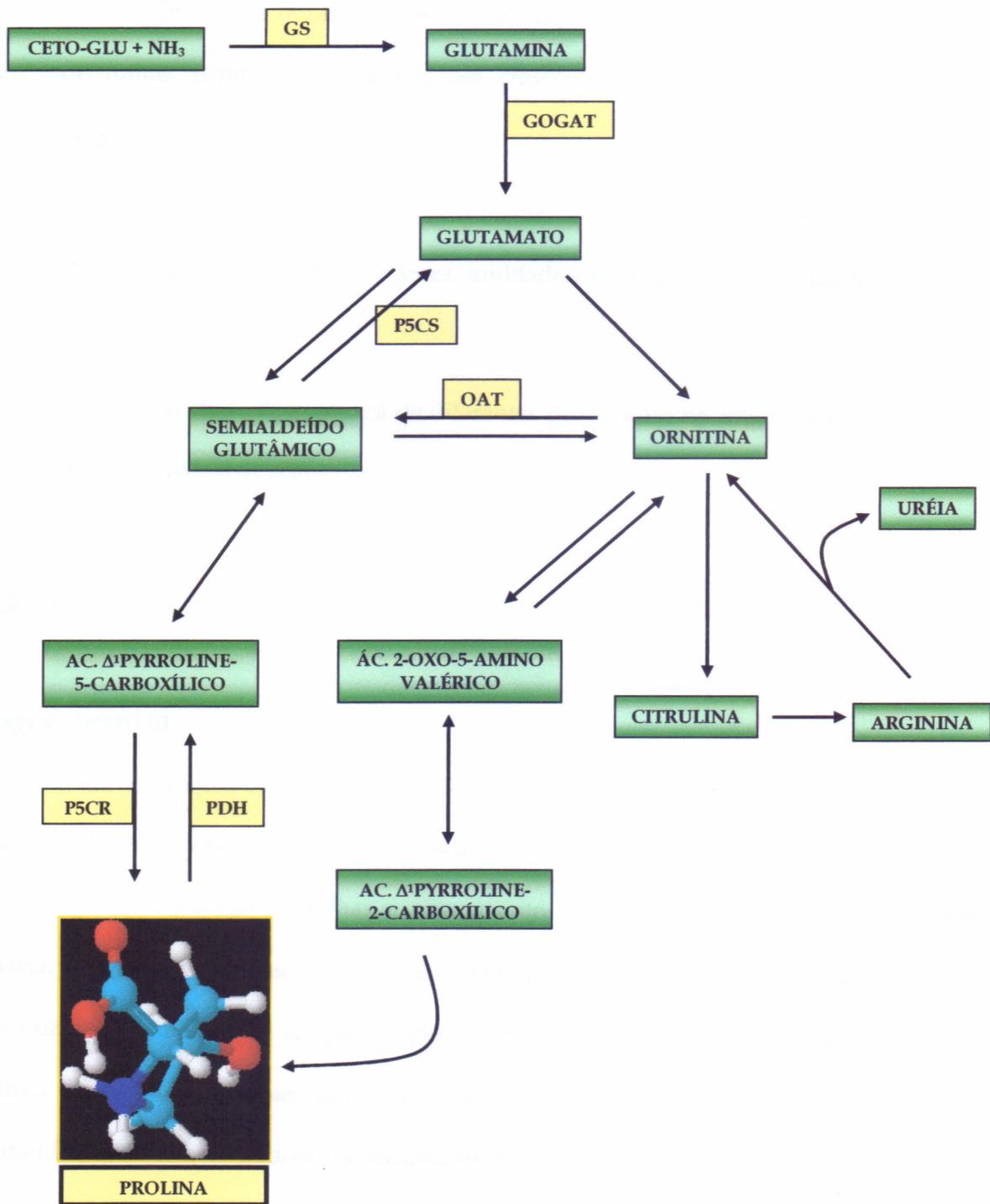


FIGURA 06 - Vias de síntese da prolina.

1.2 OBJETIVOS

- Investigar o acúmulo diferencial de prolina, em plântulas de cajueiro usando como modelo de estudo, raízes e folhas de plântulas íntegras e segmentos de raízes e discos de folhas, expostas a concentrações crescentes de NaCl e diferentes tempos de exposição.
- Verificar uma possível variação no conteúdo de prolina em plântulas de cajueiro durante um dia típico (temperatura, umidade e radiação solar) da cidade de Fortaleza (CE).
- Observar o efeito da presença de diferentes precursores na acumulação de prolina em discos de folhas de plântulas de cajueiro.

1.3 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

EXPERIMENTO 01

Para os estudos utilizando tecidos, discos de folhas (diâmetro de 10 mm) e segmentos de raízes (0,5 cm) foram retirados de plântulas com 35 dias de idade obtidas segundo o item 3.1.1 pág. 05. Os discos de folhas e os segmentos de raízes foram incubados, em banho-maria, a 30 °C, por 24 horas, com agitação, numa proporção de 50 discos de folhas ou 300 mg de raízes, para 10 mL de tampão HEPES, 10 mmol.L⁻¹, pH 6,0. A composição do tampão sofreu modificações, apenas, nas concentrações de NaCl utilizadas (0, 100, 200, 300 e 400 mmol.L⁻¹). Ao final do período de incubação, as amostras (discos de folhas e segmentos de raízes) foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 07).

EXPERIMENTO 02

Decorridos, aproximadamente, 35 dias da germinação, em vermiculita, as plântulas de cajueiro obtidas como no experimento anterior foram transferidas para vasos plásticos (altura 21 cm e diâmetro 10 cm), contendo 800 mL da solução de Hoagland, com 1:10 da concentração previamente estabelecida no item 3.1.1. pág. 05. As plântulas foram mantidas, por 24 horas, em condições de câmara de germinação, com temperatura e umidade de 30 °C ($\pm 0,5$) e 80% ($\pm 1,0$), respectivamente, para aclimação. Após esse período de aclimação, as plântulas foram expostas a 200 mmol.L⁻¹ de NaCl durante diferentes tempos (0, 12, 24, 48 e 72 horas) nas mesmas condições. Ao final do período de tratamento, amostras (folhas) foram coletadas e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 08).

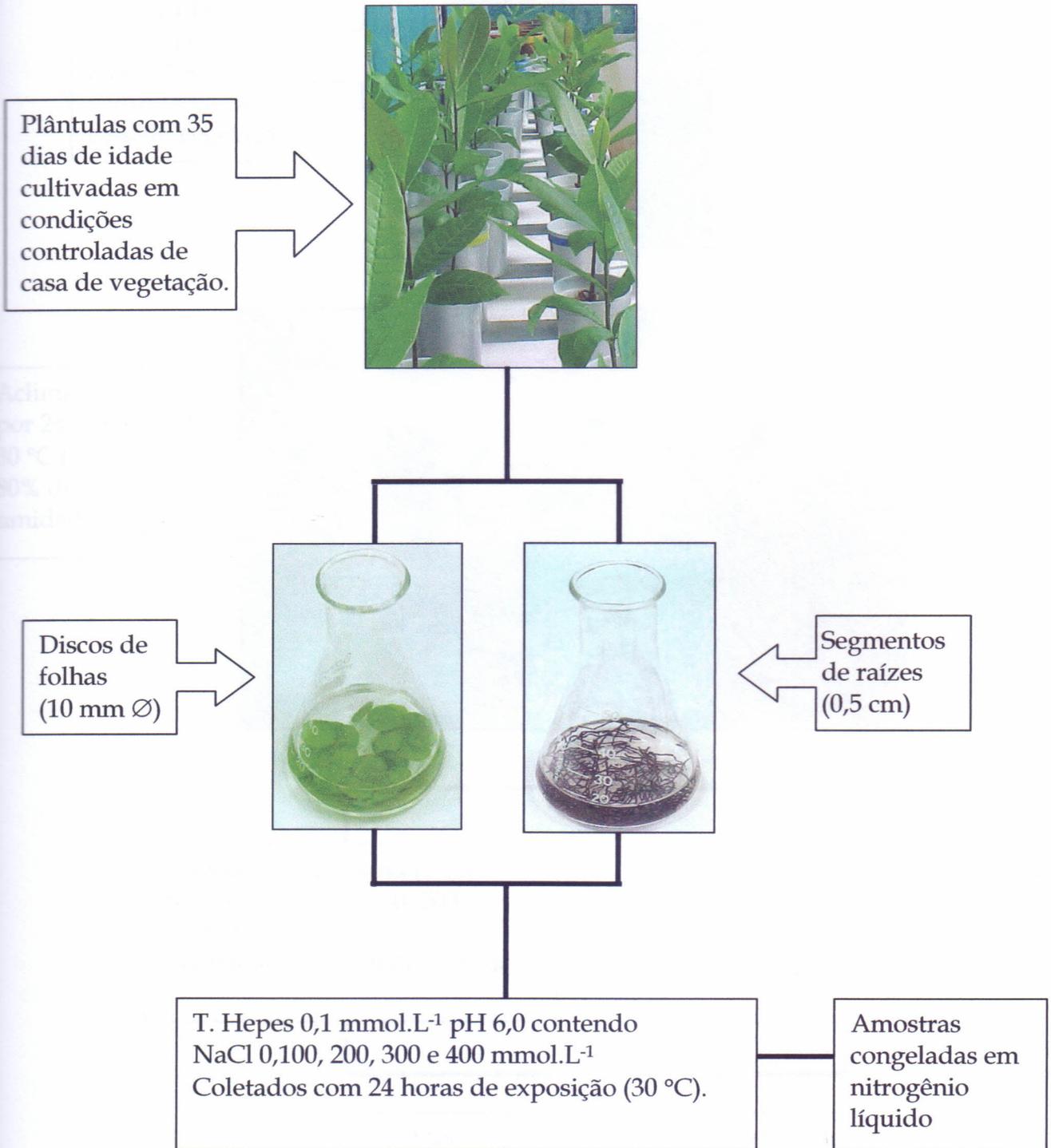


FIGURA 07 - Protocolo experimental (experimento 01).

Plântulas com 35 dias de idade cultivadas em condições controladas de casa de vegetação.



Aclimação por 24 horas 30 °C (± 0,5), 80% de umidade



Solução de Hoagland (1:10) contendo NaCl 0, 100, 200 e 400 mmol.L⁻¹
Coletadas com 48 h de exposição

Solução de Hoagland (1:10) contendo NaCl 200 mmol.L⁻¹
Coletadas com 0, 12, 24 e 48 h de exposição.

Amostras congeladas em nitrogênio líquido

FIGURA 08 - Protocolo experimental (experimento 02 e 03).

EXPERIMENTO 03

Plântulas obtidas em condições idênticas a anterior foram expostas a diferentes níveis de estresse salino durante 48 horas, a composição da solução nutritiva sofreu apenas modificações nas concentrações de NaCl utilizadas: 0, 100, 200 e 400 mmol.L⁻¹. Ao final do período de tratamento, amostras (folhas) foram coletadas e posteriormente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 08).

EXPERIMENTO 04

Para se observar possíveis variações no conteúdo de prolina, plântulas de cajueiro com aproximadamente 35 dias de idade, cultivadas em vasos com vermiculita, em casa de vegetação, tiveram suas folhas coletadas durante um dia típico da cidade de Fortaleza (CE). As coletas foram distribuídas ao longo do dia, às 8:00, 9:00, 12:00, 15:00 e 18:00 horas, sendo monitorados, simultaneamente, a umidade relativa do ar (%), a temperatura (°C) e a radiação solar ($\mu\text{Em}^{-2}\text{sec}^{-1}$). Subseqüentemente a cada coleta, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posteriores análises. Em cada coleta foram usadas três repetições. O efeito da salinidade, sobre as variáveis determinadas, foi analisado tendo como referência o desvio padrão das médias (Figura 09).

EXPERIMENTO 05

Para os estudos utilizando precursores exógenos, discos de folhas (diâmetro de 10 mm) foram retirados de plântulas com 35 dias de idade. Os discos de folhas foram incubados, em banho-maria, a 30°C, por 24 horas, com agitação, numa proporção de 50 discos de folhas para 10 mL de tampão Hepes, 10 mmol.L⁻¹, pH 6,0 contendo 10 mmol.L⁻¹ de cada precursor (ornitina, arginina, glutamato e glutamina). Ao final do período de incubação, as amostras (discos de folhas e segmentos de raízes) foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 10).

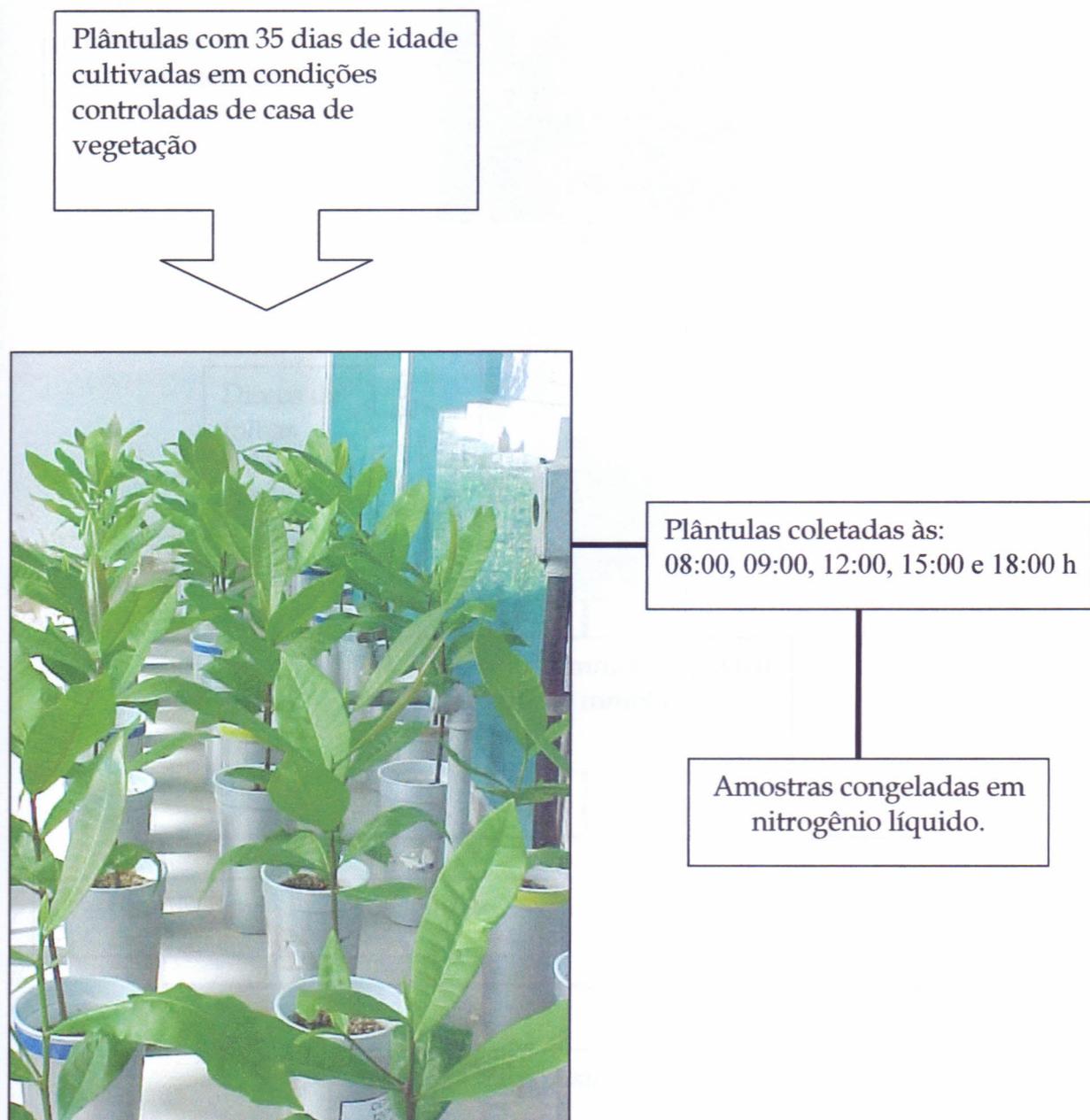


FIGURA 09 - Protocolo experimental (experimento 04).

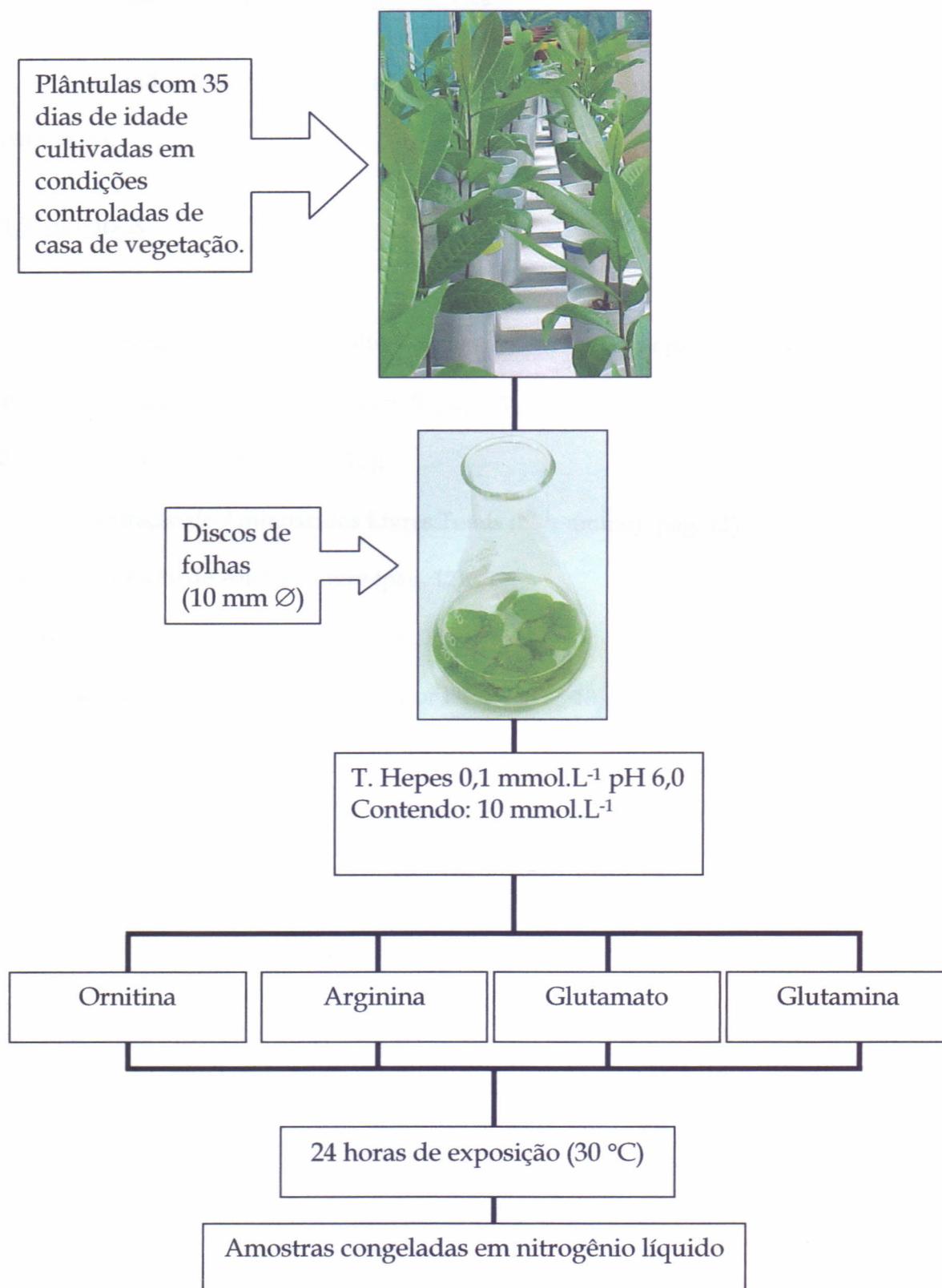


FIGURA 10 - Protocolo experimental (experimento 05).

1.4 EFEITOS DOS TRATAMENTOS SOBRE AS VARIÁVEIS ANALISADAS

Os dados foram ajustados à equação de regressão ou submetidas a coeficientes de correlação.

1.5 MÉTODOS

As metodologias das análises utilizadas nesses experimentos estão descritas nos respectivos subitens dos Métodos item 5 (pág. 11):

- 5.1. Concentração de Sódio (pág. 11);
- 5.3. Concentração de Aminoácidos Livres Totais (N- α -amino) (pág. 11);
- 5.4. Concentração de Amônio Livre (pág. 12);
- 5.5. Concentração de Prolina Livre (pág. 13);
- 5.6. Separação de Aminoácidos Livres por HPLC (pág. 13).

1.6 RESULTADOS

Neste primeiro trabalho procurou-se responder algumas questões básicas a respeito da acumulação de prolina em plântulas de cajueiro expostas ao estresse salino em continuidade aos estudos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório (VIÉGAS, 1999; FERREIRA, 2000; MATOS, 2001; SILVA, 2002; MENESES JUNIOR, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2003). A questão central foi saber se as respostas apresentadas por discos de folhas e segmentos de raízes expostas ao estresse salino eram fisiologicamente compatíveis com aquelas apresentadas por plantas intactas. Caso os modelos simplificados fossem validados em termos da acumulação de Na^+ e de prolina, seriam conduzidos experimentos preliminares no sentido de responder a questão fundamental desta tese: Qual a via preferencial de síntese/acumulação da prolina em folhas de cajueiro?

Quando discos de folhas e segmentos de raízes de plântulas de cajueiro foram incubados em meio tamponado (Hepes $0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ pH 6,0), durante 24 horas, na presença de concentrações crescentes de NaCl, aumentos quase lineares nas concentrações de Na^+ , tanto nos discos, como nos segmentos de raízes, foram observados (Figura 11A). O incremento e a concentração de Na^+ nos discos foram cerca de 2 vezes maiores (800 mmol.kg^{-1}) comparados com os segmentos de raízes, no nível mais elevado de NaCl externo (400 mmol.L^{-1}). A acumulação de Na^+ nos discos expostos a 200 e 300 mmol.L^{-1} de NaCl, em função do tempo de contato com a solução ocorreu numa tendência, aproximadamente, hiperbólica, com saturação entre 12 e 24 horas (Figura 12A). Ao mesmo tempo, a percentagem de danos nas membranas nos discos, estimada através do vazamento de K^+ , foi aumentada, somente, entre 12 e 24 horas (Figura 12C).

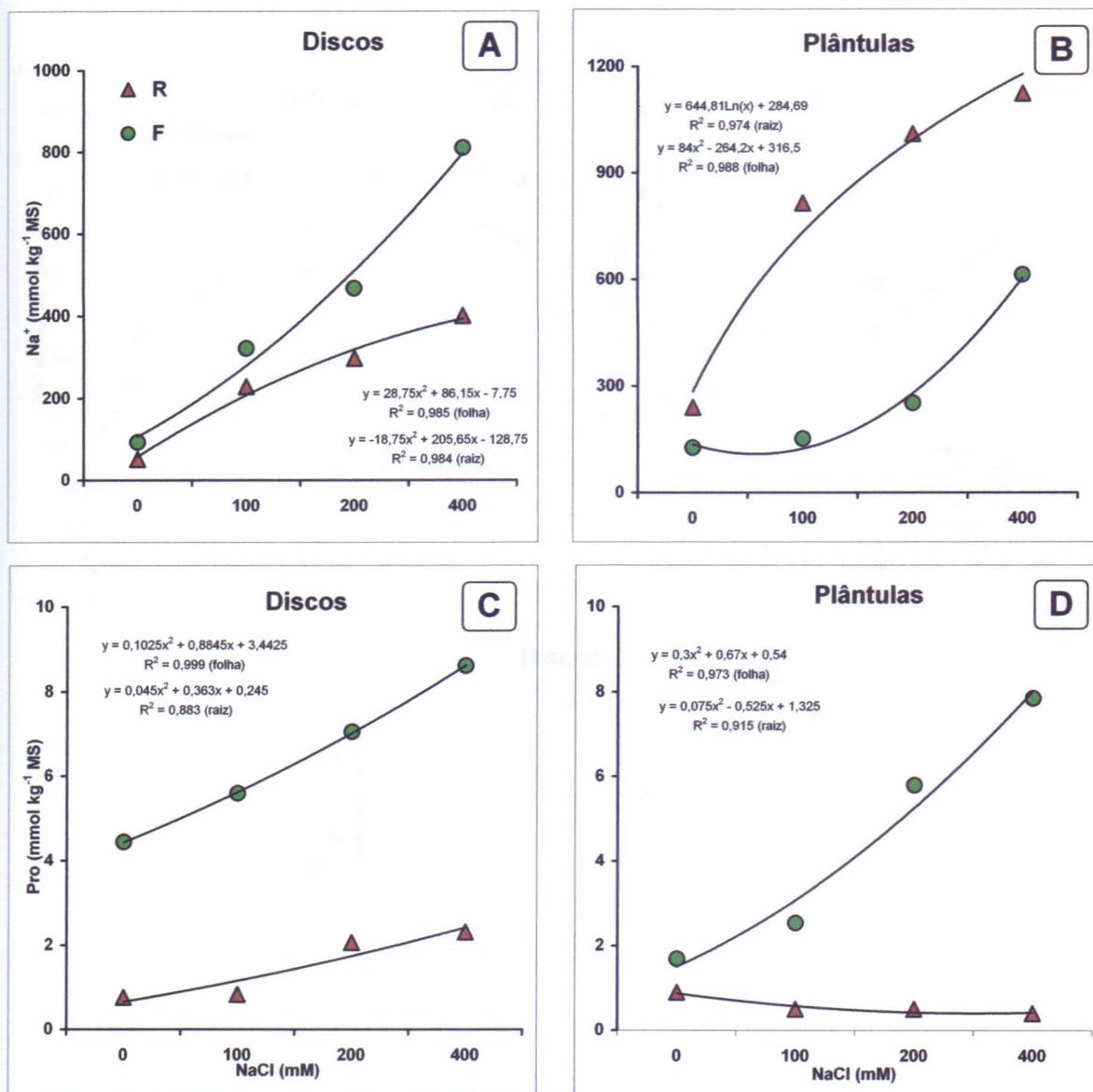


FIGURA 11 - Concentração de sódio e prolina em raízes (\blacktriangle) e folhas (\bullet). Discos de folhas e segmentos de raízes destacados (A) e (C) e folhas e raízes de plântulas intactas (B) e (D) de cajueiro submetidos a doses crescentes de NaCl durante 24 horas para segmentos de raízes e discos de folhas destacados e 48 horas para plântulas.

