



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

PAULO ANDRÉ FERREIRA DE FREITAS

**APLICAÇÃO FOLIAR DE PROLINA COMO MEIO DE MINORAR OS EFEITOS
DO ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE MILHO**

FORTALEZA – CE

2013

PAULO ANDRE FERREIRA DE FREITAS

**APLICAÇÃO FOLIAR DE PROLINA COMO MEIO DE MINORAR OS EFEITOS
DO ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE MILHO**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: *Prof. Dr. Enéas Gomes Filho*

FORTALEZA – CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- F937a Freitas, Paulo André Ferreira de.
Aplicação foliar de prolina como meio de minorar os efeitos do estresse salino em plantas de milho / Paulo André Ferreira de Freitas. – 2014.
109 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.
1. *Zea mays*. 2. Prolina. 3. Estresse oxidativo. 4. Estresse salino. I. Título.

CDD 574.192

PAULO ANDRE FERREIRA DE FREITAS

**APLICAÇÃO FOLIAR DE PROLINA COMO MEIO DE MINORAR OS EFEITOS
DO ESTRESSE SALINO EM PLANTAS DE MILHO**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

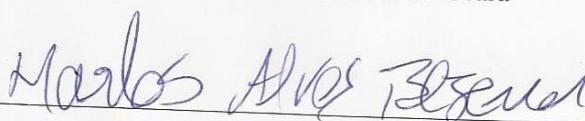
Aprovada em: 20/03/2013

BANCA EXAMINADORA



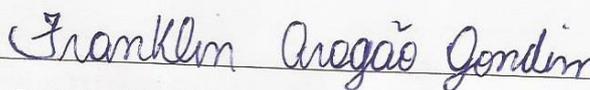
Prof. Dr. Eneas Gomes Filho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará



Prof. Dr. Marlos Alves Bezerra (Conselheiro)

EMBRAPA – CNPAT



Prof. Dr. Franklin Aragão Gondim (Conselheiro)

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará

FORTALEZA – CE

2013

***“O conhecimento é a única herança
deixada pelos homens”***

- José Edivan (meu pai)

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e discernimento para sempre prosseguir.

Aos meus pais, José Edivan Ferreira de Freitas e Teresinha Ferreira de Freitas, por acreditarem em meu potencial e pelo incentivo que desde sempre a mim foi dado. Obrigado pelo amor e carinho.

À Universidade Federal do Ceará, representado pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo apoio à realização deste curso.

Ao professor Dr. Enéas Gomes Filho pela inestimável oportunidade de orientação, pela confiança e pela disponibilidade atribuída para minha formação acadêmica. O professor é o meu exemplo de cientista e de profissional.

Aos professores Dr. Marlos Alves Bezerra e Dr. Franklin Aragão Gondim pela participação da banca examinadora e pelas valiosas sugestões dadas para melhoria do trabalho.

Aos amigos, Daniel Farias e Michelle Andrade pelo companheirismo e cumplicidade que tornaram esse período mais agradável e prazeroso.

Ao Msc. Rafael Miranda pela contribuição teórico/científica na condução dos experimentos e ao Dr. Elton Camelo Marques pela revisão do artigo gerado desta dissertação.

Aos amigos dos Laboratórios de Fisiologia Vegetal I e II: *Alexcyane Feijão, Carlos Eduardo Abreu, Cibelle Gadelha, Elaine Angelim, Evaldo Heber, Franklin Aragão, Gyedre Araújo, Irinaldo Nascimento, Ian Valença, Prof. Joaquim Enéas, Jones Vidal, Lineker Lopes, Luckas Huriel, Lílian Silva, Liliane Silva, Nara Lídia, Nathália Amaral, Stelamaris Paula, Thiago Augusto, Valdinéia Soares, Victor Castro, Viviane Ruppenthal* pela vivência e pela ajuda direta ou indireta.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTSal).