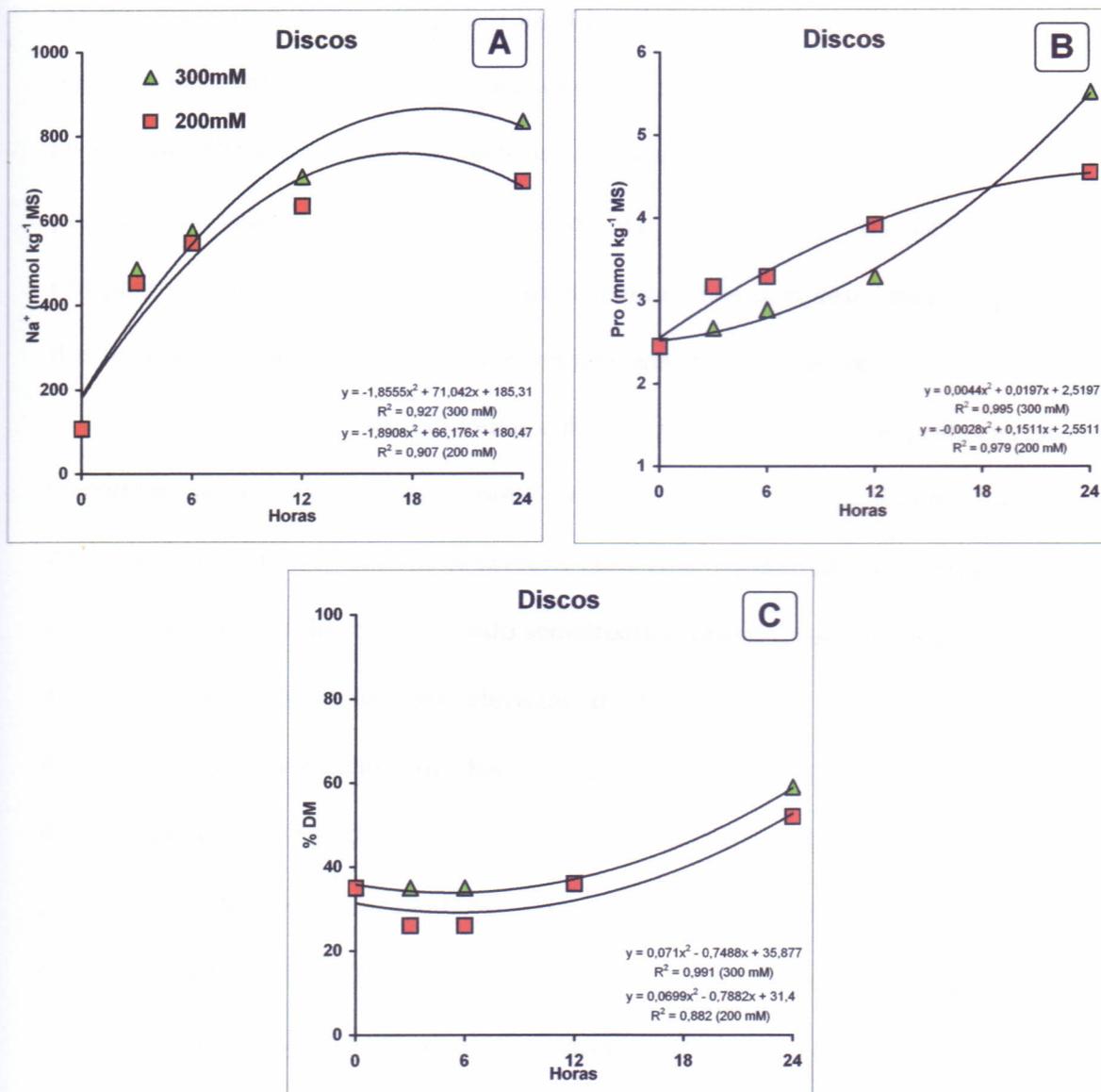


FIGURA 12 - Concentração de sódio (A), prolina (B) e percentagem de danos em membranas (K^+) (C) em discos de folhas de cajueiro na submetidos a 200 (\blacksquare) e 300 (\blacktriangle) mmol.L^{-1} de NaCl, a 30°C por 24 horas.

A acumulação de prolina em discos e segmentos de raízes seguiu tendência semelhante àquela de Na^+ (Figura 11A, 11C). Entretanto, as concentrações de Pro foram substancialmente menores nos segmentos de raízes. Quando analisada em função do tempo de exposição a 200 e 300 mmol.L^{-1} de NaCl, a acumulação de Pro foi crescente atingindo o valor máximo com 24 horas (Figura 12B). Apesar de segmentos de órgãos ou partes vegetais serem bastante utilizados como modelos experimentais para estudo de respostas fisiológicas ao estresse salino, em cajueiro tais estudos ainda não haviam sido realizados. Dessa maneira, procuramos validar o modelo de discos de folhas tendo em vista suas vantagens comparativas ao uso de plantas inteiras: sistema menos complexo, maior reprodutibilidade dos resultados, simplicidade e rapidez nas respostas fisiológicas, etc.

A acumulação de Na^+ em folhas e raízes de plantas intactas expostas a concentrações crescentes de NaCl, durante 48 horas, apresentou resposta semelhante aquela observada para discos e segmentos de raízes (Figura 11A, 11B). Apesar das concentrações de Na^+ nas folhas e nos discos foliares terem sido semelhantes, observou-se que as raízes das plântulas apresentaram concentrações mais elevadas do que as folhas e cerca de 3 vezes maiores das apresentadas nos segmentos de discos (Figura 11A, 11B). É interessante observar que a acumulação de Pro nos discos de folhas foi semelhante aquela apresentada nas folhas das plântulas intactas, particularmente no maior nível de NaCl (400 mmol.L^{-1}): aproximadamente 8 mmol Pro.Kg^{-1} MS. Novamente as raízes intactas apresentaram concentrações muito baixas de Pro e não responderam ao aumento e concentração de NaCl (Figura 11C e 11D).

Quando as plântulas foram expostas a diferentes tempos com 200 mmol.L^{-1} de NaCl, observou-se que a acumulação de líquida de Pro (expressa como percentagem dos aminoácidos livres totais) nas folhas ocorreu em paralelo com a concentração de Na^+ (Figura 13A). Entretanto, quando a concentração de Pro foi expressa na base de massa os aumentos ocorreram, somente, após 12 horas enquanto que as concentrações de AALT foram aumentadas somente discretamente ao longo de todo o período experimental (72 horas) (Figura 13B).

R13839073

Outra questão básica levantada a seguir foi: Qual a flutuação metabólica na acumulação de prolina em folhas de plântulas de cajueiro ao longo de um dia de típico sujeito a oscilações significativas de temperatura, déficit de pressão de vapor, umidade e intensidade de radiação? Os resultados da Figura 14 mostraram que a amplitude de variação da concentração de prolina foi relativamente baixa ($1,26 \pm 0,4$ a $1,61 \pm 0,54$), ao longo do dia.

Na realidade existe uma certa variação na concentração de prolina, como era de se esperar de um aminoácido na fração solúvel da célula. Assim, foi observado que a concentração de prolina nos discos de folhas expostos somente ao tampão Hepes (ausência de NaCl) foi geralmente maior que o apresentado em folhas de plântulas, expostas por 48 horas, à solução nutritiva, e na ausência de NaCl (Figura 11C, 11D). Na realidade, após sua retirada da planta e incubação, os discos devem ter sofrido algum tipo de estresse não relacionado ao NaCl. De qualquer maneira, os discos do controle apresentaram aspecto visual saudável semelhante aquele mostrado antes da incubação, enquanto os tratados com NaCl apresentaram sintomas visuais de injúrias e senescência (Figura 15). Diferentemente, os sintomas visuais das injúrias causadas pelo estresse salino nas folhas das plântulas foram diferentes daqueles dos discos e bastante variados (murchamento (A), "queima" dos bordos das folhas (B), morte das folhas apicais (C), degradação da clorofila (D) e manchas necróticas (E)), conforme mostra a seqüência na Figura 16.

Apesar dos discos de folhas se mostrarem modelos adequados para a acumulação de prolina na presença de NaCl, é interessante observar que o tipo de resposta com relações às concentrações dos principais precursores da síntese de prolina (glutamato, glutamina, ornitina e arginina), em função da concentração de NaCl, foram contrastantes entre discos e folhas de plântulas.

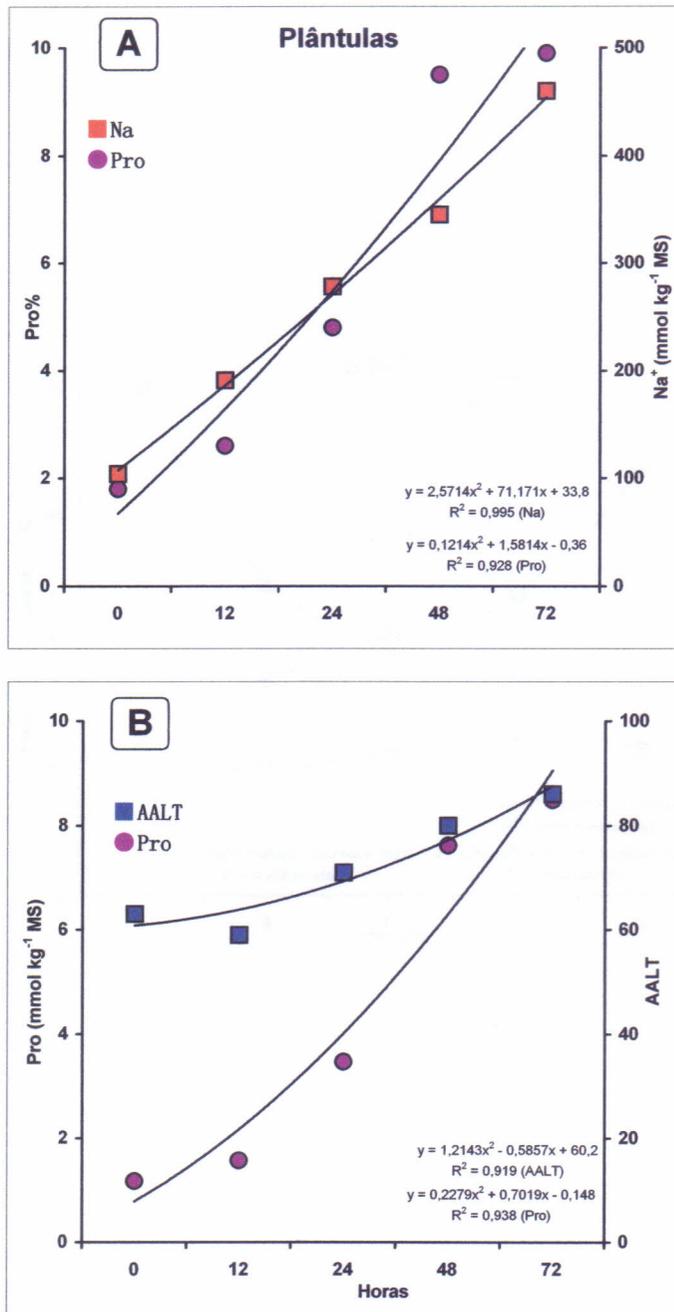


FIGURA 13 – Variações nas percentagens de sódio (■) e prolina (●) (A), aminoácidos livres totais (■) e prolina (●) (B) em folhas de plântulas de cajueiro submetidos a 200 mmol.L⁻¹ de NaCl.

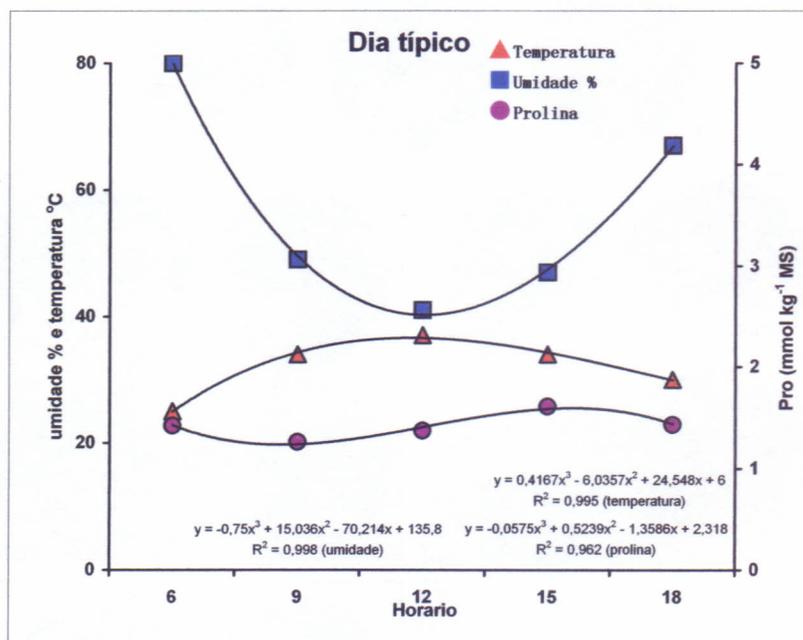


FIGURA 14 - Variações na temperatura (▲), umidade (■) conteúdo de prolina (●) em folhas de plântulas de cajueiro mantidos em condições de casa de vegetação durante um dia típico em Fortaleza (quanto a temperatura, umidade e radiação solar). A radiação solar ($\mu \text{Em}^{-2} \text{sec}^{-1}$) variou entre um mínimo de 150 a um máximo de 550.

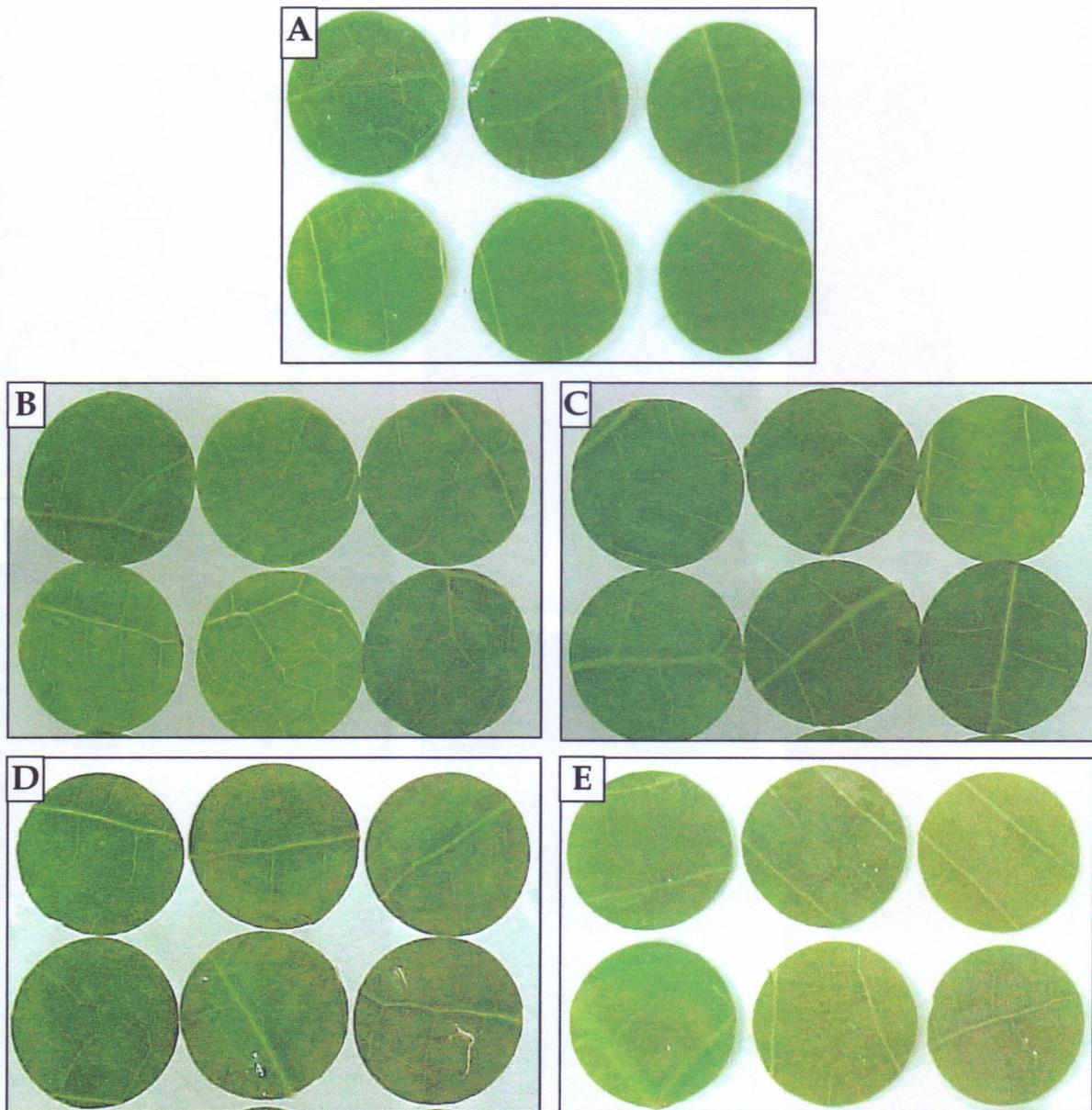


FIGURA 15 - Aspectos de discos de folhas de cajueiro em presença de 0 mmol.L⁻¹ de NaCl (A), 100 mmol.L⁻¹ de NaCl (B), 200 mmol.L⁻¹ de NaCl (C), 300 mmol.L⁻¹ de NaCl (D) e 400 mmol.L⁻¹ de NaCl (E) em tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹ pH 6,0 durante 24 horas.

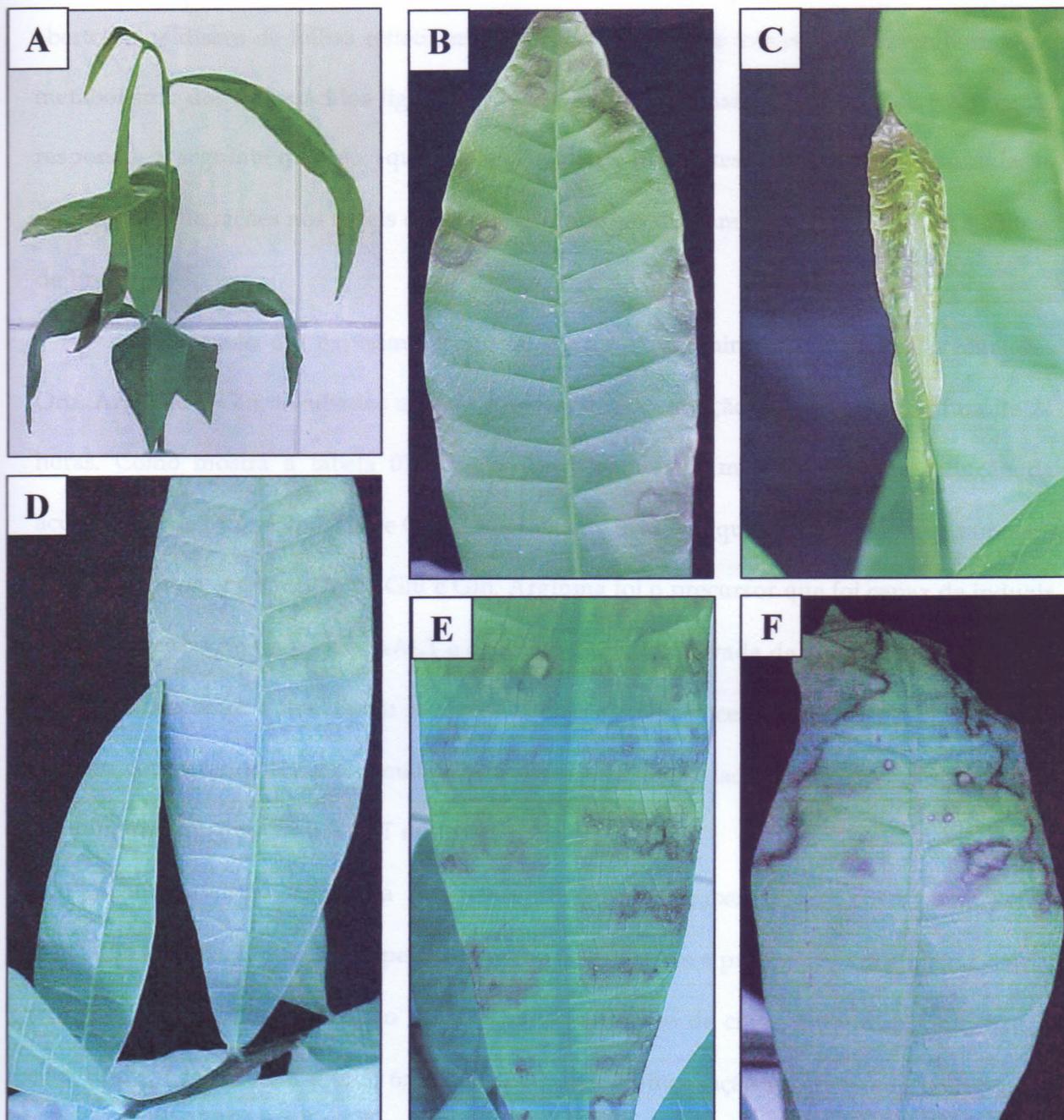


FIGURA 16 - Sintomas visuais das injúrias causadas pelo estresse salino: murchamento (A), "queima" dos bordos das folhas (B), morte das folhas apicais (C), degradação da clorofila (D) e manchas necróticas (E) e (F).

Nos discos, houve redução acentuada nas concentrações de Glu, Gln, Orn e Arg enquanto que nas folhas houve aumento nas concentrações de Gln, Orn e Arg e diminuição nas concentrações de Glu a partir de 100 mmol.L⁻¹ de NaCl (Figura 17). Portanto, permaneceu em aberto se os discos de folhas refletiram o comportamento das folhas intactas em termos do metabolismo dos aminoácidos ligados à síntese de prolina. Assim, procurou-se em seguida responder a seguinte questão: qual a efetividade de diferentes precursores na acumulação de prolina e alterações nos níveis dos aminoácidos mais diretamente envolvido com a síntese de Pro?

Foi realizado um experimento inicial do tipo "screening" a partir dos precursores Orn, Arg, Glu e Gln, incubados com os discos, na concentração de 10 mmol.L⁻¹ durante 24 horas. Como mostra a tabela 01, Orn e Arg foram bem mais eficazes na indução da acumulação de prolina que Glu e Gln. É interessante observar que Orn e Arg foram, também, bem efetivos na acumulação de Glu e Gln. Arginina foi o precursor que foi capaz de induzir maior concentração no *pool* de AALT e concentração mais elevada de Gln. Inesperadamente, Glu foi o precursor que induziu menores alterações nas concentrações de Pro e de AALT quando comparado com os demais precursores. Por outro lado, Gln induziu um grande acúmulo de Arg, amônia e AALT nos tecidos.

Outra questão levantada durante a pesquisa foi saber se durante o período de incubação dos discos não havia perda de aminoácidos livres e proteínas para o meio externo (tampão Hepes contendo ou não NaCl). Um experimento de cinética (50 discos incubados com 10 mL), com coleta a 0; 3; 6; 9; 12 e 24 horas de incubação mostrou que houve uma liberação de, aproximadamente 3% dos AALT contidos nos discos tratados ou não com 300 mmol.L⁻¹ de NaCl. Essa liberação foi rápida (após 3 horas) atingindo valores, aproximadamente, constantes no tratamento com NaCl e um discreto decréscimo, ao longo

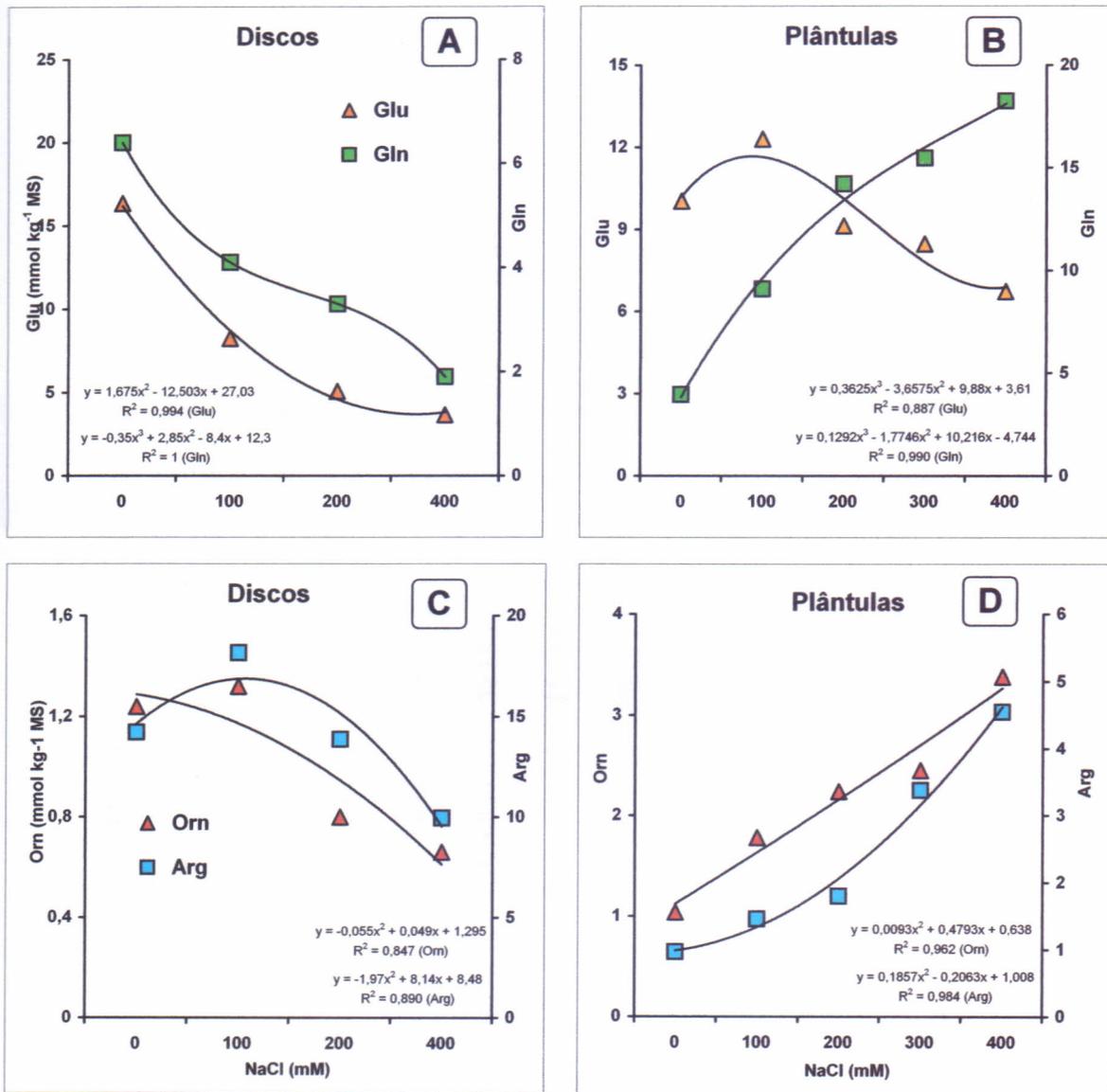


FIGURA 17 - Variações nas concentrações de glutamato (▲), glutamina (■), ornitina (▲) e arginina (■) em discos de folhas de cajueiro submetidos a doses crescentes de NaCl durante 24 horas (A) e (C), e 48 horas para plântulas (B) e (D).

TABELA 01 - Efeito de diferentes precursores (10 mmol.L^{-1}) nas concentrações de prolina, ornitina, arginina, glutamato, glutamina, AALT e NH_3 ($\text{mmol.kg}^{-1} \text{ MS}$) em discos de folhas de cajueiro incubados durante 24 horas.

Precursor	Fração Nitrogenada						
	Prolina	Ornitina	Arginina	Glutamato	Glutamina	AALT*	NH_3^*
Controle	$5,38 \pm 0,26$	$0,88 \pm 0,04$	$3,58 \pm 0,17$	$10,03 \pm 0,50$	$6,40 \pm 0,3$	$62,77 \pm 2,37$	$3,76 \pm 0,66$
Ornitina	$15,09 \pm 0,75$	$10,15 \pm 0,50$	$5,07 \pm 0,25$	$22,40 \pm 1,12$	$12,54 \pm 0,62$	$123,37 \pm 0,59$	$17,59 \pm 1,90$
Arginina	$17,03 \pm 0,85$	$2,08 \pm 0,10$	$32,88 \pm 1,64$	$20,31 \pm 1,01$	$32,88 \pm 1,64$	$165,02 \pm 0,79$	$42,77 \pm 5,90$
Glutamato	$4,77 \pm 0,23$	$0,73 \pm 0,03$	$11,65 \pm 0,58$	$12,62 \pm 0,63$	$11,65 \pm 0,58$	$67,11 \pm 1,18$	$6,12 \pm 0,17$
Glutamina	$5,37 \pm 0,26$	$0,59 \pm 0,02$	$30,18 \pm 1,50$	$4,17 \pm 0,20$	$11,05 \pm 0,55$	$121,79 \pm 10,46$	$56,79 \pm 4,53$

O controle apresentava o meio básico contendo tampão Hepes 10 mmol.L^{-1} pH 6,0. * AALT e NH_3 foram extraídas com água quente. Os dados são médias de três repetições ($n = 3$) \pm DP (desvio padrão).

do tempo, no controle, sugerindo que o efluxo dos aminoácidos ocorreu por difusão. Quando os 20 aminoácidos livres foram analisados através de HPLC não foi possível detectar presença de nenhum deles. Resultados semelhantes foram obtidos para a detecção de proteínas através do método de Bradford (dados não apresentados).

Esses resultados anteriores ratificaram a hipótese de que os discos de folhas de cajueiro foram modelos adequados para o estudo do metabolismo de aminoácidos e acumulação de prolina na presença de concentrações elevadas de NaCl.

1.7 DISCUSSÃO

No presente estudo procurou-se comparar algumas das respostas fisiológicas ao estresse salino entre os modelos de discos de folhas e folhas de plantas intactas de cajueiro visando validar o primeiro modelo. Estudos com discos ou segmentos de folhas de diversas espécies como modelo para respostas fisiológicas ao estresse salino tem sido largamente utilizados (AZIZ e LARHER, 1995; AZIZ *et al.*, 1999; YANG e KAO, 1999; HERNANDEZ *et al.*, 2000; AZIZ *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2003; HUGUET *et al.*, 2003). Apesar do uso intenso de segmentos de folhas, deve ser ressaltada a diferença marcante na fisiologia e bioquímica quando comparado com uma planta inteira em termos da resposta ao estresse salino. Nos discos de folhas, os efeitos osmóticos e iônicos do NaCl são mais diretos nas células e tecidos alvos, enquanto que nas plantas pode predominar mais efeitos indiretos (MUNNS, 2002), especialmente em plantas excludoras de Na⁺ nas folhas como é o caso de plântulas cajueiro (VIÉGAS, 1999).

Em termos de acumulação de Na⁺ e de prolina os discos de folhas de cajueiro apresentaram resposta semelhante aos de folhas de plântulas intactas. Entretanto, como era esperado, os discos tiveram concentrações mais elevadas de Na⁺ porém as concentrações de prolina foram similares ou, até mesmo, mais baixas se for considerado que o nível basal de

prolina nos discos (controle) foi sempre maior devido, provavelmente, à presença de outros fatores de estresse a exemplo do contato com o meio líquido durante 24 horas. Isso foi corroborado pelos valores elevados de danos de membranas nos discos após o contato com o meio líquido - próximo de 40 % (Figura 12C). Apesar dessa limitação, os discos foram capazes de absorver e metabolizar os principais precursores envolvidos com a síntese de prolina (Tabela 01), inclusive a própria prolina e hidroxiprolina (dados não apresentados).

Os efeitos do NaCl sobre os níveis de Glu, Gln, Orn e Arg nos tecidos de folhas foram marcadamente diferentes entre discos e plântulas (Figura 17). Enquanto nos primeiros a tendência foi de decréscimo em função das concentrações externas de NaCl, nas plântulas o efeito geral foi oposto, exceção para Glu. A possibilidade de perda significativa de aminoácidos do interior dos discos para o meio externo devido aos danos na plasmalema foi descartada após testes negativos obtidos para presença de AALT após 24 horas de exposição de 50 discos/10 mL em NaCl 300 mmol.L⁻¹, através de reação com ninhidrina com extrato concentrato (dados não apresentados). Dessa maneira podemos assumir que, de fato, o aumento na concentração de prolina nos discos foi devido a incremento na síntese *de novo* a partir de seus precursores mais imediatos, Glu e Orn, e indiretamente a partir de Gln e Arg.

Os resultados com discos de folhas são consistentes com o esperado. Assumindo que os efeitos do NaCl sobre os discos de folhas são mais imediatos e mais diretos sobre as células, especialmente o citosol, deve-se esperar efeitos osmóticos e/ou iônicos intensos sobre a integridade das biomoléculas e do metabolismo em geral. Assim, algumas perguntas são pertinentes: (1) Está o decréscimo nas concentrações de Glu, Gln, Arg e Orn de fato associado diretamente com o aumento na concentração de prolina? (2) Por que a resposta nas folhas de plântulas foi tão diferente daquela mostrada por discos? (3) Os resultados mostrando que Arg e Orn foram mais eficazes do que Gln e Glu na indução da acumulação de prolina podem evidenciar uma via preferencial de síntese de prolina em cajueiro? Assim, apesar do contraste entre as respostas de discos e folhas de plântulas, é possível inferir que o

modelo de discos de folhas de cajueiro parece ser adequado para estudar mudanças metabólicas relacionadas com a síntese e acumulação de prolina.

O presente estudo mostrou que os discos de folhas de cajueiro constituem-se um modelo adequado para estudar a acumulação de prolina em resposta ao estresse salino, particularmente os efeitos mais diretos do estresse. Também, é possível estabelecer a hipótese de que a via Arg - Orn é mais importante do que a via Gln - Glu no suprimento de precursores para a síntese de prolina.

CAPÍTULO 2

CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO DE PROLINA E DE SEUS PRECURSORES EM DISCOS E FOLHAS, PARTE AÉREA DESTACADA E PLÂNTULAS INTACTAS DE CAJUEIRO

2.1 INTRODUÇÃO

Sob condições de estresse o metabolismo dos aminoácidos é largamente alterado, a síntese de proteína é prejudicada e a proteólise é aumentada. Como consequência dessas condições metabólicas, a síntese de prolina pode ser promovida pelo aumento da concentração de metabólitos relacionados como: as poliaminas, a amônia, a arginina, a ornitina, a glutamina e o glutamato. O aumento na concentração de metabólitos envolvidos com a produção de precursores de prolina pode ser uma das causas da acumulação de prolina em tecidos vegetais expostos ou não a estresses ambientais (SILVEIRA *et al.*, 2003). Várias funções são propostas para a acumulação de prolina em tecidos submetidos ao estresse salino: ajustamento osmótico; reserva de C e N para o crescimento após sofrer estresse; desintoxicação do excesso de amônia; estabilização de proteínas e/ou membranas e eliminação de radicais livres (SOLOMON *et al.*, 1994). Além disso, a biossíntese da prolina pode estar associada com a regulação do pH citosólico ou a produção de NADP⁺ para estimulação da via das pentoses fosfato (LUTTS *et al.*, 1999).

Apesar desses vários efeitos, o papel da acumulação de prolina na tolerância das plantas ao estresse salino é controverso. Por exemplo, em espécies de tabaco (SHANNON *et al.*, 1987) e cultivares de arroz (LUTTS *et al.*, 1996; LUTTS *et al.*, 1999) a magnitude do aumento de prolina foi inversamente relacionado a tolerância ao sal. Em contraste, várias outras espécies cultivadas, células isoladas e plantas transgênicas que expressavam elevados níveis de prolina exibiram alta tolerância (WINICOV, 1998; YEO, 1998; HARE *et al.*, 1999).

2.2 OBJETIVOS

- Verificar o acúmulo diferencial da prolina e outros aminoácidos em discos de folhas de plântulas de cajueiro expostas a estresse salino e a diferentes concentrações exógenas de glutamato ou ornitina;
- Verificar o acúmulo diferencial da prolina e outros aminoácidos em discos de folhas de plântulas de cajueiro expostas a estresse salino na presença de glutamato ou ornitina exógenas em função de diferentes tempos de exposição;
- Observar o acúmulo de prolina e outros aminoácidos em discos de folhas de plântulas de cajueiro expostas a diferentes concentrações de NaCl na presença de glutamato ou ornitina exógenos;
- Investigar o acúmulo diferencial da prolina e outros aminoácidos em folhas de plântulas de cajueiro, com o sistema radicular destacado, na presença de glutamato ou ornitina exógenos;
- Investigar o acúmulo diferencial da prolina e outros aminoácidos em folhas de plântulas de cajueiro expostas a estresse salino e pulverizadas com uma solução contendo glutamato ou ornitina.

2.3 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

EXPERIMENTO 06

Para os estudos com os precursores glutamato e ornitina, discos de folhas (diâmetro de 10 mm) obtidos de plântulas com 35 dias de idade foram incubados, em banho-maria, a 30 °C, por 24 horas, com agitação, numa proporção de 50 discos de folhas para 10 mL de tampão Hepes, 10 mmol.L⁻¹, pH 6,0 contendo 0 ou 300 mmol.L⁻¹ de NaCl. A composição do tampão sofreu modificações nas concentrações de ornitina ou glutamato utilizados (0, 10, 20, 40, 80 e 160 mmol.L⁻¹). Ao final do período de 24 horas de incubação, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 18).

EXPERIMENTO 07

Utilizando-se condições semelhantes, discos de folhas de plântulas de cajueiro foram incubados com tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹, pH 6,0 contendo 10 mmol.L⁻¹ de ornitina ou de glutamato com 300 mmol.L⁻¹ de NaCl e coletados em diferentes tempos (0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 e 12 horas). Ao final dos tratamentos as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 18).

EXPERIMENTO 08

Em outro experimento discos de folhas de plântulas de cajueiro (diâmetro de 10 mm) foram incubados em tampão Hepes, 10 mmol.L⁻¹, pH 6,0 contendo 10 mmol.L⁻¹ de glutamato ou de ornitina na concentração de 10 mmol.L⁻¹ em condições idênticas as anteriores. A composição do tampão sofreu modificações nas concentrações de NaCl utilizadas (0, 100, 200 e 400 mmol.L⁻¹). Ao final do período de 24 horas de incubação, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 18).

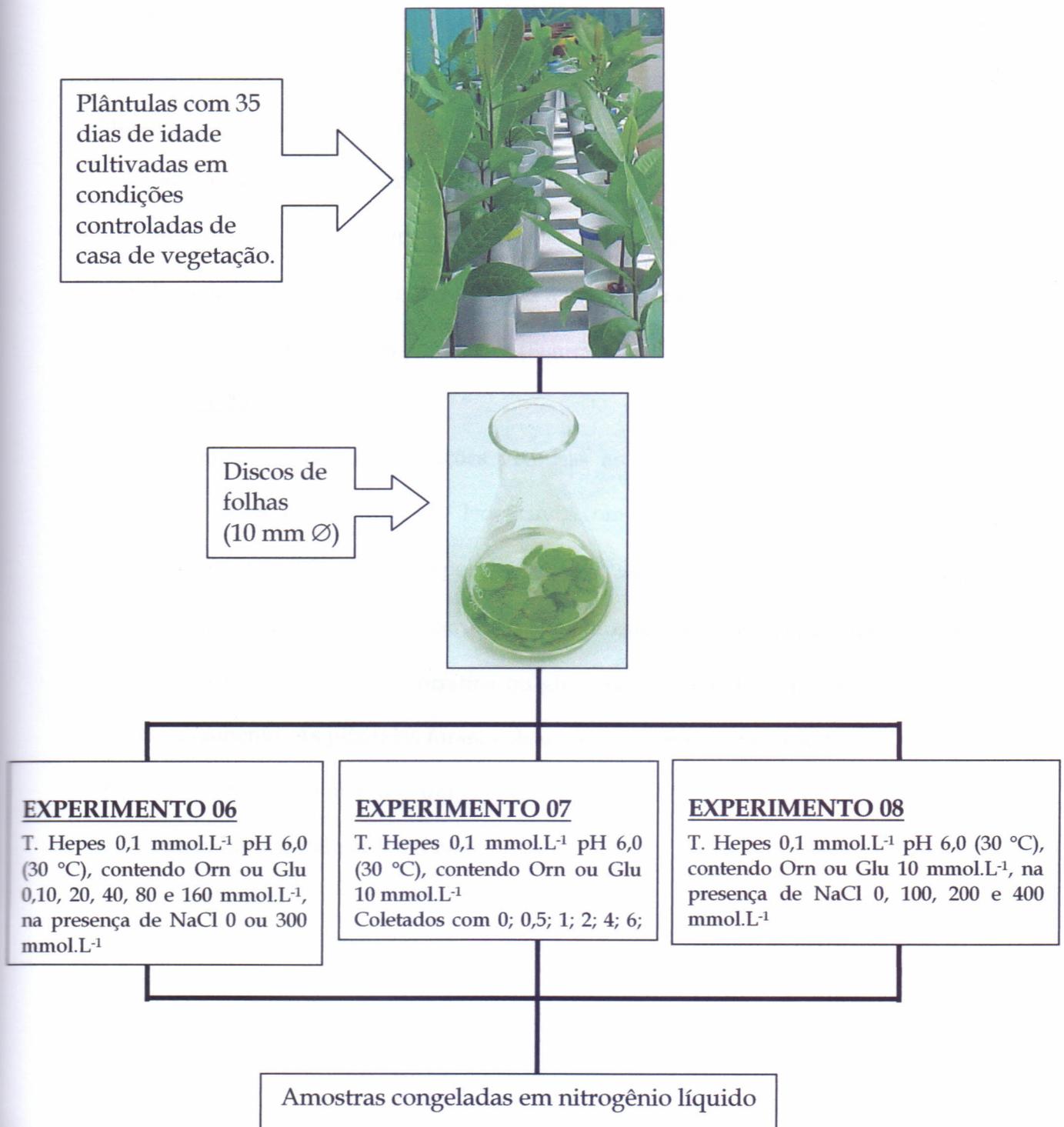


Figura 18 - Protocolo experimental (experimentos 06, 07 e 08).

EXPERIMENTO 09

Plântulas com aproximadamente 35 dias da germinação, em vermiculita, foram mantidas, por 24 horas, em condições de câmara de germinação, com temperatura e umidade de 30 °C ($\pm 0,5$) e 80% ($\pm 1,0$), respectivamente, para aclimação. Após esse período de aclimação, as plântulas tiveram seu sistema radicular destacado e seus caules foram imediatamente mergulhados em tampão Hepes 10 mmol.L⁻¹ pH 6,0 contendo 10 mmol.L⁻¹ de glutamato ou ornitina. As plântulas foram coletadas em diferentes tempos (0; 0,5; 1; 2; 6 e 12 horas de contato). Ao final dos tratamentos as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 19).

EXPERIMENTO 10

Plântulas obtidas em condições idênticas ao experimento anterior e aclimatadas durante 24 horas em solução de Hoagland, com 1:10 da concentração previamente estabelecida no item 3.1.1. foram expostas a estresse salino (300 mmol.L⁻¹ de NaCl) durante 48 horas. As plântulas tiveram sua parte aérea pulverizada exaustivamente com uma solução de Triton X-100 0,01% contendo ornitina ou glutamato 10 mmol.L⁻¹ durante as últimas 24 horas de tratamento. As plântulas foram coletadas em diferentes tempos (0; 1,5; 3; 6; 12 e 24 horas de exposição). Ao final dos tratamentos as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 20).

Plântulas com 35 dias de idade cultivadas em condições controladas de casa de vegetação. Aclimatadas por 24 horas 30 °C ($\pm 0,5$), 80% de umidade.



Plântulas com o sistema radicular destacado e imediatamente colocadas em uma solução contendo glu ou orn 10 mmol.L⁻¹



EXPERIMENTO 09

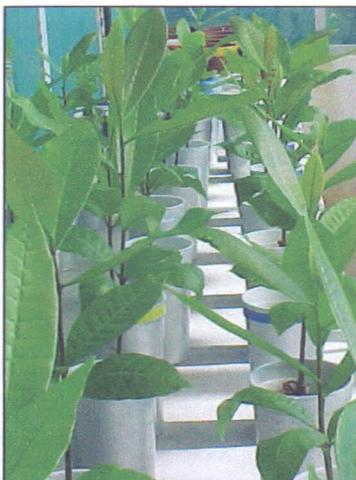
Plântulas coletadas com 0; 0,5; 1; 2; 6 e 12 horas de exposição.



Amostras congeladas em nitrogênio líquido

Figura 19 - Protocolo experimental (Experimento 9).

Plântulas com 35 dias de idade cultivadas em condições controladas de casa de vegetação.

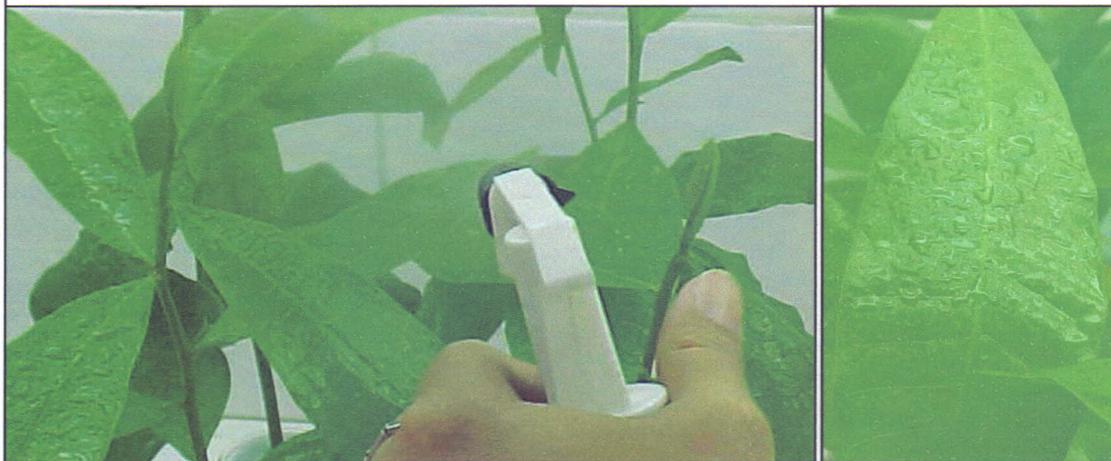


Plântulas transferidas para hidroponia em solução de Hoagland 1:10 e aclimatadas por 24 horas 30 °C ($\pm 0,5$), 80% de umidade. Posteriormente expostas a 300 mmol.L⁻¹ de NaCl durante 48 horas



EXPERIMENTO 10

Pulverização exhaustiva com uma solução de Triton X-100 contendo 10 mmol.L⁻¹ de glu ou orn durante 24 horas.



Plântulas coletadas com 0; 1,5; 3; 6; 12 e 24 horas de exposição e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para

Figura 20 - Protocolo experimental (Experimento 10).

2.4 MÉTODOS

As metodologias das análises utilizadas nesses experimentos estão descritas nos respectivos subitens dos Métodos (pág. 11):

5.2. Concentração de Proteínas Solúveis (pág. 11);

5.3. Concentração de Aminoácidos Livres Totais (N- α -Amino) (pág. 11);

5.5. Concentração de Prolina Livre (pág. 13);

5.6. Separação de Aminoácidos Livres por HPLC (pág. 13).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO DE PROLINA E SEUS PRECURSORES EM DISCOS DE FOLHAS

A pergunta que se colocou nesta etapa da pesquisa foi: Qual o efeito do NaCl sobre a cinética de absorção e acumulação dos precursores Glu e Orn e seus reflexos na acumulação de prolina? Assim, quando as concentrações de Glu e Orn no meio tamponado variaram de 0 a 160 mmol.L⁻¹, na presença ou ausência de NaCl 300 mmol.L⁻¹, se observou um modelo de resposta similar para os dois precursores e também entre os dois tratamentos (0 e 300 mmol.L⁻¹ de NaCl) - Figura 21A e B. Em 10 e 20 mmol.L⁻¹ a acumulação de Glu foi discreta enquanto que nas mesmas concentrações externas o nível de Orn nos tecidos foi aumentado, independente da presença do NaCl. Houve uma absorção crescente de Glu e Orn, em função das respectivas concentrações externas. O NaCl favoreceu a acumulação desses precursores quando na presença de concentrações externas elevadas dos dois aminoácidos.

Quantitativamente, os discos acumularam mais Glu (máximo de 142 mmol.kg⁻¹ MS) contra 91 mmol.kg⁻¹ MS de Orn. Entretanto, quando estes resultados são comparados com os níveis endógenos de Glu e Orn nas folhas de cajueiro (Glu = 10,03 e Orn = 0,88 mmol.kg⁻¹ MS - Tabela 1), se observou um maior incremento relativo na acumulação de Orn especialmente na presença de concentrações externas mais baixas (10 e 20 mmol. L⁻¹) as quais são mais compatíveis para estudos fisiológicos de cinética. A acumulação de Pro, induzida pelas concentrações externas dos dois precursores, foi diretamente relacionada com os resultados anteriores de absorção/acumulação (Figura 21C e D). De fato, em 10 e 20 mmol. L⁻¹ de Glu não foi observado acumulação de prolina, tanto na ausência como na presença de 300 mmol.L⁻¹ de NaCl.