RESUMO

O presente trabalho, teve por objetivo avaliar a influência da aplicação foliar de prolina no crescimento e desenvolvimento das plantas de milho, sob condições de salinidade, analisando as alterações fisiológicas e bioquímicas envolvidas. Foram utilizadas sementes de milho (*Zea mays*), genótipo BR 205, sendo realizados dois experimentos em casa de vegetação. No primeiro, foram avaliadas as respostas fisiológicas e bioquímicas em plantas de milho, sob condições de salinidade e submetidas à aplicação foliar de prolina. Para isso, plantas de milho com 10 dias de idade crescendo em baldes plásticos individuais de 10 L, contendo solução nutritiva de Clark, foram distribuídas em quatro tratamentos: 1. plantas crescendo em solução nutritiva e pulverizadas nas folhas com água destilada; 2. plantas crescendo em solução nutritiva e pulverizadas nas folhas com prolina a 30 mM; 3. plantas crescendo em solução nutritiva contendo NaCl a 80 mM e pulverizadas nas folhas com água destilada; e 4. plantas crescendo em solução nutritiva contendo NaCl a 80 mM e pulverizadas nas folhas com prolina a 30 mM. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois níveis de prolina (0 ou 30 mM), dois níveis de salinidade (0 ou 80 mM de NaCl) e dois tempos de coleta (plantas com 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos.), com seis repetições. Nesse experimento, foram coletadas plantas aos 7 e 14 dias após a imposição dos tratamentos, sendo as plantas separadas em folhas, colmos + bainha e raízes. Foram analisadas: as massas secas da parte aérea, raízes e da planta inteira; a área foliar; os teores de solutos inorgânicos (Na^+ , K^+ e Cl^-) e orgânicos (carboidratos solúveis, proteínas solúveis, N-aminossolúveis e prolina). Como resultado, observou-se que a aplicação foliar de prolina, por si só, não causou efeito no crescimento das plantas de milho. Entretanto, em condições salinas, tal tratamento foi eficaz em minorar a redução no crescimento pela salinidade. Isso se deveu, em parte, pelo menor acúmulo de íons tóxicos (Na^+ e Cl^-), principalmente na parte aérea, aliado a uma menor redução na relação K^+/Na^+ das plantas tratadas com prolina exógena. O tratamento com prolina reverteu à redução nos teores de proteínas solúveis pela salinidade, na parte aérea, enquanto nas raízes esses teores foram aumentados a níveis maiores do que os dos próprios controles. Os teores de carboidratos solúveis e de prolina foram alterados de formas diferentes pelo tratamento com prolina, dependendo do órgão analisado. O segundo experimento foi realizado em condições semelhantes às do primeiro e seguindo-se os mesmos tratamentos e delineamento experimental. Ele teve como finalidade avaliar os

efeitos da aplicação foliar de prolina a 30 mM nas trocas gasosas, nos teores de malondialdeído e de H_2O_2 , e nas atividades das enzimas do sistema de proteção oxidativa e do metabolismo da prolina, em folhas e raízes de plantas de milho sob condições de salinidade. A salinidade reduziu as trocas gasosas e a prolina exógena não provocou alterações nesses parâmetros, exceto por uma pequena elevação na taxa de transpiração. Nas folhas e raízes, a salinidade aumentou os teores de H_2O_2 e de malondialdeído, sendo ambos os efeitos parcialmente reduzidos pela aplicação foliar de prolina nas plantas de milho. Esse tratamento aumentou as atividades das enzimas dismutase do superóxido e catalase, especialmente dessa última nas folhas, tendo revertido sua redução em atividade pela salinidade e, possivelmente, isso pode ter contribuído para a redução dos teores de H_2O_2 e de malondialdeído, que é um indicador confiável de danos de membrana. Por outro lado, no estudo sobre as enzimas do metabolismo da prolina, observou-se, nas folhas, que a atividade da sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5CS), enzima da via de síntese da prolina, teve sua atividade aumentada pela salinidade, porém o tratamento com prolina exógena reduziu fortemente sua atividade aos 14 dias de tratamento. Já a prolina desidrogenase (PDH), enzima da via catabólica da prolina, foi fortemente estimulada pela prolina exógena, em condições controle ou de estresse salino, fato que sugere que essa enzima é induzida pelo excesso de prolina nos tecidos. O papel dessas enzimas nos níveis de prolina dos tecidos não pôde ser claramente estabelecido, desde que o padrão de resposta em suas atividades pelo tratamento com prolina exógena não foi consistente entre os dois tempos de coleta das plantas de milho.