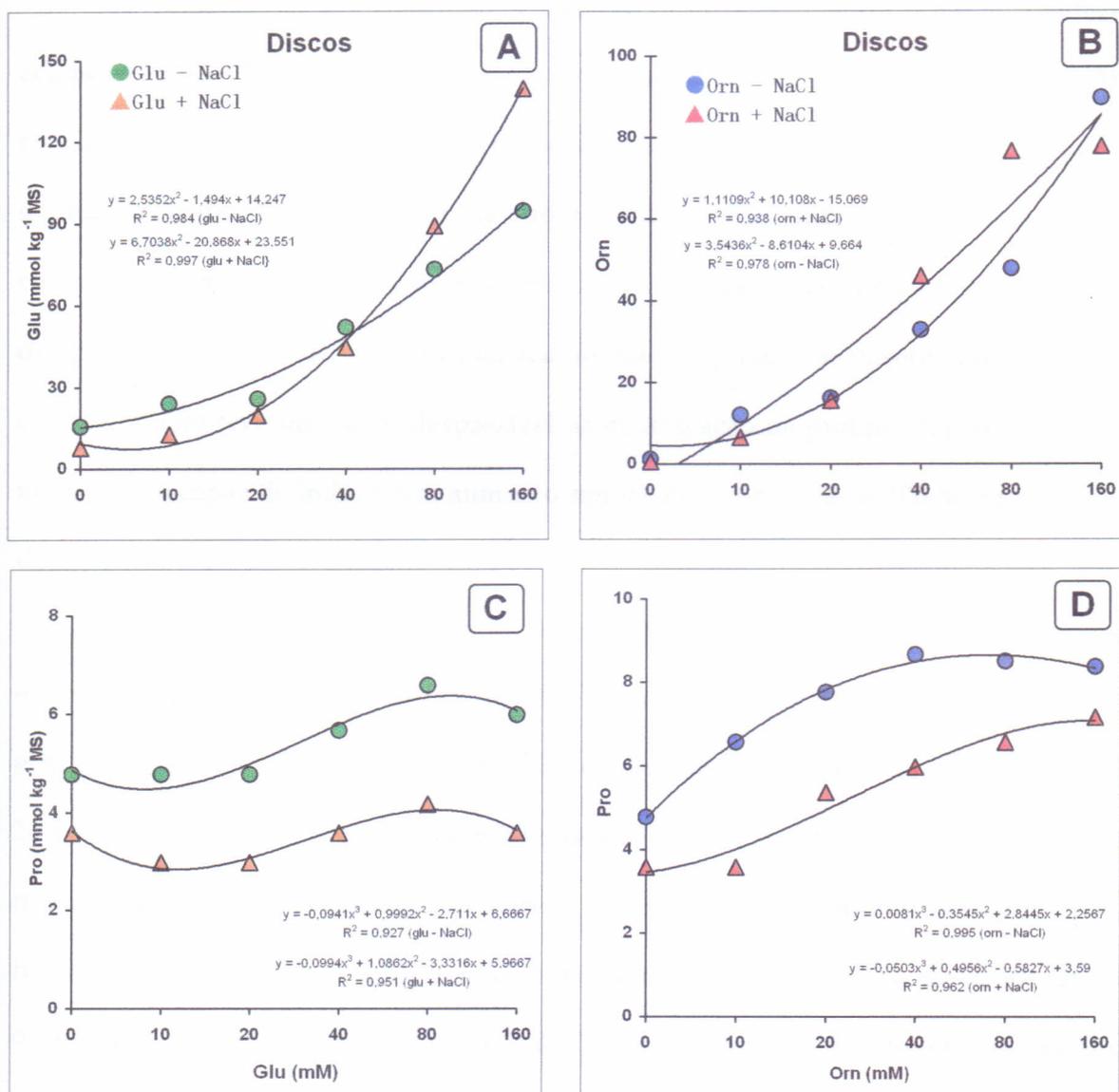


FIGURA 21 - Variações nas concentrações de glutamato, ornitina e prolina em discos de folhas de cajueiro expostos a doses crescentes de glutamato (A) e (C) (●, ▲) ou doses crescentes de ornitina (B) e (D) (●, ▲) na ausência ou na presença de 300 mmol.L⁻¹ de NaCl durante 24 horas.

Diferentemente, entre 0 e 20 mmol.L⁻¹ de Orn a concentração de Pro aumentou de 4,8 para 7,7 mmol.kg⁻¹ MS (Figura 21C e D).

Ao contrário da absorção/acumulação dos precursores (Figura 21A e B), a indução na acumulação de Pro foi negativamente influenciada pela presença do NaCl. Ambos precursores foram mais efetivos na ausência de NaCl (133% para o Glu e 154% para Orn), quando a acumulação de média de prolina sob 10 e 20 mmol.L⁻¹ dos precursores foi comparada com aquela obtida na ausência de NaCl. Quando se comparou o efeito indutor dos precursores entre si, em termos da acumulação de prolina, se observou que na presença do NaCl o Glu teve um efeito desprezível na acumulação de prolina enquanto que Orn 10 mmol.L⁻¹ foi capaz de induzir um aumento significativo, de cerca de 100 %, na concentração de Pro.

Após obtenção desses resultados foi levantada a seguinte questão: Quais as relações entre a acumulação de Pro, induzida por seus dois precursores diretos, com os níveis de Gln e Arg (precursores de glutamato e ornitina, respectivamente)? O estudo de cinética, durante 24 horas, de exposição dos discos em 10 mmol.L⁻¹ de Glu ou Orn na presença de NaCl 300 mmol.L⁻¹ mostrou, inicialmente, que após 12 horas houve uma diminuição significativa nos níveis de Glu, Gln, Orn, Arg e Pro (dados não apresentados). Na presença de glutamato, se observou que as cinéticas de acumulação de Glu e Gln foram essencialmente similares entre si (Figura 22A). Destaque-se uma fase "lag" na absorção de Glu durante as 2 horas iniciais de contato e uma tendência nítida de redução na concentração de Gln entre 0 e 1h. Após 2h, observou-se uma resposta quase linear na acumulação de Gln até 12h enquanto que os níveis de Glu tenderam a se estabilizar após 8h (entre 8 e 12h).

A presença e acumulação do Glu também causaram uma progressiva produção de Arg nos discos foliares especialmente após 2h de contato em paralelo com o aumento na concentração de Orn no tecido (Figura 22B).

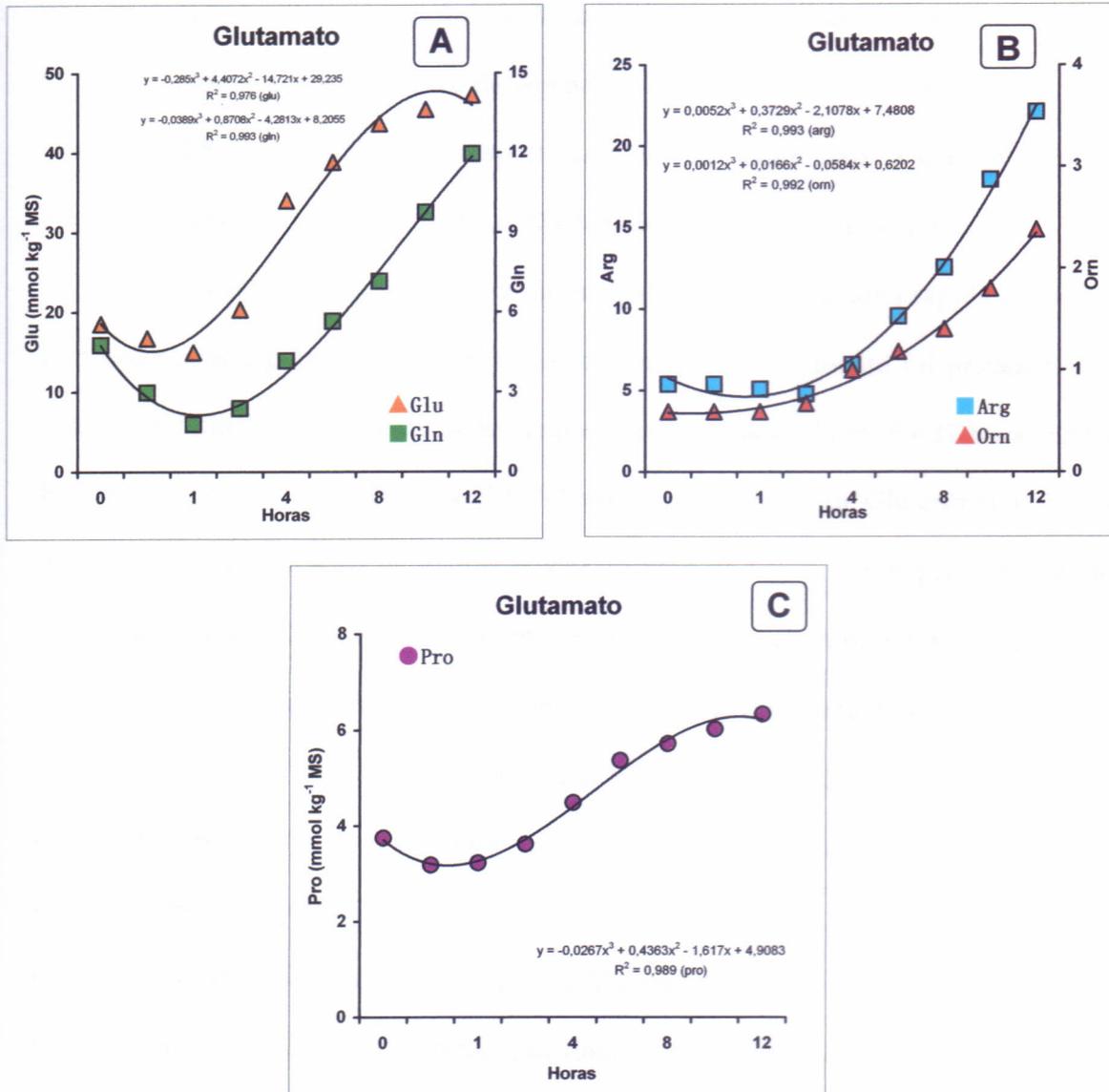


FIGURA 22 - Variações nas concentrações de glutamato (▲) e glutamina (■) (A), arginina (■) e ornitina (▲) (B) e prolina (●) (C) em discos de folhas de cajueiro na presença de 10 mmol. L⁻¹ de glutamato e NaCl 300 mmol. L⁻¹.

Destaque-se a concentração elevada de Arg livre atingida após 12h de exposição dos tecidos: 23,5 mmol.kg⁻¹ MS, cerca de 4,5 vezes o valor inicial. Por outro lado, a acumulação de prolina induzida pelo Glu foi apenas discreta (Figura 22C). De fato, ocorreu um aumento progressivo, após 2h de exposição, até 8h, com tendência de estabilização entre 8 e 12 horas. O incremento na concentração foi de, apenas, 1,7 vezes enquanto que os de Gln, Orn e Arg foram de 2,5; 4,1 e 4,2 vezes, respectivamente. Enquanto isso, a concentração de Glu aumentou apenas 2,5 vezes durante as 12 horas de exposição (Figura 22A).

A presença de Orn 10 mmol.L⁻¹ no meio externo induziu uma rápida acumulação de Orn nos discos a partir de 30 minutos de exposição. O incremento foi praticamente linear entre 0 e 6 horas, com aumento de 5,0 vezes na concentração. Entre 6 e 12 horas houve uma tendência de estabilização (Figura 23A). Observou-se aumento de Glu entre 0 e 8 horas com tendência de estabilização, enquanto, a concentração de Gln caiu nos primeiros 30 minutos para depois apresentar um acúmulo progressivo até 12 horas (Figura 23B). Paralelamente, se observou um aumento lento na concentração de Arg com uma fase "lag" entre 0 e 2h, enquanto que entre 2 e 12 horas houve um incremento de 1,5 vezes no nível de Arg do tecido. Interessantemente, e diferente do que foi observada para Glu, a presença de Orn induziu uma acumulação rápida, progressiva e proeminente (tendência quase linear) na concentração de prolina dentro dos discos (Figura 23C). Esse aumento foi de 5,4 vezes o valor inicial e atingiu uma concentração final de 19,5 mmol de Pro kg⁻¹ MS - um nível bastante elevado para folhas de plântulas de cajueiro (SILVEIRA *et al.*, 2003).

Quando discos de folhas de cajueiro foram incubados na presença de 0, 100, 200 e 400 mM de NaCl, juntamente com Glu ou Orn 10 mM, observaram-se respostas interessantes. Ao contrário das concentrações de prolina e aminoácidos livres totais, que foram incrementada com o aumento da dose de NaCl (Figura 24E), os níveis de Gln, Glu, Arg e Orn foram intensamente reduzidos (Figura 24A, B, C, D).

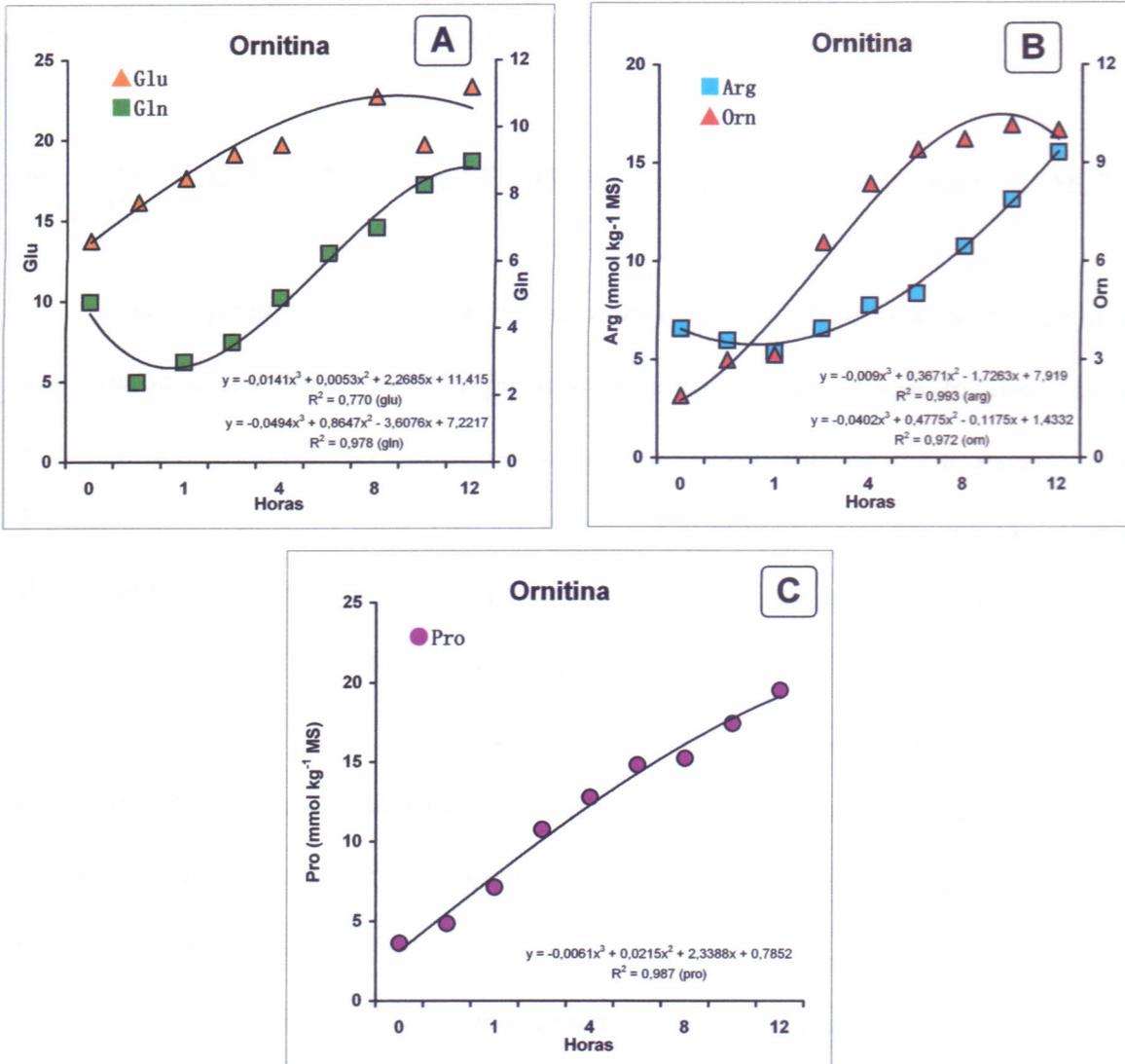


FIGURA 23 - Variações nas concentrações de arginina (■) e ornitina (▲) (A), glutamato (▲) e glutamina (■) (B) e prolina (●) (C) em discos de folhas de cajueiro na presença de 10 mmol.L⁻¹ de ornitina e NaCl 300 mmol.L⁻¹.

Destaque-se que, na presença de Glu, os níveis de Arg foram bastante elevados e somente discretamente reduzidos pela presença de NaCl (Figura 24C). Ainda na presença de Glu observou-se que as concentrações de Orn foram reduzidas em menor intensidade pelo NaCl quando comparadas com Orn como precursor. Ao mesmo tempo, as concentrações de proteínas solúveis não foram afetadas pelos níveis de NaCl (Figura 24E).

2.5.2 CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO DE PRECURSORES E PROLINA EM FOLHAS DE PARTE AÉREA SEM RAIZ

Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar se a cinética de absorção, acumulação e transformação dos precursores ocorridos nos discos foliares guardavam semelhança com aqueles verificados em folhas intactas sem a influência do sistema radicular. Para isso, os precursores Glu e Orn (10 mmol.L^{-1}) foram supridos, em solução tamponada, diretamente ao sistema condutor (xilema), através de imersão rápida dos caules decapitados (Figura 25). A acumulação do glutamato, em função do tempo de exposição a 10 mmol.L^{-1} de Glu, ao longo de 12 horas, foi apenas discreto. Essa acumulação foi bastante semelhante àquela observada para prolina nas folhas (Figura 25A). Enquanto isso, as acumulações de Gln e Orn foram proporcionalmente diminuídas entre 0 e 1h seguida de aumentos significativos entre 2 e 12h (Figura 25C).

Quando Orn foi utilizada como precursor nesse modelo de estudo, observaram-se respostas diferentes. Primeiro, o nível de prolina nas folhas foi bastante aumentado. Enquanto a concentração de Gln foi reduzida entre 0 e 6h a de Glu permaneceu constante neste período. Entretanto, entre 6 e 12 horas observou-se aumentos significativos nas concentrações desses dois aminoácidos (Figura 25B).

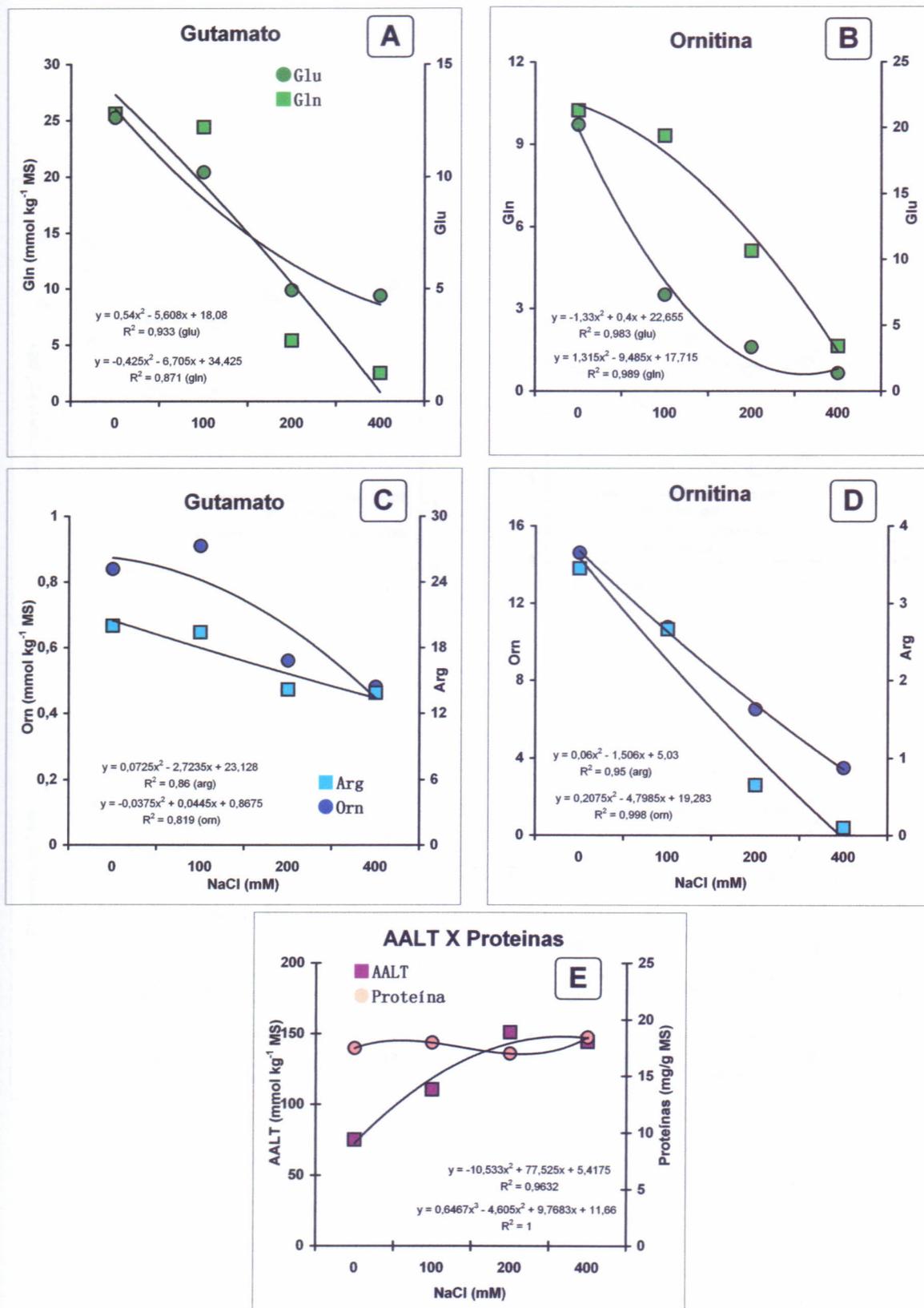


FIGURA 24 - Variações nas concentrações de glutamato (●), glutamina (■), arginina (■) ornitina (●), aminoácidos livres totais (■) e proteínas solúveis (●) em discos de folhas de cajueiro na presença de 10 mmol.L⁻¹ de glutamato (A) e (C) ou 10 mmol.L⁻¹ de ornitina (B) e (D), e aminoácidos livres totais e proteínas (E) em doses crescentes de NaCl durante 24 horas.

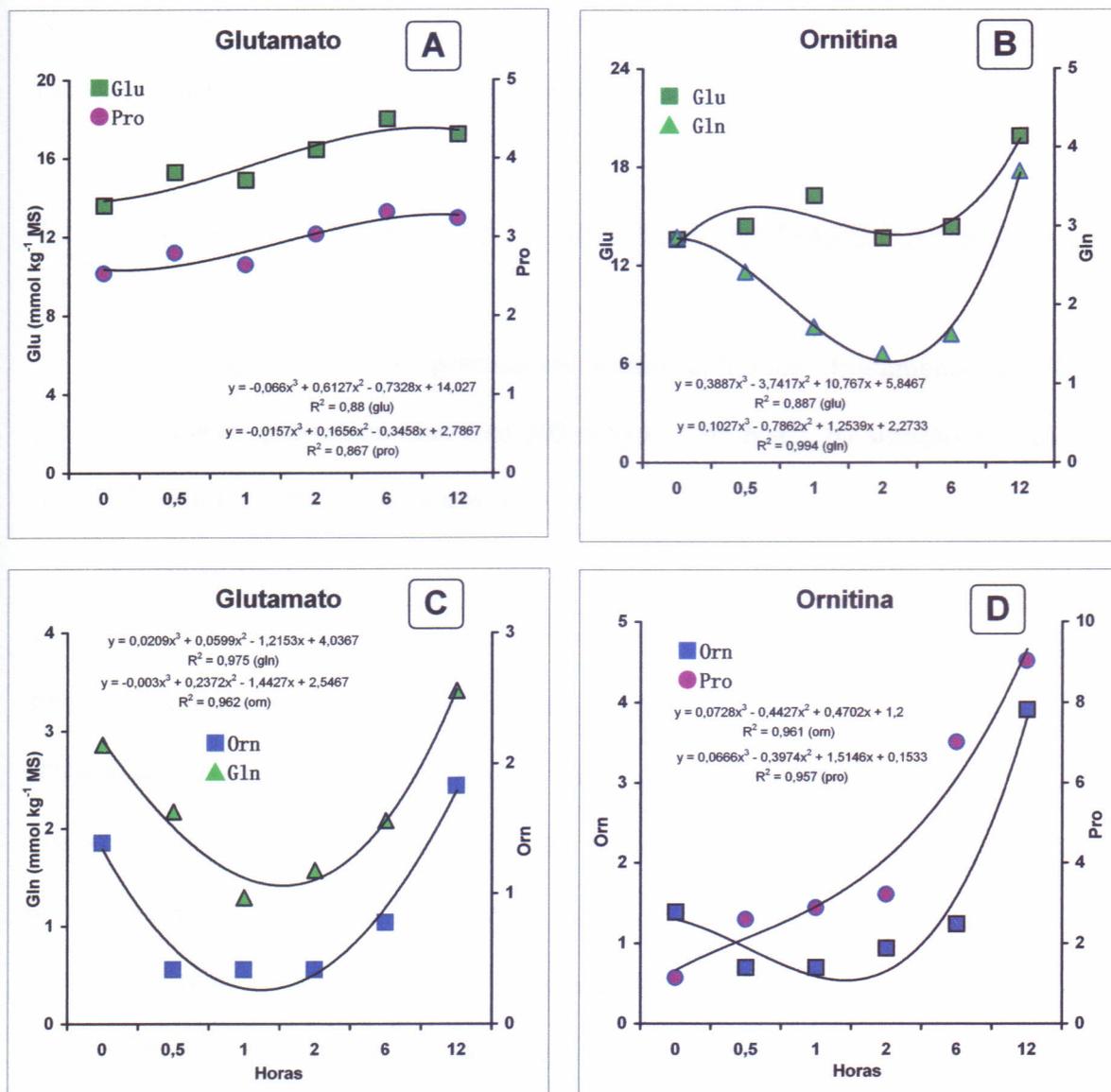


FIGURA 25 - Variações nas concentrações de glutamato (■), prolina (●), glutamina (▲) e ornitina (■) em folhas de plântulas de cajueiro com o sistema radicular destacado, em função do tempo de contato com 10 mmol.L⁻¹ de glutamato (A) e (C) ou com 10 mmol.L⁻¹ de ornitina (B) e (D) em tampão HEPES 10 mmol.L⁻¹ pH 6,0.

Portanto, neste especialmente entre 2 e 12h (cerca de 3 vezes) proporcionalmente ao acúmulo de Orn nos tecidos (Figura 25D). Os níveis de Gln e Glu apresentaram tendências diferentes. experimento, semelhante ao anterior desenvolvido com os discos foliares, a Orn se mostrou mais efetiva que o Glu em termos de sua própria absorção / acumulação e indução da acumulação de prolina nas folhas.

2.5.3 CINÉTICA DE ACUMULAÇÃO DE PRECURSORES E PROLINA EM FOLHAS DE PLÂNTULAS INTACTAS

Neste experimento os precursores foram aplicados diretamente nas folhas de plântulas intactas pré-estressadas com 300 mmol.L^{-1} de NaCl, na solução nutritiva, com o intuito de estudar a cinética de acumulação nas folhas de plantas inteiras (*in situ*) e comparar com os resultados anteriores utilizando modelos mais simplificados. Quando o Glu foi pulverizado nas folhas (10 mmol.L^{-1}) observou-se uma acumulação desse precursor somente entre 6 e 24 horas enquanto que a acumulação de prolina ocorreu após as 3h de exposição (Figura 26A). Após 24 horas, o incremento da acumulação de Pro foi de, aproximadamente, 4 vezes atingindo uma concentração de $12,2 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ MS}$. Em paralelo, observou-se um aumento significativo nas concentrações de Gln e Orn somente entre 6 e 24 horas. Esse aumento foi mais acentuado para Gln (Figura 26C).

Mais uma vez Orn agindo como precursor mostrou resultados diferentes comparado ao Glu. A acumulação de Orn foi mais rápida (a partir de 1,5h), sendo progressiva até 6h tendendo a estabilizar entre 6 e 24h (Figura 26B), semelhante ao observado em discos foliares (Figura 23A). Da mesma maneira, a acumulação de prolina foi mais rápida e mais intensa chegando a atingir $21 \text{ mmol.kg}^{-1} \text{ MS}$, representado um aumento de cerca de 7 vezes (Figura 26B). No entanto, observou-se um comportamento praticamente estável nas concentrações de Glu e um rápido aumento de Gln, entre 6 e 24 horas (Figura 26D). Quando os dois precursores foram comparados, após 24 horas de exposição, observou-se, nitidamente, que a

Orn exógena aplicada diretamente nas folhas das plantas estressadas foi mais efetiva do que o Glu como indutor da acumulação de prolina (Figura 27). Esses resultados corroboram aqueles obtidos com discos de folhas (Tabela 1 e Figura 23C) e também com parte aérea livre de raízes (Figura 25D).

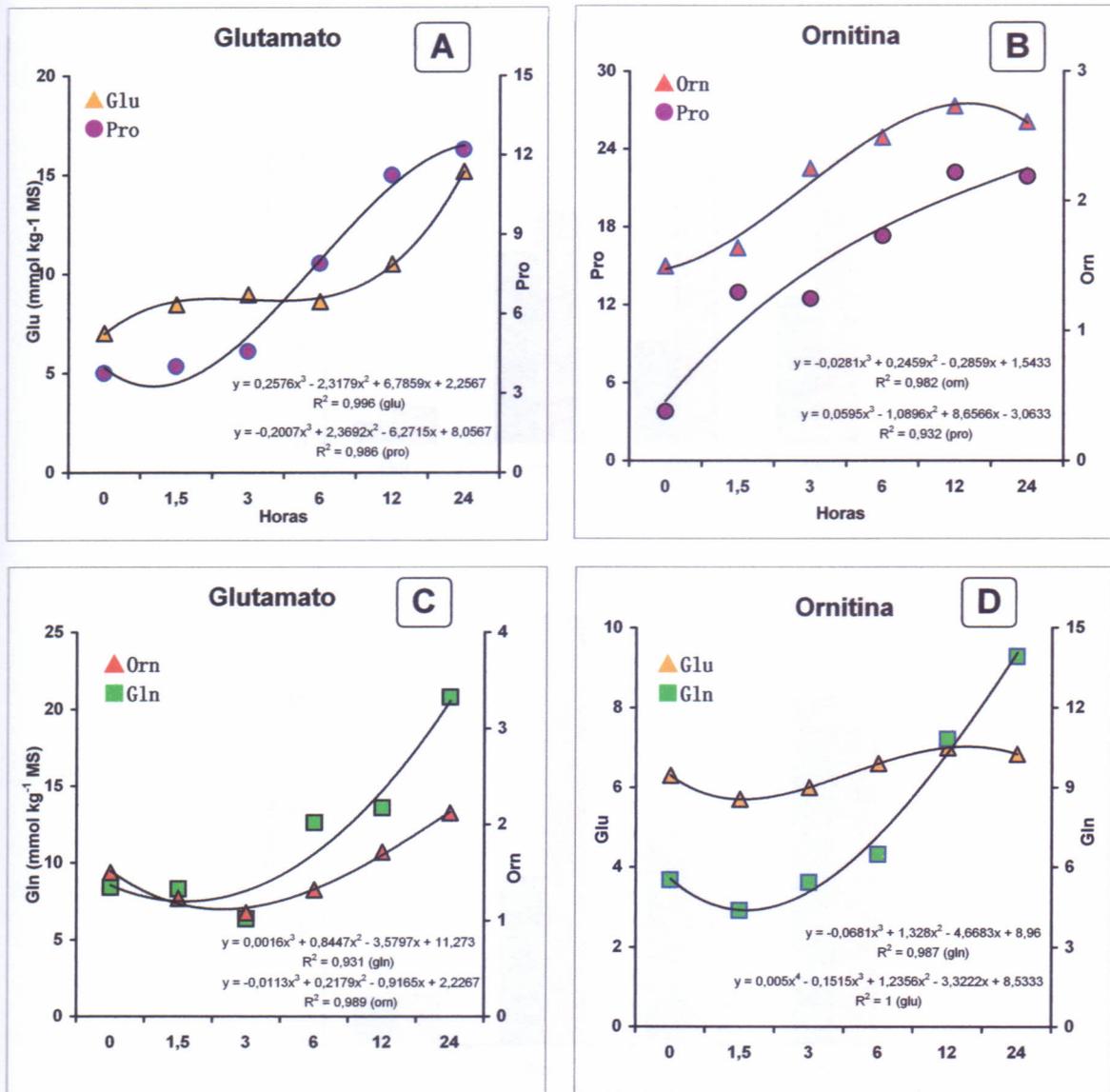


FIGURA 26 - Variações nas concentrações de glutamato (▲), prolina (●), ornitina (▲) e glutamina (■) em folhas de plântulas de cajueiro submetidos a 300 mmol.L⁻¹ de NaCl durante 48 horas e pulverizadas durante 24 horas com uma solução de Triton X-100 0,01% contendo 10 mmol.L⁻¹ de glutamato (A) e (C) ou 10 mmol.L⁻¹ de ornitina (B) e (D).

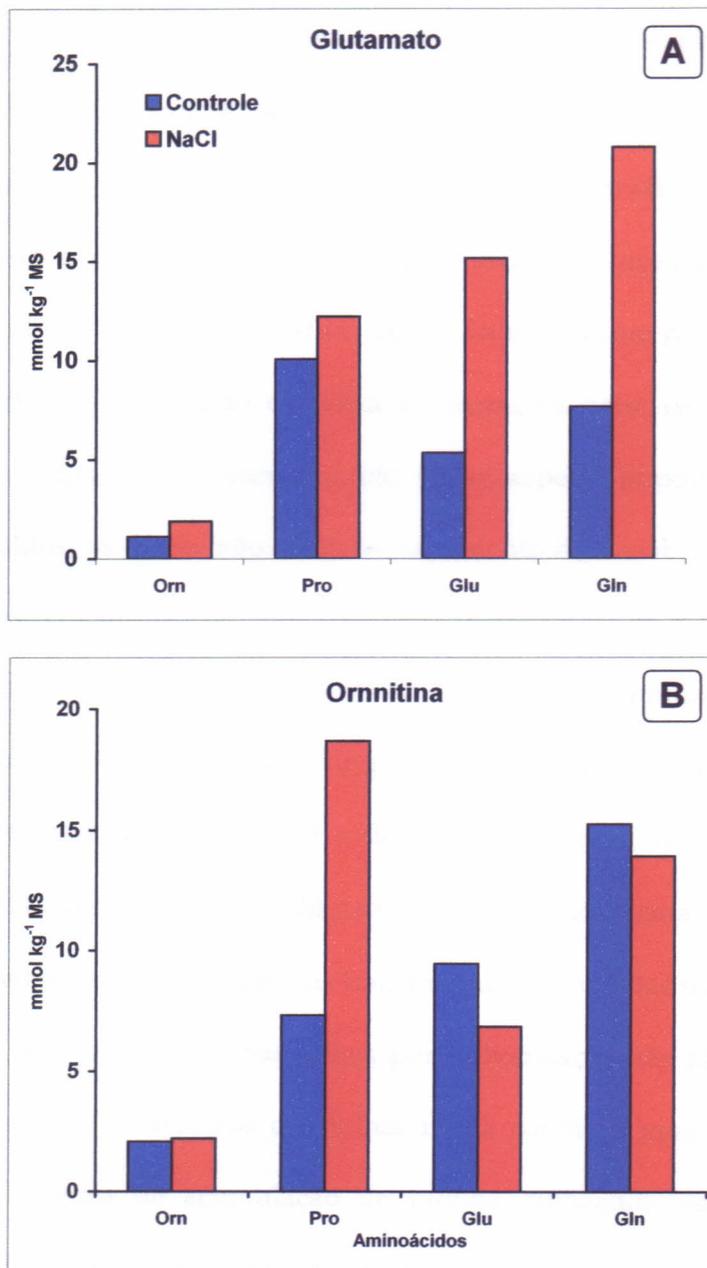


FIGURA 27 - Variações nas concentrações de ornitina, prolina, glutamato e glutamina em folhas de plântulas de cajueiro cultivados na ausência de NaCl (controle ■) ou na presença de 300 mmol.L⁻¹ de NaCl (■), após serem pulverizados durante 24 horas com uma solução de Triton X-100 0,01% contendo 10 mmol.L⁻¹ de glutamato (A) ou 10 mmol.L⁻¹ de ornitina (B).

2.6 DISCUSSÃO

Anterior à discussão dos resultados obtidos parece ser importante caracterizar, em termos bioquímicos e fisiológicos, os três tipos de modelos de estudo utilizados no presente trabalho. Os discos de folhas são adequados para entender os efeitos mais diretos do NaCl (componentes osmótico + iônico) sobre os tecidos foliares com um número mais reduzido de células interagindo entre si (GIBON *et al.*, 2000). Entretanto, no nível celular, esse sistema ainda é bastante complexo tendo em vista as interações entre os diversos componentes: apoplasto, membranas, citosol, vacúolos, etc. Outro aspecto importante é com relação ao fluxo de metabólitos; os discos não recebem suprimento de metabólitos de outras partes (a não ser os supridos de forma exógena), como ocorre nas folhas de plantas intactas. Também, o aspecto do transporte da prolina e de outros aminoácidos é minimizado.

Obviamente, o modelo de folhas de plantas livre de raízes é mais complexo do que o de discos porém mais simples do que o de plantas inteiras (HERNANDEZ *et al.*, 2000). Quando os precursores são supridos diretamente através do xilema dos caules elimina-se a influência do metabolismo das raízes nas transformações ocorridas nas folhas. Finalmente, a aplicação direta dos precursores nas folhas por pulverização nas plantas inteiras permite acompanhar os efeitos e respostas das folhas numa condição mais próxima da real. Um estudo sobre a cinética de acumulação de prolina, utilizando esses três modelos, em tomateiro, mostrou resultados diferentes quanto a tendências de resposta e também quanto às quantidades de prolina acumulada nos tecidos foliares (HERNANDEZ *et al.*, 2000).

Outra ressalva importante é que a utilização de cinética de acumulação, como a empregada no presente trabalho, é muito limitada para estudar o metabolismo de prolina (THOMPSON, 1980). Na realidade, a cinética de relação precursor - produto fornece apenas uma idéia geral do processo de acumulação do(s) precursor(es) e sua possível relação com a acumulação de outros metabólitos. Para um estudo detalhado das relações precursor -

produto seria necessário o uso de precursores marcados com ^{14}C ou análise, por ressonância magnética nuclear, de isótopos do N, ferramentas não disponíveis no *Labplant*. Os resultados desse estudo mostraram, inicialmente, que os discos foliares foram capazes de acumular intensamente os precursores de prolina Glu e Orn, tanto em resposta à dose como em função do tempo de exposição. Apesar do Glu ter sido acumulado intensamente, seu efeito sobre a acumulação de prolina foi discreto quando comparado com a Orn como precursor. Nessa condição experimental, ambos precursores induziram grande acumulação de Gln e Arg.

É interessante observar que o NaCl induziu grandes reduções nas concentrações de Glu, Orn, Arg e Gln nos discos foliares, tanto na presença como na ausência de Glu e Orn 10 mM, enquanto que as concentrações de Pro foram aumentadas. Tendo em vista que não houve perda significativa desses aminoácidos para o meio externo, os dados sugerem, fortemente, que os mesmos foram metabolizados, e provavelmente, foram utilizados, como precursores e/ou fonte de esqueletos de carbono/energia via ciclo de Krebs (THOMPSON, 1980). É possível que o aumento na concentração de prolina possa ter sido causado, pelo menos parcialmente, pelo aumento nas concentrações dos precursores mais imediatos (Glu e Orn) e também de Gln e Arg.

Os resultados com folhas de parte aérea livre de raiz e folhas de plantas inteiras foram consistentes com os obtidos com discos foliares. Nos três modelos observou-se uma fase "lag" entre 0 e 2 horas e uma fase acelerada após 6h de exposição. No primeiro sistema (parte aérea), a acumulação de Glu foi muito baixa sendo acompanhado de uma reduzida acumulação de prolina. A Orn se mostrou um precursor mais efetivo nesse modelo similarmente ao observado com discos. A mesma tendência foi observada em plantas inteiras. Nesse modelo, a acumulação de Glu também foi desprezível até 12h de exposição, apesar de ter havido uma significativa acumulação de prolina nesse intervalo. Entretanto, mais uma vez, Orn foi mais efetiva na indução da acumulação de prolina nas folhas das plântulas sob estresse salino.

A acumulação de um precursor no tecido de folhas de cajueiro é um balanço entre diversos processos: taxa de absorção, transporte, síntese *de novo*, utilização como precursor ou fonte de energia, utilização para a síntese de protéica e degradação de proteínas (SILVEIRA *et al.*, 2003). No caso da indução na acumulação de prolina, o efeito do precursor pode ser direto ou indireto. Dessa maneira, a ação mais efetiva da ornitina pode ter sido causada por um efeito indireto devido sua maior absorção pelas células através de canais não seletivos de cátions (DAVENPORT, 2002; MILLER e WILLIAMS, 2001). Outra maneira para um efeito indireto seria a Orn atuar como precursor de Glu ou mesmo de outros aminoácidos como a glutamina, a qual poderia ter exercido um efeito regulador na atividade de enzimas da biossíntese de prolina ou mesmo na indução da expressão de genes ligados a essas enzimas.

De qualquer maneira, a maior efetividade de Orn como precursor de prolina pode estar associada a um efeito direto através do aumento da atividade da ornitina- δ -aminotransferase e, em menor extensão, da ornitina- α -aminotransferase, enzima pouco ativa em plantas superiores (THOMPSON, 1980). De fato, trabalhos recentes têm reforçado a importância da OAT no suprimento de P5C para a síntese de prolina (ROOSENS *et al.*, 1998; YANG e KAO, 1999; LUTTS *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2002; ROOSENS *et al.*, 2002). Por outro lado, sob o aspecto quantitativo, o Glu apresenta concentrações bem maiores do que o de Orn em tecidos de folhas de cajueiro. Contudo, sua baixa taxa de acumulação pode refletir dificuldades de absorção, especialmente quando foi aplicado em folhas íntegras. Além disso, o glutamato apresenta intenso "turnover" nos tecidos vegetais, estando envolvido em diversas vias metabólicas.

Deve ser destacado, também, o efeito dos precursores Glu e Orn sobre a acumulação de Gln e Arg. Nos três sistemas de estudo utilizados as concentrações desses aminoácidos foram intensamente aumentadas. Por outro lado, quando Arg foi utilizada como precursor (Tabela 1) observou-se grande aumento nas concentrações de amônia, aminoácidos livres

totais, Gln, Glu, Orn e um expressivo incremento no nível de prolina. Esses dados podem sugerir que, durante o estresse salino, a arginase possa ser uma enzima importante na produção de ornitina e amônia livre a partir de uréase (THOMPSON, 1980). O aumento nas concentrações de amônia pode favorecer a síntese de isoforma de GS contribuindo para o aumento na atividade dessa enzima conforme demonstrado anteriormente em folhas de cajueiro (VIÉGAS e SILVEIRA, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2003).

A importância da glutamina sintetase como fonte de glutamina para a síntese de prolina tem sido demonstrada em vários trabalhos (LARHER *et al.*, 1998; LUTTS *et al.*, 1999; BRUGIÈRE *et al.*, 1999; SAHU *et al.*, 2001). Os níveis aumentados de Gln, Glu e Arg podem favorecer a síntese de Orn através dos ciclos da uréia e do ciclo da ornitina (THOMPSON, 1980). LA ROSA e colaboradores (1991), trabalhando com células de tabaco adaptadas para níveis elevados de NaCl concluíram que o controle para a superprodução de prolina deveria estar localizada em reações anteriores à própria via central de biossíntese de prolina. De fato, o aumento de atividade das enzimas de síntese em paralelo com a redução na atividade de prolina desidrogenase deve controlar o nível de prolina. Essas mudanças de atividades podem ser decorrentes de aumento/diminuição nas concentrações das enzimas/isoformas, regulação enzimática, disponibilidade e fluxo de substratos e co-fatores.

A análise dos resultados do presente trabalho permite concluir que a ornitina se apresentou como um precursor mais efetivo na indução da acumulação de prolina em folhas de cajueiro submetidas ao estresse salino quando comparada com o glutamato. Entretanto, não é possível afirmar se a via biossintética através da OAT foi mais expressiva do que a via a partir do glutamato na síntese de prolina.

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE DE ENZIMAS ENVOLVIDAS COM A ACUMULAÇÃO DE PROLINA E NÍVEIS DE PRECURSORES EM DISCOS FOLIARES E FOLHAS DE PLÂNTULAS INTEIRAS

3.1 INTRODUÇÃO

Por ser uma molécula neutra e altamente solúvel, a prolina pode se acumular em grande quantidade sem perturbar as interações água - proteínas, não alterando a estrutura dessas biomoléculas e de estruturas supramoleculares. Além disso, a prolina pode atuar como reserva de C e N, desintoxicação do excesso de amônia e manutenção do pH citoplasmático (VIÉGAS *et al.*, 1999). Entretanto, o papel da super produção desse aminoácido na tolerância ao estresse salino ainda é motivo de controvérsias e especulações. Em cultivares de arroz e de tabaco, os genótipos mais tolerantes apresentaram menor acumulação de prolina (LUTTS *et al.*, 1999). Em oposição, células de tabaco que expressam maiores concentrações desse aminoácido são mais tolerantes ao estresse osmótico. Resultados semelhantes foram observados com plantas transgênicas de tabaco e de *Arabidopsis* as quais expressaram o gene ligado a atividade da enzima Pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR), a qual catalisa a reação marca-passo da síntese de prolina (YEO, 1998; HARE *et al.*, 1999).

Além das controvérsias a respeito da efetividade da prolina no ajustamento osmótico e capacidade para conferir tolerância ao estresse salino, também não se conhece com precisão a origem metabólica de sua acumulação (SILVEIRA *et al.*, 2001). Existem várias evidências que a síntese *de novo* desse aminoácido é favorecida em condições de estresse osmótico a partir de uma maior disponibilidade de glutamato e aumento na atividade de P5CR (HARE *et al.*, 1999). Entretanto, outras possibilidades podem ocorrer tais como incremento em outras vias alternativas de biossíntese - através de ornitina amino-transferase (ROOSENS *et al.*, 1998), decréscimo na atividade de enzimas da oxidação de prolina - prolina desidrogenase (LUTTS *et al.*, 1999), diminuição de sua utilização na síntese protéica (VIÉGAS *et al.*, 1999) ou redução de seu transporte para outros tecidos ou órgãos (VIÉGAS, 1999). Além disso, em algumas espécies, como o cajueiro, a acumulação de prolina parece ser dependente do tipo

de tecido (SILVEIRA *et al.*, 2001). Nesse último caso, as evidências sugerem que a acumulação desse aminoácido foi mais um resultado de distúrbios generalizados no metabolismo de aminoácidos e proteínas.

Vários estudos têm mostrado que o estresse salino induz um aumento na atividade de muitas enzimas envolvidas com a produção de glutamato: Fd-GOGAT e NADH-GOGAT (RAMAJULU *et al.*, 1994; BERTELI *et al.*, 1995; LUTTS *et al.*, 1999) GS (RAMAJULU *et al.*, 1994; BERTELI *et al.*, 1995; LUTTS *et al.*, 1999; VIÉGAS e SILVEIRA, 1999) GDH (RAMAJULU *et al.*, 1994; LUTTS *et al.*, 1999; KUMAR *et al.*, 2000) e transaminases envolvidas com a síntese de aspartato (RAMAJULU *et al.*, 1994). Além disso, o estresse salino pode induzir o aumento na atividade da OAT (ROOSENS *et al.*, 1998; LUTTS *et al.*, 1999). Recentemente, LUTTS e colaboradores (1999) sugeriram que acumulação de prolina em folhas de arroz foi mais um sintoma de injúria provocada pelo sal e que essa acumulação em plantas sensíveis ao sal resulta de um aumento na atividade da OAT e um aumento no pool endógeno dos precursores de glutamato. A acumulação de prolina não foi correlacionada pela atividade de P5CR e PDH. Os estudos de Lutts e colaboradores (1999) também demonstraram uma significativa acumulação de amônia associada com o aumento na atividade da GDH.

3.2 OBJETIVO

- Determinar as atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo da prolina em resposta ao estresse salino em discos de folhas e em folhas de plantas íntegras de cajueiro: Glutamina Sintetase (GS), Ornitina δ -Aminotransferase (OAT), Glutamato Desidrogenase (GDH), Glutamato Sintase (GOGAT) e Prolina Desidrogenase (PDH).

3.3 DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

EXPERIMENTO 11

Para se observar o efeito direto do NaCl sobre a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo da prolina, extratos obtidos de plântulas saudias e não estressadas tiveram as atividades enzimáticas da GS, GOGAT, OAT e PDH medidas na presença de diferentes concentrações de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400 mmol.L⁻¹) (Figura 28).

EXPERIMENTO 12

Para os estudos utilizando tecidos destacados, discos de folhas (diâmetro de 10 mm) foram retirados de plântulas com 35 dias de idade. Os discos de folhas foram incubados, em banho-maria, a 30 °C, com agitação, numa proporção de 50 discos de folhas para 10 mL de tampão HEPES, 10 mmol.L⁻¹, pH 6,0. A concentração de NaCl no tampão foi fixada em 300 mmol.L⁻¹ para o primeiro tratamento e 35,5% de PEG para o segundo tratamento (concentrações isomóticas). Foram realizadas coletas em diferentes tempos de exposição: 0, 3, 6, 12 e 24 horas e ao final de cada período de incubação, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 29).