Palavras-chave: Salinidade, *Zea mays*, Crescimento, Aplicação exógena, Metabolismo da prolina, Estresse oxidativo e salino.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the influence of foliar application of proline in growth and development of maize plants under saline conditions, analyzing physiological and biochemical alterations involved. Seeds of maize (*Zea mays*) genotype BR 205, being carried two experiments in greenhouse. At first experiment, we evaluated the physiological and biochemical responses in maize plants under saline conditions and subjected to foliar application of proline. For this, the maize plants with 10 days old growing in individual buckets with 10 L, containing nutrient solution of Clark. Four treatments were conducted: 1. plants growing in nutrient solution and leaves sprayed with distilled water, 2. plants growing in nutrient solution and leaves sprayed with 30 mM proline 3. plants growing in nutrient solution containing 80 mM of NaCl and leaves sprayed with distilled water, and 4. plants growing in nutrient solution containing 80 mM NaCl and leaves sprayed with 30 mM proline. The experimental design was completely randomized, with two levels of proline (0 or 30 mM), two levels of salinity (0 or 80 mM NaCl) and two harvest times (plants 7 and 14 days after treatment application.) with six replications. In this experiment, plants were collected at 7 and 14 days after the imposition of the treatments, the plants were separated into leaves, stems and sheath and roots. Were analyzed: dried weight of shoots, roots and whole plant, leaf area, concentrations of inorganic solutes (Na^+ , K^+ and Cl^-) and organic (soluble carbohydrates, soluble proteins, N-aminosolubles and proline). As result, it was found that the foliar application of proline itself had no effect on the growth of maize plants. However, in saline conditions, such treatment was effective in alleviating the reduction in growth by salinity. This was due, in part, by lower accumulation of toxic ions (Na^+ and Cl^-), mainly in shoot, combined with a smaller reduction in K^+/Na^+ plants treated with exogenous proline. Treatment with proline reversed the reduction in soluble protein content by salinity in shoots, roots while these levels were increased to levels higher than those of the controls themselves. The soluble carbohydrates and proline have been changed in different ways by treatment with proline, depending on the organ examined. The second experiment was conducted under similar conditions to the first and following the same treatments and experimental design. The objective was to evaluate the effect of foliar application of proline 30 mM in gas exchange, the levels of malondialdehyde and H_2O_2 , and the activities of protection enzyme system and oxidative metabolism of proline in leaves and roots of maize plants under saline conditions. Salinity reduced gas exchange and exogenous proline caused no changes in these parameters, except for a small increase in the rate of transpiration. In

leaves and roots, salinity increased the levels of H₂O₂ and malondialdehyde, both effects being partially reduced by foliar application of proline in maize plants. This treatment increased the activities of the enzymes superoxide dismutase and catalase, this last especially in leaves, having reversed its reduction in activity by salinity and possibly this may have contributed to the reduction of the levels of H₂O₂ and malondialdehyde, an indicator reliable membrane damage. Moreover, the study on the enzymes of the metabolism of proline was observed in leaves, which activity Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS), enzyme of proline anabolic pathway, had increased his activity by salinity, but the treatment with exogenous proline strongly reduced its activity after 14 days of treatment. Already proline dehydrogenase (PDH), the enzyme proline catabolic pathway, was strongly stimulated by exogenous proline, under control or salt stress, which suggests that this enzyme is induced by excess proline in tissues. The role of these enzymes in tissue levels of proline could not be clearly established, since the response pattern in their activities by treatment with exogenous proline was not consistent between the two harvest times for maize.

Keywords: Salinity, *Zea mays*, Growth, Exogenous application, proline metabolism, oxidative e saline stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo proposto para o metabolismo de prolina em plantas superiores. Os dados, em sua maioria, foram obtidos de estudos em <i>Arabidopsis</i> , mas também podem ser válidos para outras espécies.....	25
Figura 2. Regulação das enzimas do metabolismo da prolina sob condições de salinidade.....	28
Figura 3: Visão geral do experimento mostrando as plantas de milho em copos plásticos e em bacias sob condições hidropônicas em casa de vegetação.....	34
Figura 4. Massas secas da parte aérea, das raízes e total de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	47
Figura 5. Área foliar de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	49
Figura 6. Teores de Na ⁺ nas folhas, colmos + bainha e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	51
Figura 7. Teores de K ⁺ nas folhas, colmos + bainhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	54
Figura 8. Relação K ⁺ /Na ⁺ nas folhas, colmos + bainhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	56
Figura 9. Teores de Cl ⁻ nas folhas, colmos + bainha e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	59