EXPERIMENTO 13

Para se comparar o efeito do NaCl e do PEG durante o tempo, plântulas de cajueiro com 35 dias de idade foram transferidas para vasos plásticos (altura 21 cm e diâmetro 10 cm), contendo 800 mL da solução de Hoagland, com 1:10 da concentração previamente estabelecida no item 3.1.1. pág. 05. As plântulas foram mantidas, por 24 horas, em condições de câmara de germinação, com temperatura e umidade de 30°C (± 0,5) e 80% (± 1,0), respectivamente, para aclimação. Após esse período de aclimação, as plântulas foram submetidas a estresse com soluções isomóticas de 200 mmol.L⁻¹ de NaCl e 29,5% de PEG em

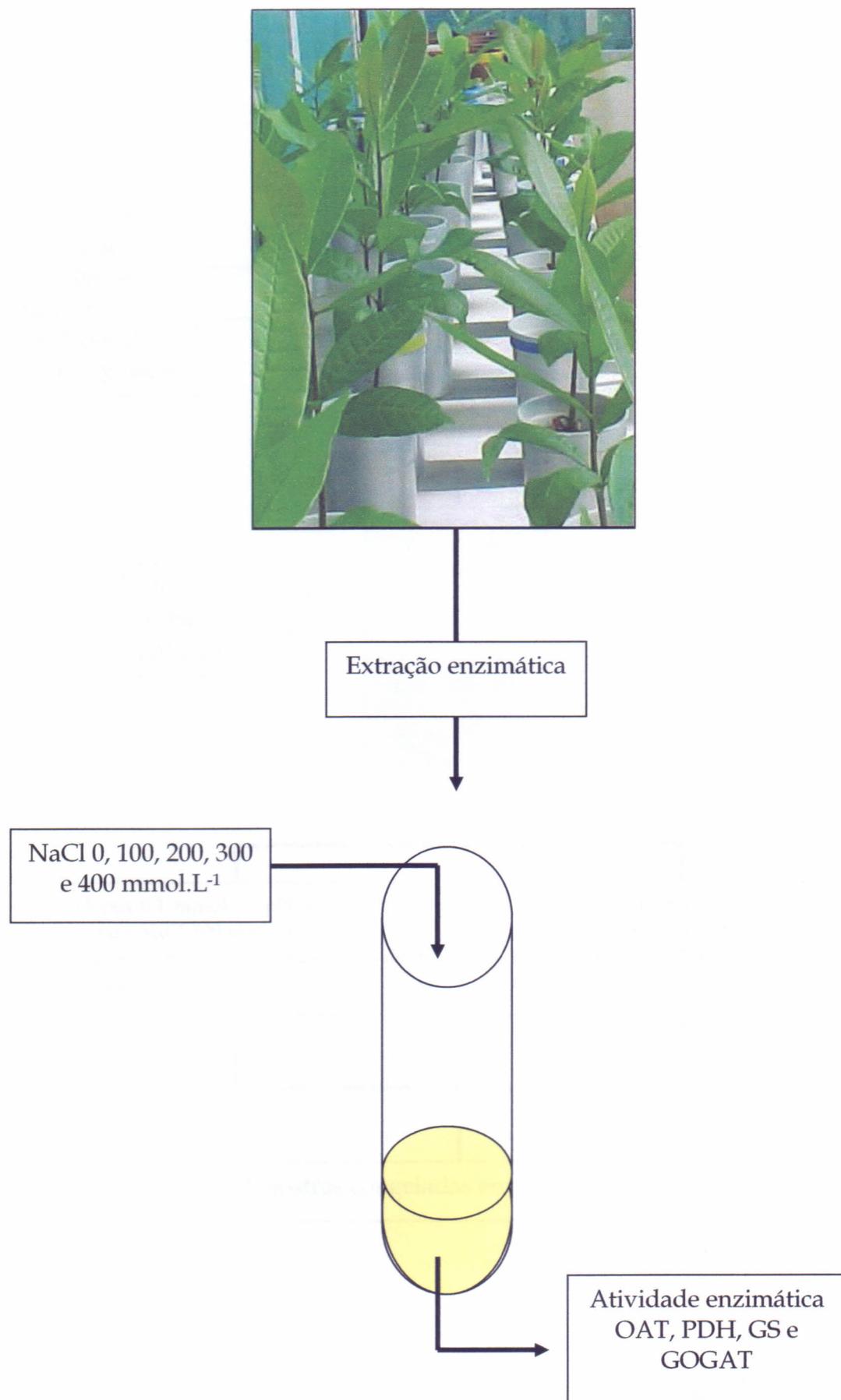


FIGURA 28 - Protocolo experimental (Experimento 11).

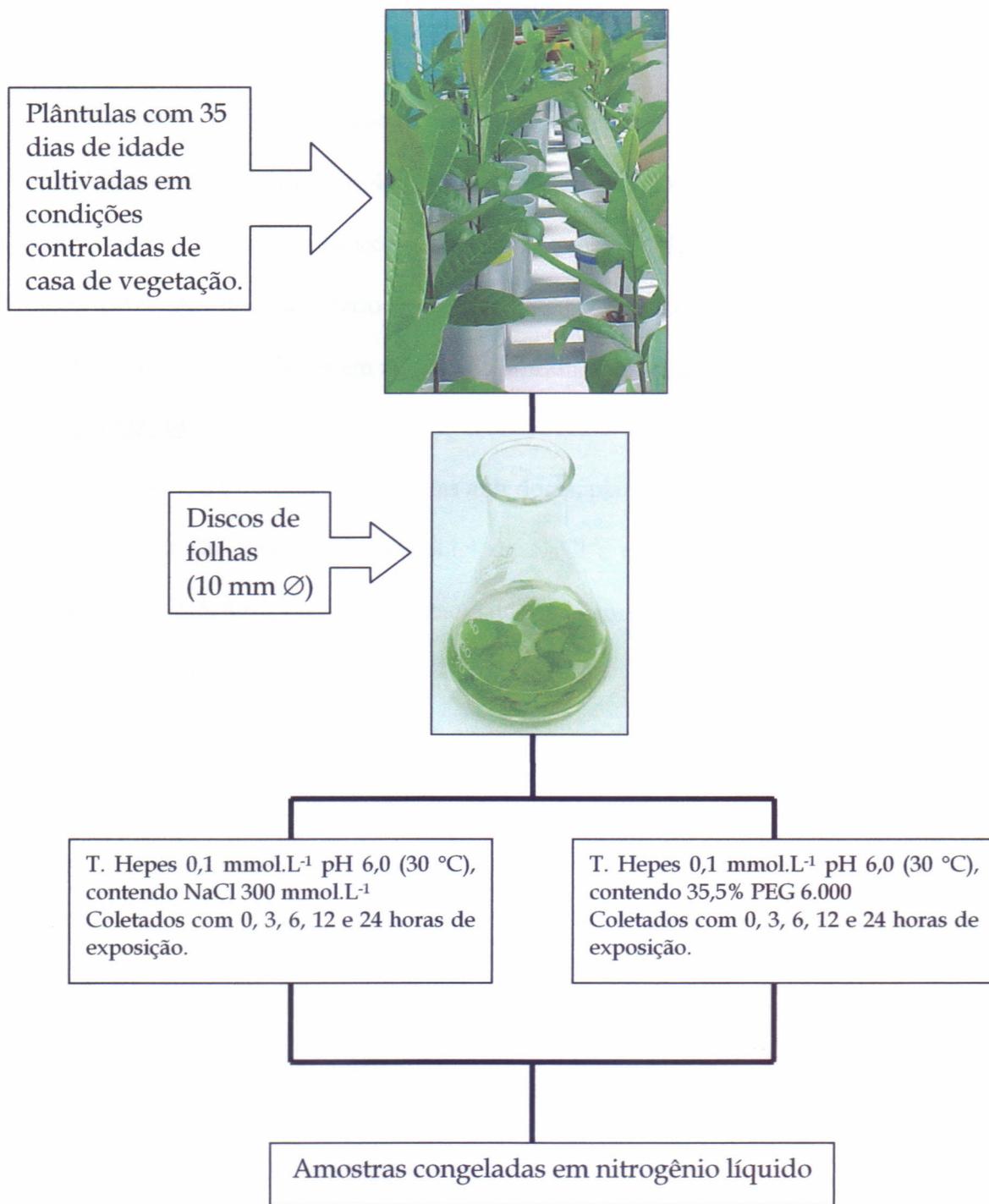


FIGURA 29 - Protocolo experimental (Experimento 12).

solução de Hoagland diluída 1:10. Posteriormente foram realizadas coletas em diferentes tempos de exposição: 0, 12, 24, 48 e 72 horas. As amostras coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 30).

EXPERIMENTO 13

Plântulas obtidas nas mesmas condições anteriores foram submetidas a diferentes níveis de estresse salino, durante 48 horas, em condições idênticas. A composição da solução nutritiva sofreu apenas modificações nas concentrações de NaCl utilizadas: 0, 100, 200, 300 e 400 mmol.L⁻¹. Ao final do período de tratamento, amostras (folhas) foram coletadas e subsequentemente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 30).

EXPERIMENTO 14

Em condições também idênticas as anteriores, plântulas de cajueiro foram submetidas a uma concentração fixa de 300 mmol.L⁻¹ de NaCl e coletadas em diferentes tempos de exposição: 0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias, sendo, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores (Figura 30).

Plântulas com 35 dias de idade cultivadas em condições controladas de casa de vegetação.



Aclimação por 24 horas 30 °C ($\pm 0,5$), 80% de umidade



EXPERIMENTO 13

Solução de Hoagland (1:10) contendo NaCl 0, 100, 200, 300 e 400 mmol.L⁻¹

EXPERIMENTO 14

Solução de Hoagland (1:10) contendo NaCl 300 mmol.L⁻¹ Coletadas com 0, 1, 2, 3, 4 e 5

Amostras congeladas em nitrogênio líquido

FIGURA 30 - Protocolo experimental (Experimentos 13 e 14).

3.4 MÉTODOS

As metodologias das análises utilizadas nesses experimentos estão descritas nos respectivos subitens dos Métodos item 5 (pág. 11):

- 5.1. Concentração de Sódio (pág. 11);
- 5.2. Concentração de Proteínas Solúveis (pág. 11);
- 5.3. Concentração de Aminoácidos Livres Totais (N- α -amino) (pág. 11);
- 5.4. Concentração de Amônio Livre (pág. 12);
- 5.5. Concentração da Prolina Livre (pág. 13);
- 5.6. Separação de Aminoácidos Livres por HPLC (pág. 13);
- 5.7. Determinação da Atividade da Glutamina Sintetase (GS) (pág. 14);
- 5.8. Determinação da Atividade da Ornitina δ -Aminotransferase (OAT) (pág. 16);
- 5.9. Determinação da Atividade da L-glutamato Desidrogenase (GDH) (pág. 16);
- 5.10. Determinação da Atividade da L-glutamato Sintase (GOGAT) (pág. 16);
- 5.11. Determinação da Atividade da Prolina Desidrogenase (PDH) (pág. 17).

3.5 RESULTADOS

Este terceiro trabalho foi desenvolvido com o objetivo de esclarecer a seguinte questão: A maior efetividade de ornitina como precursor de prolina, comparada com o glutamato, está de fato relacionada com o uso preferencial da via da OAT? Inicialmente, as atividades das enzimas OAT, PDH, GS e GOGAT foram avaliadas diante de diferentes concentrações de NaCl no meio de reação, visando comparar a sensibilidade das mesmas diretamente. Os resultados indicam que as doses crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400 mmol.L⁻¹) causaram progressiva redução nas atividades de OAT, PDH e GOGAT enquanto a atividade de GS não foi afetada pelo NaCl (Figura 31A, B). A atividade de PDH foi a mais afetada sendo reduzida em 35% enquanto que OAT e GOGAT foram reduzidas em 50%, comparadas aos respectivos controles, em 400 mmol.L⁻¹ de NaCl.

Em seguida foi realizado um estudo das atividades na presença de soluções iso-osmóticas (potencial de -1,4 Mpa) de NaCl (300 mmol.L⁻¹) e PEG 6000 (35,5% m/v), com discos de folhas incubados em diferentes tempos. A Atividade de PDH foi muito baixa em todos os tratamentos talvez devido ao próprio estresse causado pela manipulação das folhas (dados não apresentados). De um modo geral, as respostas apresentadas pelas atividades de GS, GOGAT, GDH e OAT foram semelhantes às exibidas no extrato bruto, na presença de NaCl. Tanto na presença do NaCl (efeito iônico + efeito osmótico) quanto do PEG (efeito osmótico), as atividades de GOGAT, GDH e OAT decresceram intensamente em função do tempo de exposição. Ao contrário, mais uma vez, a atividade de GS não foi afetada pelo NaCl sendo, inclusive, estimulada pela presença de PEG (Figura 32A, B, C, D).

Quando o mesmo estudo foi realizado com folhas de plântulas inteiras obtiveram-se resultados diferentes. A atividade de PDH, novamente, se mostrou muito baixa inclusive nas

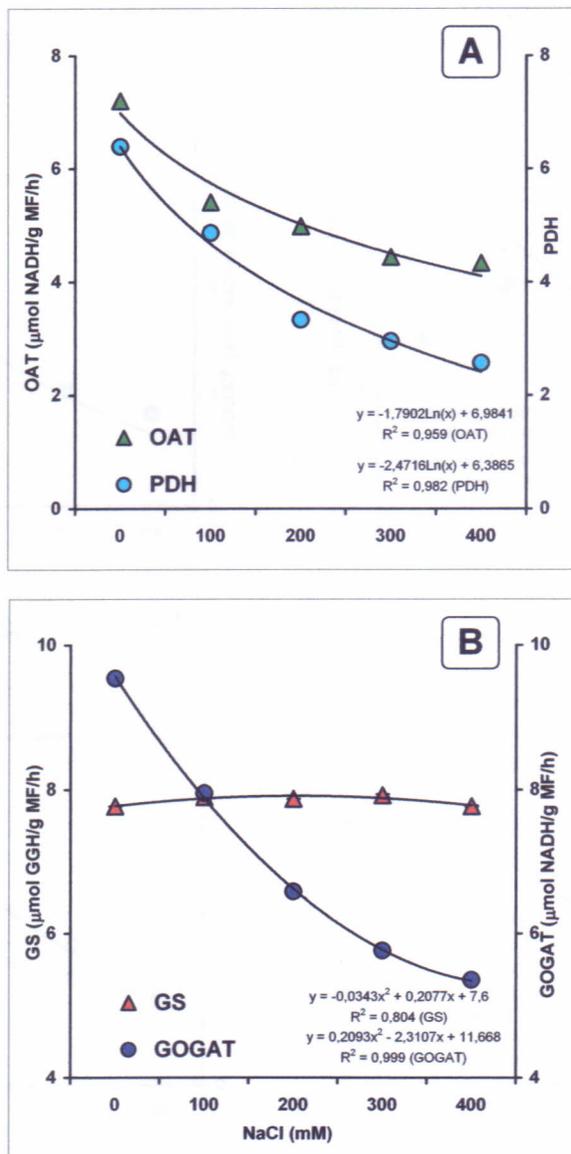


FIGURA 31 - Efeito direto de doses crescentes de NaCl nas atividades das enzimas OAT (\blacktriangle) e PDH (\bullet) (A), GS (\blacktriangle) e GOGAT (\bullet) (B) em extratos brutos de folhas de plântulas de cajueiro com 35 dias de idade.

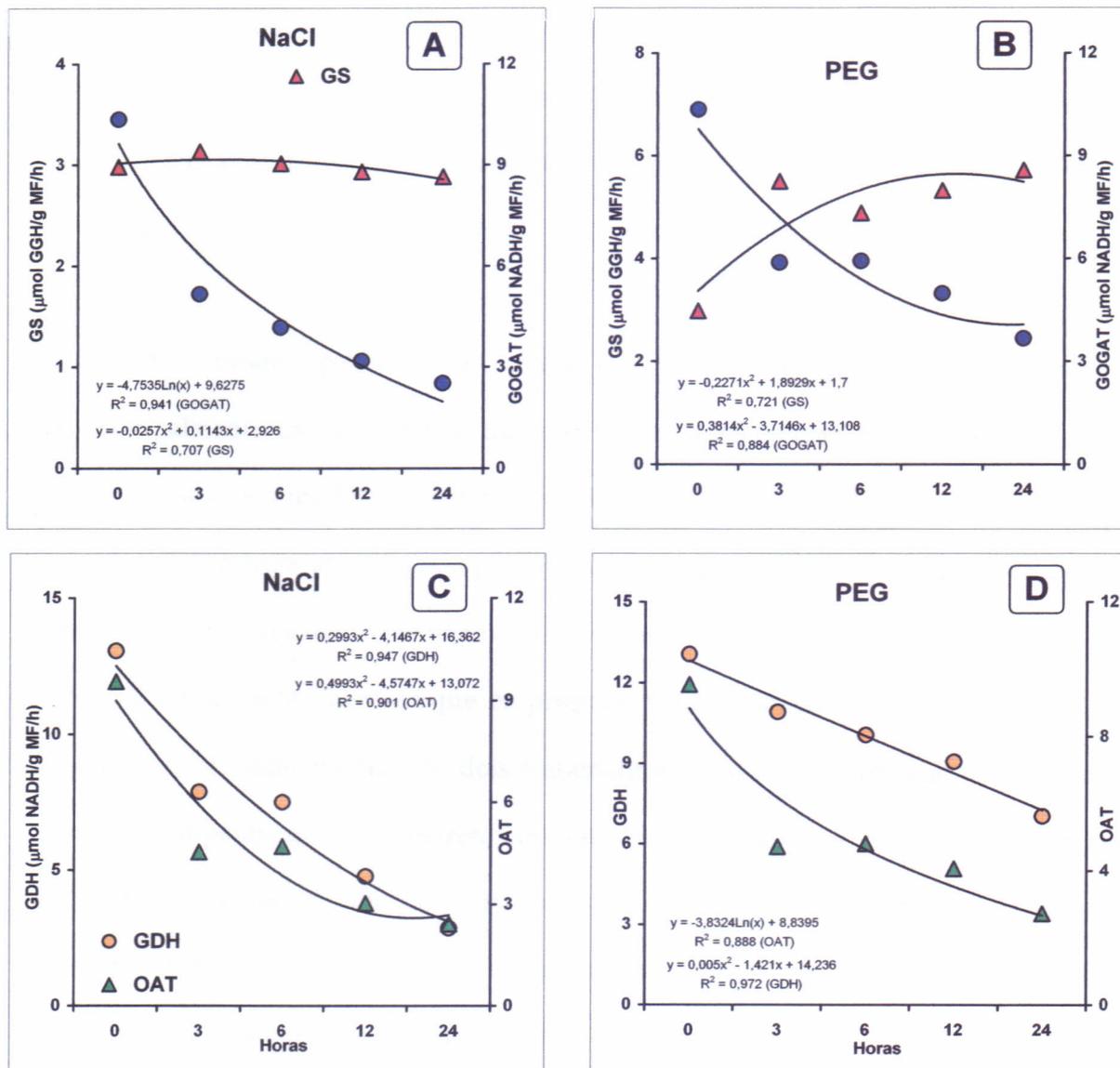


FIGURA 32 - Variações nas atividades das enzimas GS (\blacktriangle), GOGAT (\bullet), GDH (\circ) e OAT (\blacktriangle) em discos de folhas de cajueiro submetidos a soluções isomóticas de NaCl (300 mmol.L^{-1}) (A) e (C) ou PEG 6000 (35,5%) (B) e (D), em função de diferentes tempos de exposição. Os discos representam amostras compostas de 4 plântulas ($n = 4$).

plantas transferidas para solução nutritiva diluída na ausência de NaCl (dados não apresentados). Apesar das folhas das plantas terem exibido sintomas visuais de injúrias causadas pelo NaCl e PEG (Figura 33), observou-se que as atividades de GS, GOGAT, GDH e OAT foram pouco afetadas nos dois tipos de estresse (Figura 34A, B, C, D). De modo geral, a tendência dos resultados mostrou que as atividades de GS e OAT foram ligeiramente estimuladas pelo NaCl e PEG durante o período de exposição (72 horas). GOGAT foi estimulada por PEG mas não por NaCl enquanto que GDH foi ligeiramente estimulada por PEG.

No mesmo período, os níveis de prolina, amônia e AALT aumentaram substancialmente após 24 horas de tratamento com NaCl ou com PEG (Figura 35A, B, C e D). Destaque-se que o modelo de variação dessas frações nitrogenadas foi bastante semelhante nos dois tratamentos sugerindo, a princípio, que o NaCl induziu essencialmente um estresse osmótico. Essa sugestão é reforçada pelas baixas concentrações de Na^+ nas folhas (Figura 35A). É interessante observar que os próprios valores de prolina, AALT e amônia foram essencialmente semelhantes nos dois tratamentos. Observa-se, também, que tais variações foram acompanhadas por discreto aumento na concentração de Glu e um acentuado aumento nos níveis de Gln nos tratamentos com NaCl e PEG. Os níveis de Orn também foram substancialmente aumentados nos dois tratamentos enquanto que os de Arg tiveram um aumento mais acentuado na presença de PEG (Figura 36A, B, C, D).

Quando as plantas foram expostas a níveis crescentes de NaCl (0, 100, 200, 300 e 400 mmol.L^{-1}) observou-se que somente OAT foi estimulada significativamente enquanto que GS, GOGAT e GDH tiveram suas atividades pouco alteradas (Figura 37A, B). Os níveis de prolina foram aumentados em paralelo com os de Na^+ , enquanto os de AALT e amônia aumentaram ligeiramente (Figura 37C, D). Em seguida, realizou-se um novo experimento na

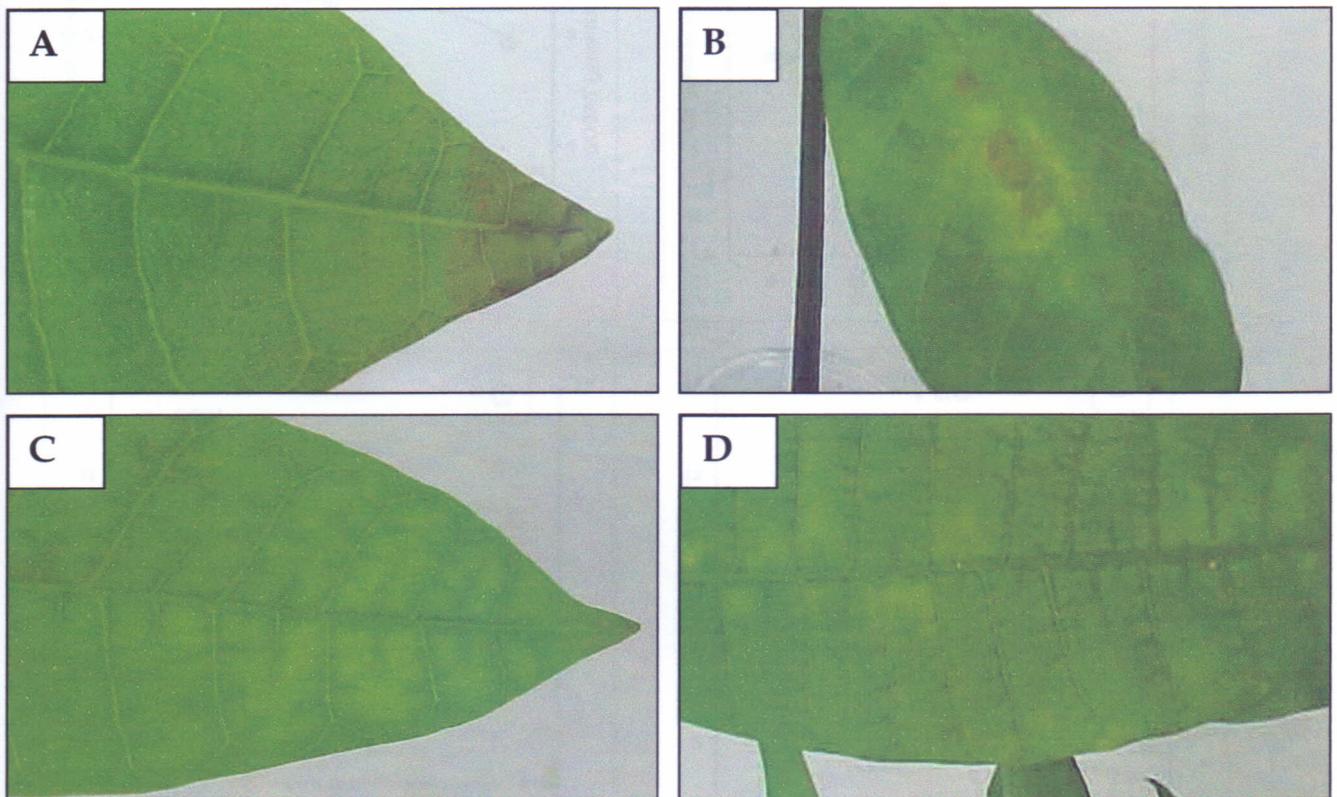


FIGURA 33 - Aspectos dos sintomas em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a soluções isomóticas de PEG 6000 (29,5%) (A) e (B) e NaCl (200 mmol.L⁻¹) (C) e (D), em solução nutritiva, diluída 1:10, durante 72 horas de exposição.