Figura 10. Teores de carboidratos nas folhas, colmos + bainhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	61
Figura 11. Teores de proteínas nas folhas, colmos + bainhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	63
Figura 12. Teores de N-aminossolúveis nas folhas, colmos + bainhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	66
Figura 13. Teores de prolina nas folhas, colmos + bainhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	68
Figura 14. Fotossíntese, condutância estomática, Taxa de transpiração e CO ₂ interno de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	70
Figura 15. Teores de peróxido de hidrogênio em folhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	72
Figura 16. Teores de malondialdeído em folhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	74
Figura 17. Atividade da sintetase da pirrolina-5-carboxilato em folhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal	

após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	76
Figura 18. Atividade da desidrogenase da prolina em folhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	79
Figura 19. Atividade da dismutase do superóxido em folhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	81
Figura 20. Atividade da catalase em folhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	83
Figura 21. Atividade da peroxidase do ascorbato em folhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	85
Figura 22. Atividade da peroxidase do guaiacol em folhas e raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência e na presença de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência e presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	87

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Justificativa.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Os estresses ambientais.....	18
2.2. Salinização dos solos.....	19
2.3. Efeitos da salinidade nas plantas.....	20
2.4. Tolerancia das plantas à salinidade.....	21
2.5. Respostas das plantas à salinidade.....	22
2.5.1. Ajustamento osmótico e produção de substâncias osmoprotetoras.....	22
2.5.2. Sistema antioxidativo de defesa.....	23
2.6. Características da prolina e biossíntese.....	24
2.7. Acúmulo de prolina e seus efeitos durante os estresses abióticos.....	26
2.8. Regulação do metabolismo da prolina durante o estresse.....	26
2.9. Tratamento das plantas com prolina.....	28
2.10. Importância da cultura do milho.....	29
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Gerais.....	32
3.2. Específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Experimento I – Crescimento e acúmulo de solutos inorgânicos e orgânicos em plantas de milho em condições de salinidade e submetidas à aplicação foliar de prolina.....	33
4.1.1. Condições do experimento e tratamentos.....	33
4.1.2. Coleta do material e análise de crescimento.....	35
4.1.3. Determinação de solutos inorgânicos.....	36
4.1.4. Determinação de solutos orgânicos.....	36
4.1.4.1. Preparação dos extratos.....	36
4.1.4.2. Proteínas solúveis.....	37
4.1.4.3. Carboidratos Solúveis.....	37
4.1.4.4. N-aminossolúveis.....	38
4.1.4.5. Prolina.....	38

4.1.5. Delineamento experimental.....	39
4.2. Experimento II –Trocas gasosas, estresse oxidativo e atividades de enzimas de proteção oxidativa e do metabolismo da prolina em plantas de milho sob condições de salinidade e submetidas à aplicação foliar de prolina.	39
4.2.1.Trocas gasosas.....	40
4.2.2. Teores de peróxido de hidrogênio.....	40
4.2.3. Teores de malondialdeído.....	41
4.2.4. Enzimas do metabolismo da prolina.....	41
4.2.4.1. Preparação dos extratos.....	41
4.2.4.2.Sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato.....	42
4.2.4.3.Desidrogenase da prolina.....	42
4.2.5. Delineamento experimental.....	43
4.2.6. Enzimas do metabolismo de proteção oxidativa.....	43
4.2.6.1. Preparação dos extratos.....	43
4.2.6.2.Dismutase do superóxido.....	43
4.2.6.3.Catalase.....	44
4.2.6.4. Peroxidase do ascorbato.....	44
4.2.6.5.Peroxidase do guaiacol.....	45
4.2.7. Delineamento experimental.....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1. Experimento I - Crescimento e acúmulo de solutos inorgânicos e orgânicos em plantas de milho em condições de salinidade e submetidas à aplicação foliar de prolina.....	46
5.1.1. Crescimento das plantas.....	46
5.1.2. Solutos inorgânicos.....	50
5.1.3. Solutos Orgânicos.....	60
5.1.3.1. Carboidratos solúveis.....	60
5.1.3.2. Proteínas solúveis.....	62
5.1.3.3. N-aminossolúveis.....	65
5.1.3.4. Prolina.....	67
5.2. Experimento II –Trocas gasosas, estresse oxidativo e atividade de enzimas de proteção oxidativa e dometabolismo da prolina em plantas de	