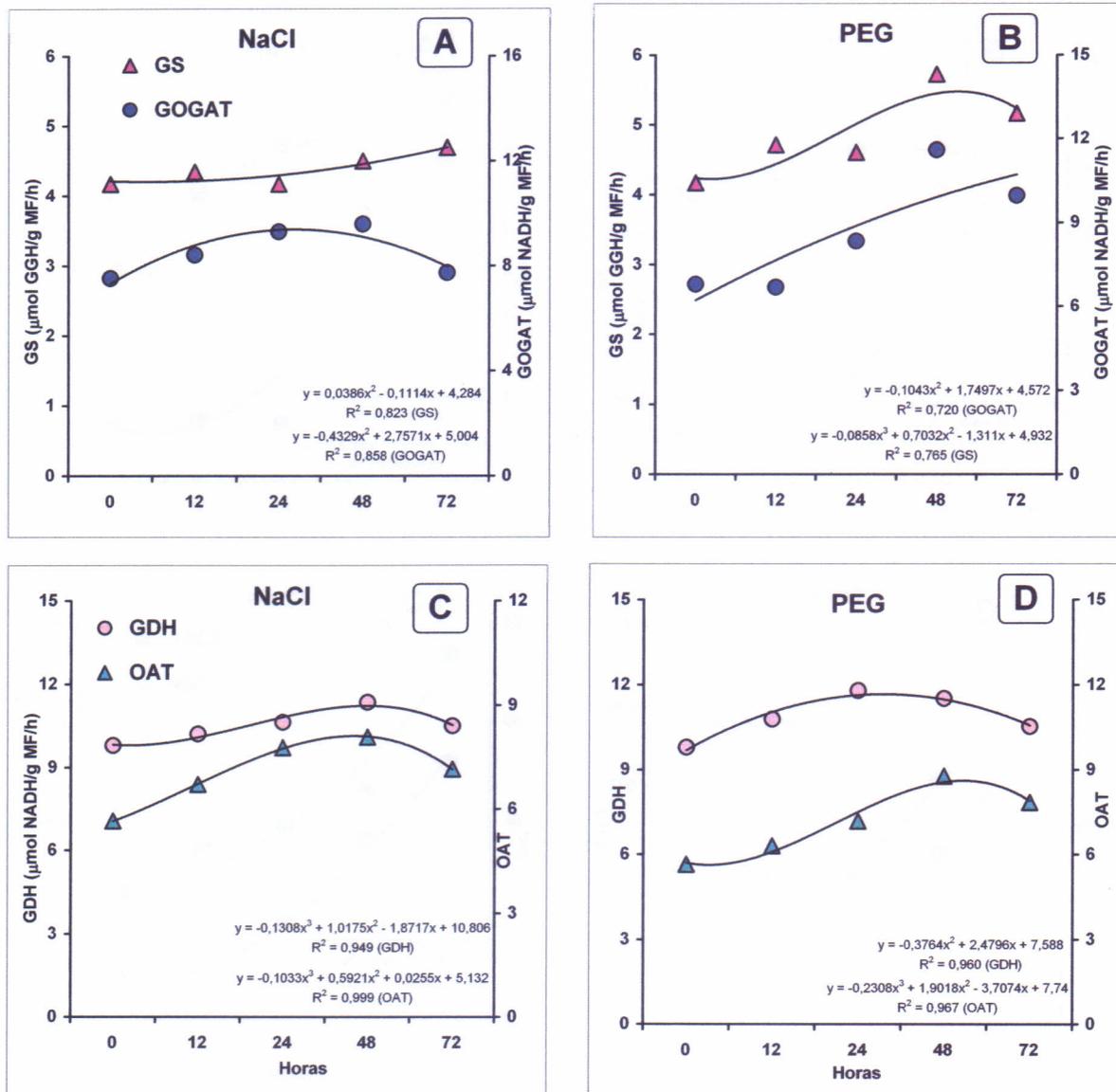


FIGURA 34 - Variações nas atividades das enzimas GS (▲), GOGAT (●), GDH (●) e OAT (▲) em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a soluções isomóticas de NaCl (200 mmol.L⁻¹) (A) e (C) ou PEG 6000 (29,5%) (B) e (D), em função de diferentes tempos de exposição.

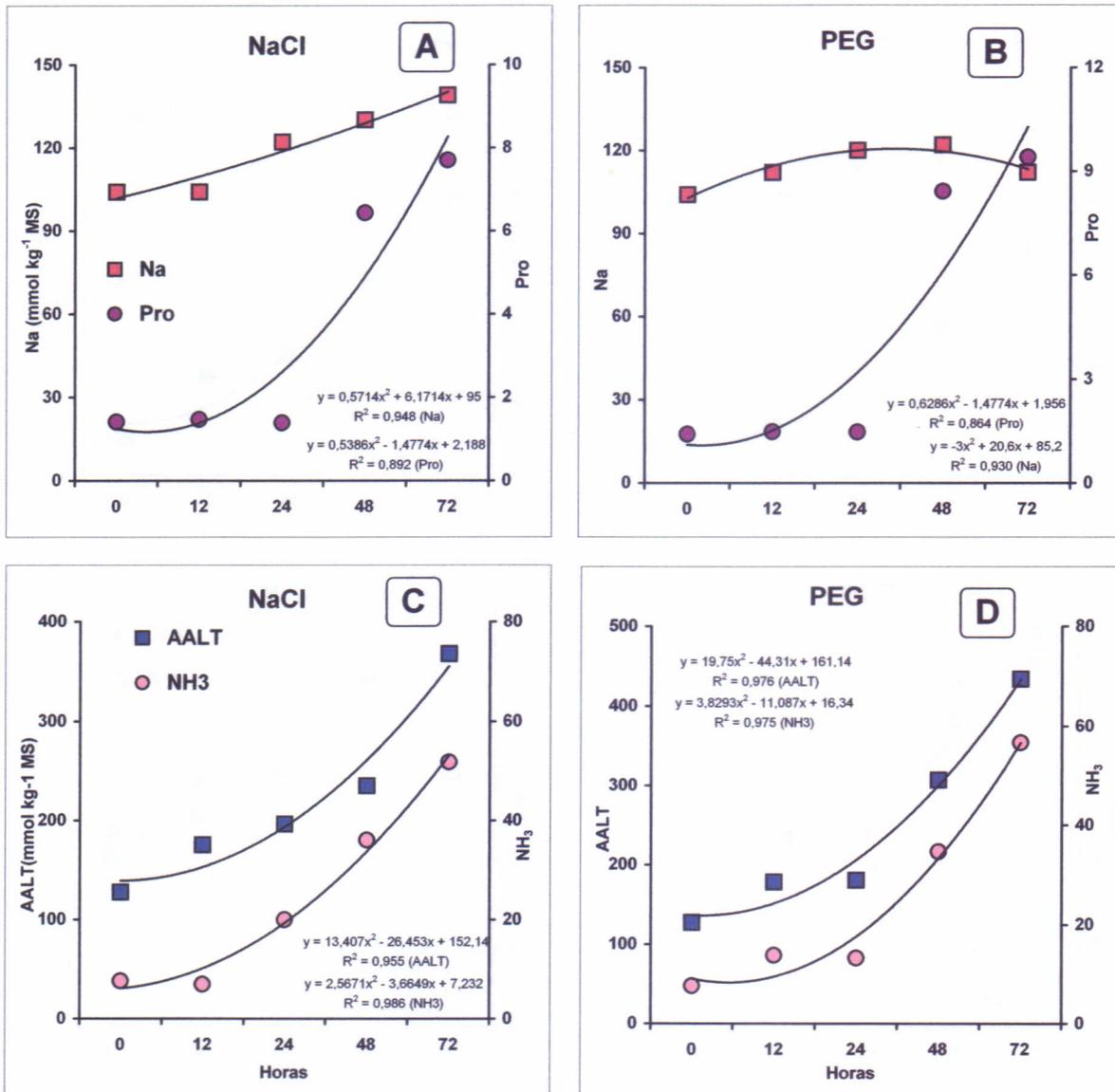


FIGURA 35 - Variações nos conteúdos de sódio (■), prolina (●), aminoácidos livres totais (■) e amônia (●) em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a soluções isosmóticas de NaCl (200 mmol.L⁻¹) (A) e (C) ou PEG 6000 (29,5%) (B) e (D), em função de diferentes tempos de exposição.

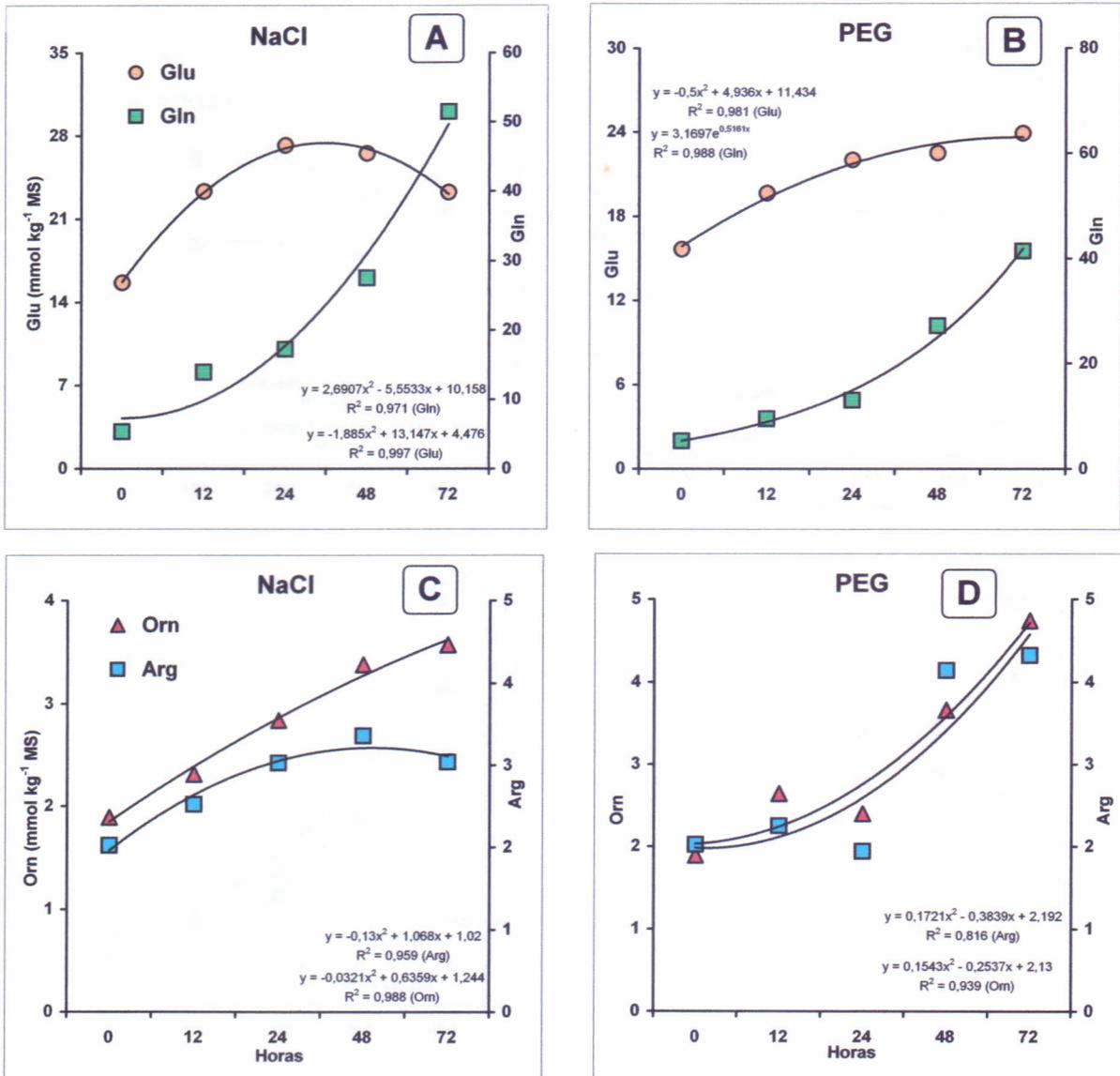


FIGURA 36 - Variações nos conteúdos de glutamato (●), glutamina (■), ornitina (▲) e arginina (■) em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a soluções isomóticas de NaCl (200 mmol.L⁻¹) (A) e (C) ou PEG 6000 (29,5%) (B) e (D), em função de diferentes tempos de exposição.

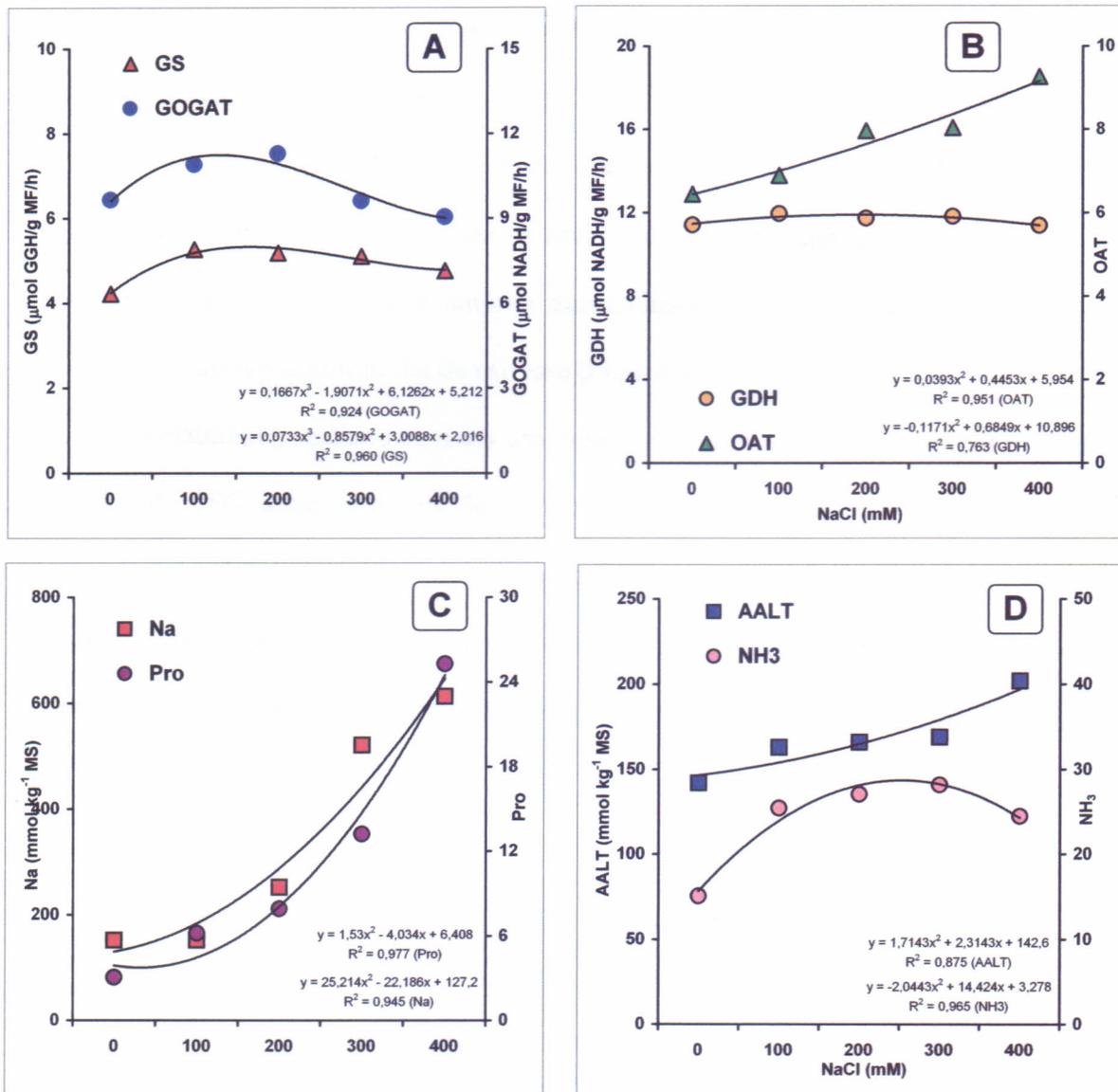


FIGURA 37 - Variações nas atividades das enzimas GS (▲), GOGAT (●) (A), GDH (●) e OAT (▲) (B) e conteúdos de sódio (■) e prolina (●) (C), aminoácidos livres totais (■) e amônia (●) (D) em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a doses crescentes de NaCl durante 48 horas.

presença de 200 mmol.L⁻¹, com duração mais longa (5 dias), com objetivo de induzir injúrias mais severas nas folhas (Figura 38). A atividade de GS foi estimulada ao longo de todo o período enquanto que a de OAT foi estimulada até o segundo dia de tratamento, com subsequente de tendência de declínio. GOGAT foi ligeiramente estimulada enquanto GDH teve sua atividade aumentada até o segundo dia, mantendo-se estável após esse período (Figura 39A, B). A concentração de prolina foi crescente após o segundo dia atingindo um máximo no quinto dia, enquanto que os níveis de Na⁺ atingiram um máximo no terceiro dia. As concentrações de AALT e amônia aumentaram proporcionalmente com incrementos expressivos após o segundo dia de estresse (Figura 39 C, D).

Finalmente, realizou-se mais um ensaio com a finalidade de comparar os efeitos do NaCl e do PEG sobre os níveis de proteínas solúveis ("citosólicas") em tecidos de folhas oriundos de discos ou de plantas inteiras. Interessantemente, o nível de proteínas foi reduzido por NaCl e PEG no período de 24 horas enquanto nas folhas esses níveis permaneceram praticamente constantes ao longo de 72 horas de tratamento (Figura 40A, B).

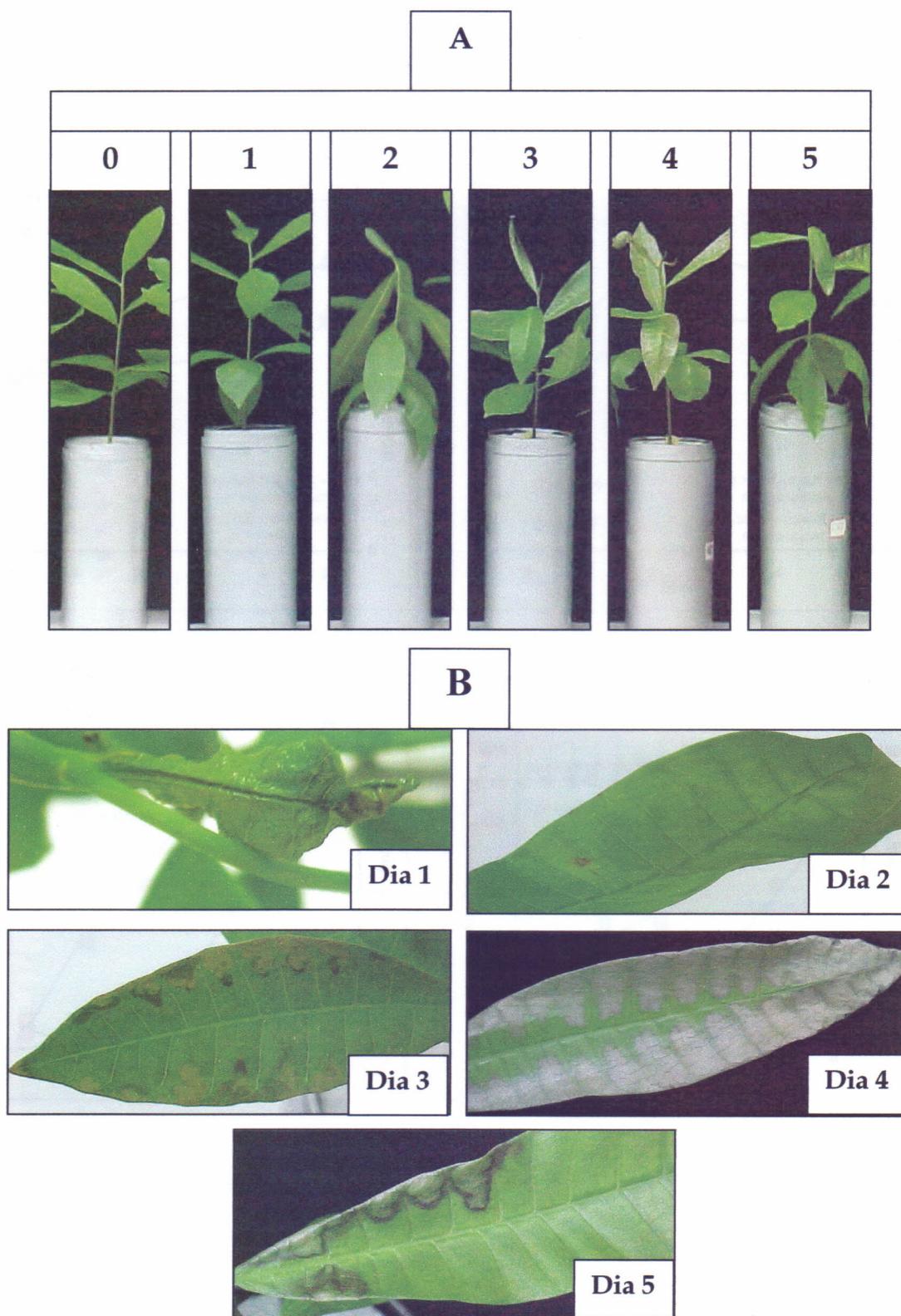


FIGURA 38 - Aspectos de folhas de plântulas de cajueiro submetidos a 200 mmol.L⁻¹ de NaCl em função de diferentes tempos de exposição (A) e detalhes dos sintomas em folhas nos dias 1, 2, 3, 4 e 5 (B).

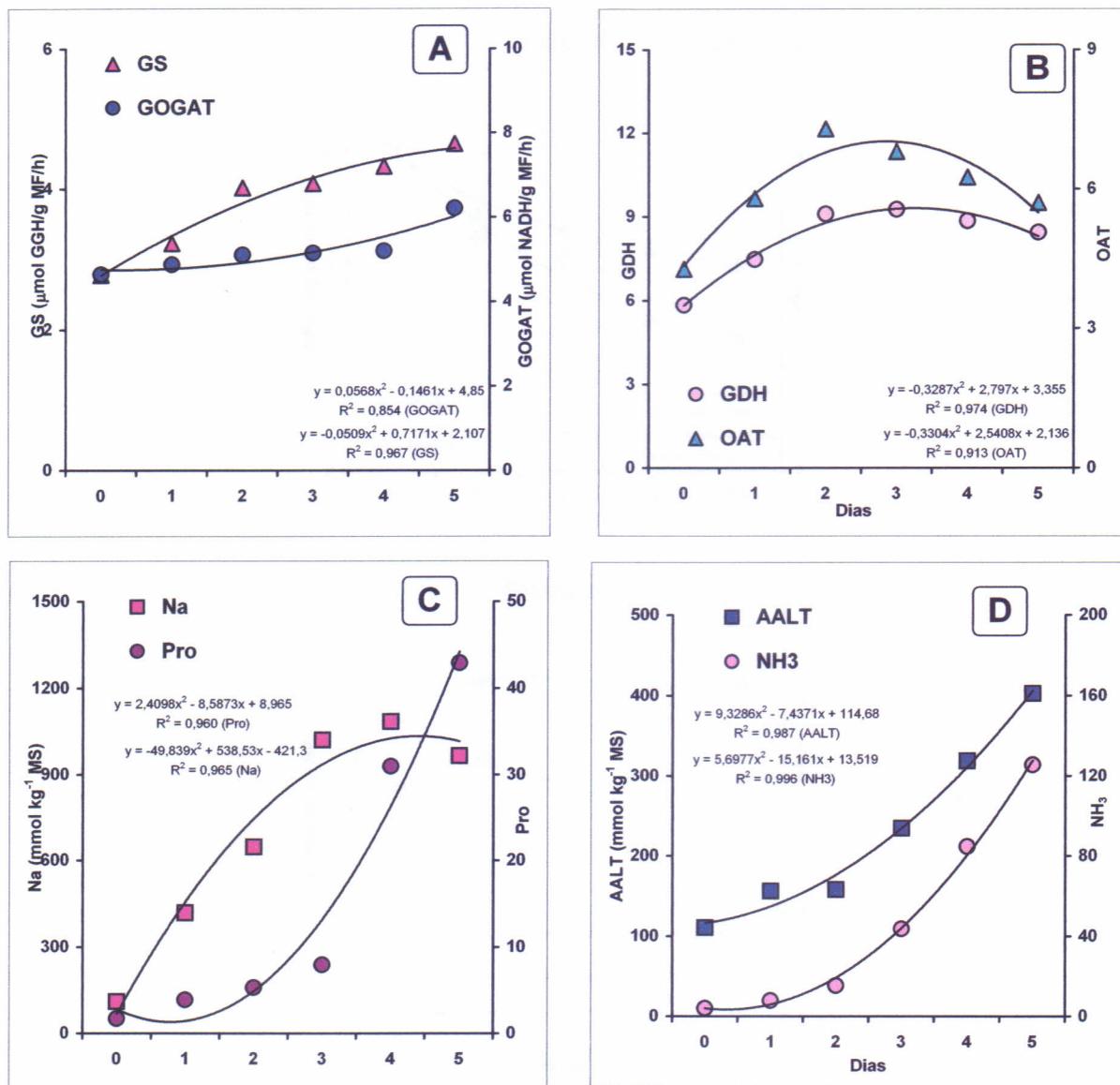


FIGURA 39 - Variações nas atividades das enzimas GS (▲), GOGAT (●) (A), GDH (●) e OAT (▲) (B) e conteúdos de sódio (■) e prolina (●) (C), aminoácidos livres totais (■) e amônia (●) (D) em folhas de plântulas de cajueiro submetidas a 200 mmol.L⁻¹ de NaCl, durante diferentes tempos de exposição.

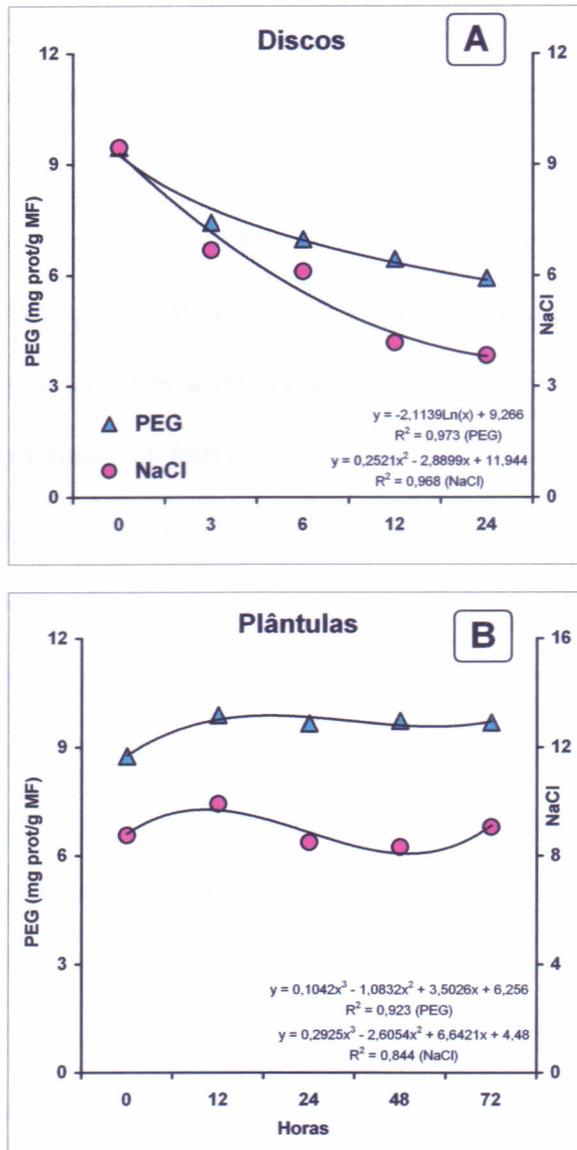


FIGURA 40 - Variações nos conteúdos de proteínas solúveis em discos de folhas de cajueiro (A) submetidos a soluções isomóticas de NaCl (300 mmol.L⁻¹ ●) ou PEG 6000 (35,5% ▲) e folhas de plântulas de cajueiro (B) submetidas a soluções isomóticas de NaCl (200 mmol.L⁻¹ ●) ou PEG 6000 (29,5% ▲), em função de diferentes tempos de exposição.