milho sob condições de salinidade e submetidas à aplicação foliar de prolina.	69
5.2.1. Trocas Gasosas.....	69
5.2.2. Teores de peróxido de hidrogênio.....	71
5.2.3. Teores de malondialdeído.....	73
5.2.4. Enzimas do metabolismo da prolina.....	75
5.2.4.1. Atividade da sintetase da Δ1-pirrolina-5-carboxilato.....	75
5.2.4.2. Atividade da desidrogenase da prolina.....	78
5.2.5. Enzimas de proteção oxidativa.....	80
5.2.5.1. Atividade da dismutase do superóxido.....	80
5.2.5.2. Atividade da catalase.....	82
5.2.5.3. Atividade da peroxidase do ascorbato.....	84
5.2.5.4. Atividade da peroxidase do guaiacol.....	86
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
7. CONCLUSÕES.....	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. Justificativa

A salinidade é ainda um dos mais importantes estresses abióticos em regiões áridas e semiáridas, onde o conteúdo de sais no solo é naturalmente elevado e a precipitação pode ser insuficiente para lixiviação dos mesmos (ZHAO; MA; REN, 2007). Segundo estimativas da FAO, aproximadamente 50% dos 250 milhões de hectares irrigados do mundo já apresentavam problemas de salinização e saturação do solo, sendo que 10 milhões de hectares eram abandonados anualmente em virtude desses problemas (FAO, 2006).

Embora as informações sobre as áreas salinizadas no Brasil não sejam bem precisas, estima-se que 20 a 25% das áreas irrigadas perto de rios e riachos intermitentes enfrentem a salinidade, aliados ou não à deficiências de drenagem (SILVA, 1997). Esses problemas se devem ao manejo inadequado do solo e da água, associado às elevadas taxas de evapotranspiração e baixas precipitações pluviométricas, características dessa região (BARROS *et al.*, 2004). Apesar das terras irrigadas corresponderem a apenas 15% da área mundial agricultável, essas apresentam produtividade duas vezes superior às da condição de seqüestro, e são responsáveis por um terço da produção mundial de alimentos (MUNNS, 2005). No Nordeste do Brasil, os solos são bastante diversificados, sendo comuns, na região semiárida, solos em avançado processo de salinização e impróprios para o cultivo da maioria das culturas. Os perímetros irrigados no Nordeste do Brasil correspondem aproximadamente a 23.000 hectares e 25% já estão afetados por sais (FAO, 2006). Dentre as culturas exploradas na região do Nordeste brasileiro, o milho ocupa posição destacada em relação à área cultivada na zona semiárida. Ele é considerado uma espécie moderadamente sensível à salinidade e sofre redução progressiva do crescimento, que se reflete na perda de produção com o aumento da concentração de sais no meio radicular. Blanco *et al.* (1999) verificaram que a emergência

do milho foi afetada quando a salinidade da água de irrigação tinha condutividade elétrica superior a $1,65 \text{ dS m}^{-1}$, mas a produção de matéria seca das plântulas só foi afetado para condutividades elétricas acima de $3,08 \text{ dS m}^{-1}$.

Para minimização dos problemas de salinização do solo algumas estratégias podem ser aplicadas. Podem-se adotar práticas adequadas de manejo do solo, para reduzir ao máximo a salinidade sobre as plantas, ou seja, melhorar o solo para atender a tolerância das plantas ou selecionar criteriosamente as culturas ou cultivares que possam produzir satisfatoriamente sob condições de salinidade. Também é possível melhorar geneticamente as plantas, visando sua adaptação aos sais (WANG *et al.*, 2011) muito embora existam poucos programas de melhoramento no Brasil e no mundo voltados a obtenção de variedades resistentes (SILVEIRA *et al.*, 2010). Outra opção compreende a realização de melhorias nos projetos de irrigação e drenagem, o que pode significar elevados custos para sua execução.

Com os avanços da engenharia genética, os estudos atuais têm se concentrado na inserção de genes que conferem tolerância às plantas. Os estudos de expressão de genes e clonagem de plantas têm se tornado ferramentas padrão nos estudos da bioquímica e fisiologia do estresse (SAIRAM; TYAGI, 2004). A compreensão dos mecanismos que regulam a expressão dos genes e o uso da tecnologia do DNA recombinante em plantas pode ajudar na produção de plantas tolerantes ao ambiente que se encontram.