3.6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados evidenciam, fortemente, que a atividade de GS apresentou maior resistência à presença direta ou indireta do NaCl. Em adição, essa enzima teve sua atividade estimulada pelo estresse osmótico induzido por PEG e por NaCl sob longa duração (5 dias). Esses resultados foram corroborados por um aumento substancial na concentração de glutamina livre nas folhas. No contexto de planta inteira, as atividades de GDH e GOGAT foram pouco afetadas pelos estresses induzidos por NaCl e PEG. Esses resultados foram coerentes com a pequena elevação nos níveis de glutamato causada por NaCl e PEG. Dessa maneira, as folhas das plantas estressadas tiveram uma maior atividade de GS em relação às duas enzimas produtoras de glutamato. O aumento nas concentrações de glutamina foi acompanhado por aumentos nos níveis de amônia livre nos tecidos.

Esses resultados concordam com outros trabalhos recentes com cajueiro (SILVEIRA *et al.*, 2003), em cultivares de arroz (LUTTS *et al.*, 1999), plantas transformadas com GS em tabaco (BRUGIÈRE *et al.*, 1999), discos de folhas de tomateiro (LARHER *et al.*, 1998) e segmentos de folhas de arroz (SAHU *et al.*, 2001), em condições de estresse salino. Nesse sentido, a elevação no nível de amônia livre poderia atuar na indução da *síntese de novo* de GS cloroplástica (LEA *et al.*, 1990; LUTTS, *et al.*, 1999; HOSHIDA *et al.*, 1997), favorecendo, assim, o aumento da sua atividade. Esse quadro seria favorecido, ainda, pelo aumento no fluxo dos precursores de GS (amônia e glutamato), na condição de estresse salino, devido a intensa reciclagem no *pool* de aminoácidos livres causada por processos fisiológicos associados com o estresse salino tais como fotorespiração e proteólise (SILVEIRA *et al.*, 2003). Recentemente, LIN e KAO (2001) trabalhando com segmentos de folhas de arroz demonstraram que concentrações elevadas de amônia causaram aumentos nos níveis de glutamina e prolina, associados com aumentos nas atividades de P5CS e OAT.

Diversas evidências experimentais sustentam que o aumento na concentração de prolina sob estresse salino está ligado ao aumento na expressão dos genes e *síntese de novo* das enzimas P5CS e OAT e associado com diminuição na síntese e atividade de PDH e P5CDH (KAVI, 1995; PENG *et al.*, 1996; HARE e CRESS, 1997; ROOSENS *et al.*, 1998; LARHER *et al.*, 2003). Entretanto, nos últimos anos, pesquisas têm sido concentradas sobre a expressão de genes e atividades daquelas enzimas ligadas diretamente com a via biossintética/degradação da prolina. Praticamente não existem trabalhos publicados sobre a produção, disponibilidade e fluxo dos precursores de prolina sob condição de estresse (LARHER *et al.*, 2003). A ausência de tais estudos integrados (expressão gênica/síntese protéica/atividade enzimática/fluxo de precursores) contribui para a controvérsia sobre a origem metabólica da acumulação de prolina.

Apesar da glutamina não ser um precursor imediato de prolina, diversas evidências experimentais, com diferentes enfoques, tem apontado que essa amida exerce efeito marcante na acumulação de prolina (BRUGIÈRE *et al.*, 1999; HOSHIDA *et al.*, 1997; LIN e KAO, 2001). Além do glutamato, glutamina é também precursora no ciclo da uréia favorecendo a produção de arginina (LEA *et al.*, 1990). Por ação de arginase, Arg é convertida em Orn. Dessa maneira, poderia ser explicada a quantidade elevada de Arg produzida nos discos de cajueiro quando Gln foi utilizada como precursor (Tabela 1). Um aumento nas atividades das enzimas do ciclo da uréia induzido por aumento dos respectivos precursores/substratos, causado por desbalanço no metabolismo dos aminoácidos, induzido por estresse salino, poderia explicar o aumento na concentração de Orn quando Arg ou Gln foram usadas como precursor nos ensaios com discos de cajueiro.

No presente estudo, as folhas de plântulas de cajueiro expostas ao NaCl ou PEG exibiram concentrações elevadas de glutamina livre. Esses aumentos foram relacionados com atividades elevadas de GS as quais não foram diminuídas sob estresse. Como a atividade enzimática representa uma velocidade de produção de um metabólito, se for assumido que

na condição de estresse a síntese protéica de tecidos de cajueiro foi interrompida ou drasticamente reduzida (SILVEIRA *et al.*, 2003) ter-se-ia, como conseqüência, uma acumulação progressiva do produto da ação enzimática a não ser que a taxa de utilização desse produto fosse maior. Portanto, o nível de glutamina ou de qualquer precursor, deverá refletir um balanço de suas taxas de síntese e utilização. Nesse sentido, mais uma vez, os resultados apresentados aqui são coerentes no sentido de mostrar que a via GS/GOGAT atuou como uma fonte dos precursores Glu e Orn a partir, basicamente, de NH_3 e ácidos orgânicos.

O fato da atividade de OAT ter sido estimulada nas plantas estressadas, associado com os dados de que Arg e Orn se mostraram os mais eficientes precursores de prolina sugerem, fortemente, que a via OAT é importante para cajueiro como tem sido reportado para outras espécies (HERVIU *et al.*, 1995; ROOSENS *et al.*, 1998; LIN e KAO, 2001; ROOSENS *et al.*, 2002). A questão principal é saber se as atividades aumentadas ou mesmo mantidas no nível do controle foram decorrentes do aumento na concentração da enzima (síntese *de novo*) ou se devido ao aumento no fluxo de ornitina. Esta segunda hipótese não deve ser descartada ou que as duas não sendo excludentes podem, conjuntamente, explicar a importância da via OAT no suprimento de P5C para a síntese de prolina em folhas de cajueiro. Outros estudos são necessários envolvendo a parte enzimática (isoformas, regulação, "turnover" - meia vida, fluxo de substratos, etc.) com estudos sobre expressão gênica e cinética de RNAm, síntese e atividade de OAT.

É também, interessante também observar que no presente trabalho somente foi possível detectar atividade relativamente elevada de PDH a partir de folhas de plântulas cultivadas, aparentemente, sem qualquer tipo de estresse importante (boa disponibilidade de água no substrato, umidade relativa do ar, temperatura e radiação solar adequados para o cajueiro). Quando as plantas foram transplantadas para meio líquido (hidroponia) ou os discos de folhas foram retirados, a atividade de PDH foi reduzida praticamente a zero. Essas

observações podem indicar que a atividade dessa enzima nas plantas de cajueiro é extremamente sensível a mudanças no ambiente ou perturbações físicas semelhante ao observado recentemente em discos de canola onde a atividade de PDH foi reduzida a praticamente zero dentro de poucos minutos de estresse (TROTEL-AZIZ *et al.*, 2000). Se essa hipótese for confirmada em cajueiro, pode-se então assumir a importância dessa enzima na acumulação de prolina como já observado em outras espécies (PENG e VERMA, 1996; NANJO *et al.*, 1999; FORLANI *et al.*, 2000; HAYASHI *et al.*, 2000; LARHER *et al.*, 2003).

Os dados discutidos neste trabalho mostram claramente a importância de reações anteriores à via central da síntese de prolina na acumulação deste osmo-soluto através do suprimento de substratos e precursores. Desses precursores, destacam-se amônia, arginina e glutamina. Das reações envolvidas, podem ser destacadas as vias de assimilação de amônia GS/GOGAT/GDH, com destaque para a GS no suprimento de glutamato e possivelmente ornitina a partir de reações secundárias tais como via arginase no ciclo da uréia. O fluxo favorável de precursores associado com uma reduzida utilização de prolina durante o período de estresse, deve ter mantido as atividades das enzimas chave (P5CS e OAT) em níveis compatíveis para ocorrer um excedente de prolina nos tecidos. A hipótese que houve paralelamente um aumento na síntese *de novo* das enzimas envolvidas é bastante plausível e merece ser testada.

Como conclusão deste estudo, ficou demonstradas a importância dos precursores secundários, NH₃ e glutamina, juntamente com a via GS/GOGAT e a atividade de OAT como fontes de precursores imediatos para a síntese de prolina em tecidos de folhas de cajueiro sob estresse salino. Finalmente, os dados correlativos deste trabalho demonstraram que GS e NH₃ produzida pelo catabolismo de aminoácidos desempenham um papel central na acumulação de prolina.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que os discos de folhas de cajueiro constituem um modelo adequado para estudar a acumulação de prolina em resposta aos estresses osmótico e iônico induzidos por NaCl e PEG 6000, particularmente no aspecto dos seus efeitos mais diretos mais diretos sobre o metabolismo celular.

Ornitina se apresentou como um precursor mais efetivo na indução da acumulação de prolina em folhas de cajueiro submetidas ao estresse salino, quando comparada com o glutamato.

Ficou demonstrada a importância do fluxo dos precursores secundários arginina, NH_3 e glutamina para a manutenção da atividade das enzimas GS, GOGAT, GDH e OAT em níveis elevados na condição de estresse.

Os dados correlativos deste trabalho demonstram que acumulação de prolina, em folhas de cajueiro, sob estresse salino, depende, grandemente, de reações supridoras dos precursores glutamato e ornitina tendo a glutamina sintetase como uma enzima chave.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHRAF, M.E. O'LEARY, J.W. Distribution of cations in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive lines of sunflower under saline conditions. **Journal Plant Nutrition**, v.18, p.2379-2388. 1995.

AZIZ A., LARHER F. Changes in polyamine titers associated with the proline responses and osmotic adjustment of rape leaf discs submitted to osmotic stresses. **Plant Science**, v.112, p.175-186. 1995.

AZIZ A., MARTIN-TANGUY J., LARHER F. Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. **Plant Science**, v.145, p.83-91. 1999.

AZIZ, P.T., NIOGRET, M.F., LARHER, F. Proline level is partly under the control of abscisic acid in canola leaf discs during recovery from hyper-osmotic stress. **Physiology Plantarum**, v.110, p.376-383. 2000.

BARROS, M.L., CAVALCANTI, J.J. VASCONCELOS, J. PAIVA, J.R. Seleção de clones de cajueiro-anão para o plantio comercial no Estado do Ceará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.11, p.2197-2204. 2000.

BATES L.S., WALDREN R.P., TEARE I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant and Soil**, v.39, p.205-207. 1973.

BERTELI, F., CORRALES, E., GUERRERO, C., ARIZA, M.J., PILEGO, F., VALPUESTA F. Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in level in the leaves of tomato. **Physiology Plantarum**, v.93, p.259-264. 1995.

BOHNERT, H.J. JENSEN, R.G. Metabolic engineering for increased salt tolerance – the next step: comment. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.23, p.661-666. 1996.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.246-254. 1976.

BRUGIÈRE, N., DUBOIS, F. LIMAMI, A.M., LELANDAIS, M., ROUX, Y., SANGWAN, R.S., HIDEI, B. Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling proline production. **The Plant Cell**, v.11, p.1995-2011. 1999.

CHAREST C., PHAN C.T. Cold acclimation of wheat (*Triticum aestivum*): Properties of enzymes involved I proline metabolism. **Physiology Plant**, v.80, p.159-168. 1990.

CHESEMANN, J.M. Mechanisms of salinity tolerance in plants. **Plant Physiology**, v.87, p.547-550. 1988.

DAVENPORT, R.J., REID, R.J. SMITH, F.A. Sodium-calcium interactions in two wheat species differing in salinity tolerance. **Physiologia Plantarum**, v.99, p.323-327. 1997.

DELAUNEY A.J., VERMA D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, v.4, p.215-23. 1993.

FAGERIA, N.K. GHEYI, H.R. Melhoramento genético das culturas e seleção de cultivares. In: *Manejo e Controle da Salinidade na Agricultura irrigada* (Eds.): H.R. GHEYI, J.E. QUEIROZ, J.F. MEDEIROS, Campina Grande - PB, Universidade Federal da Paraíba, p.363-383. 1997.

FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. *Anal Chemistry*, v.49, p.1080. 1977.

FERREIRA, O.S. Seleção de porta-enxertos de cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) para tolerância ao estresse salino através de índices fisiológicos. Fortaleza -Ceará: Universidade Federal do Ceará. 2000. p.34. **Monografia de Graduação.**

FIEC - Federação das Indústrias do Estado do Ceará - Exportações Cearense no período 2001/2002. Disponível em <http://www.sfiec.org.br/>.

FLOWERS, T.J. TROKE, P.F., YEO, A.R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, v.28, p.89-121. 1977.

FORLANI, G., MANGIAGALLI, A., PINTER, C., NIELSEN, E. Expression dehydrogenase and proline/arginine homeostasis in *Solanum tuberosum*. *Physiologia Plantarum*, v.110 (4), p.22-27. 2000.

GIBON Y., SULPICE R., LARHER F. Proline accumulation in canola leaf discs subjected to the loss of chlorophylls and to the decrease of mitochondrial activity. *Physiologia Plantarum*, v.110 (4), p.469-476. 2000.

GREEWAY, H., MUNNS, R.A. Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, v.31, p.149-190. 1980.

HARE, P.D., CRESS, W.A. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation*, v.21, p.79-102. 1997.

HARE, P.D., CRESS, W.A., VAN STADEN, J. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of Experimental Botany*, v.50 (333), p.413-434. 1999.

HAYASHI, F., ICHINO, T., OSANAI, M., WADA, K. Oscillation and regulation of proline content by P5CS and ProDH gene expressions in the light/dark cycles in *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Physiology*, v.41(10), p.1096-1101. 2000.

HERNANDEZ, S., DELEU, C., LARHER F. Accumulation de proline dans les tissus foliaires de tomate en réponse à la salinité. *Biologie et pathologie végétales / Plant biology and pathology*, v.323, p.551-557. 2000.

HERVIU F., FREDERIK, L.D., BILLARD, J.P., HUAULT, C. Contribution of ornithine aminotransferase to proline accumulation in NaCl treated radish cotyledons. *Plant Cell Environment*, v.18, p.205-210. 1995.

HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Exp. Stn. Cir.** p.347. 1950.

HOSHIDA, H., TANAKA, Y. HIBINO, T., TAY, A., TAKABE, T. Enhanced tolerance to salt stress in transgenic rice that overexpression chloroplast glutamine synthetase. **Plant Molecular Biology**, v.43, p.103-111. 1997.

HUGUET-ROBERT, V., SULPICE, R., LEFORT, C., MAERSKALCK, V., EMERY, N., LARHER F.R. The suppression of osmoinduced proline response of *Brassica napus* L. var *oleifera* leaf discs by polyunsaturated fatty acids and methyljasmonate. **Plant Science**, v.164, p.119-127. 2003.

IGARASHI, Y., YOSHIBA, Y., SANADA, Y. YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Characterisation of the gene for Pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oriza sativa*. **Plant Molecular Biology**, v.33, p.857-865. 1997.

INGRAN, J. BERTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.47, p.377-403. 1996.

KANAMORI, T. MATSUMOTO, H. Glutamine synthetase from rice plant roots. **Arch. Biochemistry Biophysics**, v.152, p.404-412. 1972.

KAVI, K.P.B. Overexpression of D 1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in-creases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v.108, p.1387-1394. 1995.

KEMBLE, A.R., MACPHERSON, H.T. Liberation of aminoacids in perennial rye grass during wilting. **Biochemistry Journal**, v.58, p.46-59. 1954.

KISHOR, P.B.K., HONG, Z., MIAO, G.H., HU, C.A., VERMA, S.P.S. Overexpression of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v.108, p.1387-1394. 1995.

KUMAR, R.G., SHANH, K., DUBEY, R.S. Salinity induced behavioral changes in malate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase activities in rice seedlings of differing salt tolerance. **Plant Science**, v.156, p.23-24. 2000.

KUZNETSOV, V.V., SHEVYAKOVA, N.I. Stress responses of tobacco cells higt temperature and salinity. Proline accumulation and phophorylation of polypeptides. **Physiology Plantarum**, v.100, p.320-326. 1997.

LARHER, F., AZIZ, A., DELEU, C., LEMESLE, P., GHAFAR, A., BOUCHARD, F., PLASMAN, M. Suppression of osmoinduced proline response of rape leaf discs by polyamines. **Physiology Plantarum**, v.102, p.139-147. 1998.

LARHER, F.R., ROBERT., V.H., SULPICE, R., LEFORT,C., MAERSKALCK, V., EMERGY, N. The suppression of osmoinduced proline response of *Brassica napus* L. var. *oleifera* leaf discs by polyunsaturated fatty acids and methyl-jasmonate. **Plant Science**, v.164, p.119-127. 2003.

- LA-ROSA, P.C., CHEN Z., NELSON D.E., SING. N.K., HASEGAWA P.M., BRESSAN R.A. Osmotin gene expression is posttranscriptionally regulated. **Plant Physiology**, v.100, p.409-415. 1991.
- LEA, P.J. ROBINSON, S.A., STEWART, G.R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagines - **In: Biochemistry of Plants - A Comprehensive Treatise**. (Stumpf, P.K., Conn, E.E., eds.). Vol.16. 1990.
- LI N, C.C., HSU, Y.T., KAO, C.H. The effect of NaCl on proline accumulation in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.36 (3), p.275-285. 2002.
- LIN, C.C., KAO, C.H. Regulation of ammonium induced proline accumulation in detached rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.35, p.69-74. 2001.
- LIU, J., ZHU, J.K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.114, p.591-596. 1997.
- LUTTS, S., KINET, J.M., BOUHARMONT, J. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Annals of Botany**, v.78, p.389-398. 1996.
- LUTTS, S., MAJERUS. V., KINET, J.M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiology Plant**, v.105, p.450-458. 1999.
- MATOH, T., TAKAHASHI, E. Glutamate synthase in greening pea shoots. **Plant Cell Physiology**, v.22, p.727-731. 1981.
- MATOS, N. N. Relações hídricas e atividade da redutase de nitrato em mudas de cajueiro anão (*Anacardium occidentale* L.) submetidas aos estresses hídrico e salino. Fortaleza -Ceará: Universidade Federal do Ceará. 2001. p.78. **Dissertação de Mestrado**.
- MENESES JUNIOR, J. Expressão de caracteres fisiológicos induzida por estresse salino em três progênes de cajueiro. Fortaleza -Ceará: Universidade Federal do Ceará. 2002. p.157. **Tese de Doutorado**.
- MILLER, A.J., WILLIAMS, L.E. Transporters responsible for uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology**, v.52, p.659-688. 2001.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.141-151. 2002.
- NANJO, T., KOBAYASHI, T.M., YOSHIDA, Y., KAKUBARI, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Lett**, v.461, p.205-210. 1999.
- NIU, X., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M. PARDO, J.M. Ion homeostasis in NaCl stress environments. **Plant Physiology**, v.109, p.735-742. 1995.

PENG, Z., LU, Q., VERMA, D.P.S. Reciprocal regulation of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes control proline levels during and after osmotic stress in plants. **Molecular Gen. Genetic**, v.253, p.334-341. 1996.

PEOPLES, M.B., FAIZAH, A.W., REAKASEM, B., HERRIDGE, D.F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. **Australian Center for International Agricultural Research**, p.76. 1989.

RAMAJULU, S., VLERAJANIYULU, K., SUDHAKAR, C. Short-term shifts in nitrogen metabolism in mulberry *Morus alba* under salt shock. **Phytochemistry**, v.35, p.91-95. 1994.

RHODES, D., HANSON, A.D. Quaternary ammonium and tertiary sulphonium compounds in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.44, p.357-384. 1993.

RICCARDI, F., GAZEAU, P., VIENNE, D., ZIVY, M. Protein changes in response to progressive water in maize - quantitative variation and polypeptide identification. **Plant Physiology**, v.117, p.1253-1263. 1998.

ROOSENS, N.H., BITAR, F.A., LOENDERS, K., ANGENON, G., JACOBS, M. Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. **Molecular Breeding**, v.9(2), p.73-80. 2002.

ROOSENS, N.H.C.J., THU, T.T., ISKANDAR, H.M., JACOBS M. Isolation of ornithine- δ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v.117, p.263-271. 1998.

SAHU, A.C., SAHOO, S.K., SAHOO, N. NaCl-stress induced alteration in glutamine synthetase activity in excised senescing leaves of a salt-sensitive and a salt-tolerance rice cultivar in light an darkness. **Plant Growth Regulation**, v.34(3), p.287-292. 2001.

SARRUGE, J.R., HAAG, H.P. Análise química de plantas. **Piracicaba - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, p.56. 1974.

SHANNOM, M.C. Adaptation of plants to salinity. **Advances Agronomic**, v.60, p.76-199. 1997.

SHANNON, M.C., GRONWALD, J.W. TAL, M. Effects os salinity on growth and accumulation of organic and inorganic ions in cultivated and wild tomato species. **Journal Am. Soc. Horticulture Science**, v.112, p.416-423. 1987.

SHEVELEVA, E., CHMARA, W., BOHNERT, H.J., JENSEN, R.G. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. **Plant Physiology**, v.115, p.1211-1119. 1997.

SILVA, S.L.F. Características fisiológicas de dois porta-enxertos de cajueiro anão precoce (*Anacardium occidentale* L.) submetidos ao estresse salino. Fortaleza -Ceará: Universidade Federal do Ceará. 2002. p.34. **Monografia de Graduação**.

SILVA, V.V. O produtor pergunta, a Embrapa responde. Coleção 500 perguntas 500 respostas. **Embrapa - CNPAT**, p.220. 1998.

SILVEIRA, J.A.G., MATOS, J.C.S., CECATTO, V.M., VIÉGAS, R.A., OLIVEIRA, J.T.A. Nitrate reductase activity, distribution, and response to nitrate in two contrasting *Phaseolus* species inoculated with *Rhizobium* spp. **Environmental and Experimental Botany**, v.46, p.37-46. 2001.

SILVEIRA, J.A.G., MELO, A.R.B., VIÉGAS, R.A., OLIVEIRA, J.T.A. Salinity-induced effects on nitrogen assimilation related to growth in cowpea plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.46, p.171-179. 2001.

SILVEIRA, J.A.G., VIÉGAS, R.A., QUEIROZ, J.E. Alterações no metabolismo do nitrogênio e acumulação de prolina em plantas jovens de cajueiro submetidas ao estresse salino. Livro de Resumos XVI Congresso Brasileiro de Fruticultura, Fortaleza - Ceará, 25 a 29 de Setembro de 2000, p. 251. 2000.

SILVEIRA, J.A.G., VIÉGAS, R.A., ROCHA, I.M.A., MOREIRA, A.C.O.M., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.115-123. 2003

SILVEIRA, J.A.G.S., CARDOSO, B.B., MELO, A.R.B., VIÉGAS, R.A. Salt-induced decrease in uptake and assimilation in cowpea plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11(2), p.30-35. 1999.

SOLOMON, A., BEER, S., WAISEL, G., JONES, P., PALEG, L.G. Effects of NaCl on the carboxylating activity of rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. **Physiologia Plantarum**, v.90, p.198-204. 1994.

THOMPSON, J.F. Arginine synthesis, proline synthesis, and related process. In: **Biochemistry of Plants - A Comprehensive Treatise**. (Stumpf, P.K., Conn, E.E., eds.). Vol.16. 1980.

TROTEL-AZIZ, P., NIOGRET, M-F., LARHER, F. Proline level is partly under the control of abscisic acid in canola leaf discs during recovery from hyper-osmotic stress. **Physiologia Plantarum**, v.110, p.376-383. 2000.

VIÉGAS, R.A. Assimilação de nitrogênio e acumulação de solutos em plantas de cajueiro em resposta ao estresse salino. Fortaleza -Ceará: Universidade Federal do Ceará. 1999. p.85. **Tese de Doutorado**.

VIÉGAS, R.A., MELO, A.R.B., SILVEIRA, J.A.G. Assimilação de amônia e acumulação de prolina em plantas submetidas à salinidade durante longa duração. In: **VII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**, v.11, p.123. 1999.

VIÉGAS, R.A., SILVEIRA, J.A.G. Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long-term exposure to NaCl-salinity. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.11, p.153-159. 1999.

VIÉGAS, R.A., SILVEIRA, J.A.G., MELO, A.R.B., LIMA JUNIOR A.R., QUEIROZ, J.E. FAUSTO, M.J.M. Effects of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation of young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.

WINICOV, I. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. **Annals of Botany**, v.82, p.703-710. 1998.

YANG, C.W., KAO, C.H. Importance of ornithine- δ -aminotransferase to proline accumulation caused by water stress in detached rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v.27(3), p.191-194. 1999.

YEO, A. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.915-929. 1998.

YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; KATAGIRI, T.; UEDA, H.; MIZOGUCHI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; WADA, K.; HARADA, Y. SHINOZAKI, K. Correlation between the induction of a gene for D 1 -pyrroline- 5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. **Plant Journal**, v.7, p.751-760, 1995.

ZHU, JIAN-KANG. Genetic Analysis of Plant Salt Tolerance using *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 124, p.941-948. 2000.