A exposição prévia de um indivíduo a um determinado tipo de estresse provoca mudanças metabólicas, que são responsáveis pelo aumento de tolerância a uma nova exposição a esse estresse (NEILL *et al.* 2002). Para tal, as plantas desenvolveram mecanismos de sobrevivência e adaptações físicas, moleculares e respostas celulares, durante a exposição ao estresse. Dentre as respostas metabólicas envolvidas na aclimação ao estresse, o acúmulo

de prolina vem sendo bastante documentado (ASHRAF; HARRIS, 2005; MANE, *et al.*, 2011).

Em plantas de milho, a aplicação de prolina tem se mostrado eficaz em diminuir os efeitos causados por diversos tipos de estresse (ALI; ASHRAF; SHAHBAZ, 2008). Entretanto, fazem-se necessários estudos mais completos que busquem ampliar a informação sobre a influência da prolina exógena em sistemas vegetais.

Dada à importância do milho no contexto econômico e social do Brasil e considerando os possíveis efeitos benéficos da prolina exógena em plantas, torna-se relevante o estudo sobre as alterações fisiológicas e bioquímicas resultantes do tratamento de plantas de milho com esse iminoácido.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Os estresses ambientais

Pode-se considerar como estresse qualquer alteração fisiológica causada por fatores abióticos que tendem a alterar o equilíbrio dos organismos vivos, ou seja, estresse é conceituado como um desvio das condições ótimas e que induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais podem ou não ser minimizadas (CHENG; JIANG, 2010). As plantas cultiváveis, mesmo em condições naturais e agricultáveis, estão frequentemente expostas às condições de múltiplos estresses ambientais, que afetam de maneira negativa o crescimento, o metabolismo e a produtividade das plantas. Os estresses são de diversas origens, sendo os de seca, salinidade, baixas e altas temperaturas, inundação, poluentes e radiação os mais importantes no sentido de limitarem a produção das culturas (CRAMER *et al.*, 2011).

Os estresses podem se manifestar em níveis variados de severidade, de acordo com a duração em que a planta é exposta, podendo ser combinados ou não, de modo contínuo ou alternado (TESTER; BACIC, 2005). No que concerne às plantas, a intensidade do estresse vai depender do órgão ou do tecido alvo, do estágio de desenvolvimento da planta e do genótipo em questão. Levando-se em consideração esses fatores, o organismo vegetal pode demonstrar tolerância, prosseguindo seu desenvolvimento, ainda que em menores taxas, ou pode manifestar sensibilidade, dependendo da intensidade do estresse, podendo chegar à morte (DJILIANOV *et al.*, 2005).

O conhecimento sobre os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares pelos quais as plantas toleram os estresses ambientais é importante para as abordagens atuais de engenharia genética, objetivando melhorar o desempenho das culturas sob estresse. Ao

averiguar as plantas em condições de estresse, podemos aprender sobre a plasticidade das vias metabólicas e os limites para o seu funcionamento.

2.2. Salinização dos solos

Solos salinos ou salinizados são comuns em regiões áridas e semiáridas. Um solo é considerado salino quando apresenta condutividade elétrica do extrato de saturação do solo igual ou superior a $4,0 \text{ dS m}^{-1}$, ou aproximadamente 40 mM de NaCl (RICHARDS, 1954), muito embora a maioria das plantas cultiváveis sejam susceptíveis à salinidade quando o extrato de saturação do solo apresenta valor até menores que $3,0 \text{ dS m}^{-1}$ (CHINNUASAMY; JAGENDORF; ZHU, 2005).

Sais no solo ocorrem na forma iônica, sendo Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} os cátions mais comuns associados com a salinidade, enquanto que os ânions mais comuns são Cl^- , SO_4^{2-} e HCO_3^- (LAUCHLI; LUTTGE, 2002). Diversos estudos se baseiam na toxicidade dos íons Na^+ e Cl^- sendo, portanto, considerados os íons mais importantes (HASEGAWA *et al.*, 2000). Os eventos de salinização dos solos podem ser de origem natural ou antrópica, sendo exemplos clássicos a intemperização química dos minerais e rochas, a destruição da vegetação nativa, o uso de fertilizantes em excesso, a penetração da água do mar no continente, atingindo o lençol freático, o nível superficial do lençol freático e o manejo inadequado do solo e da água (CHENG; JIANG, 2010).

Quando a precipitação pluviométrica é insuficiente para lixiviação dos íons, os sais se acumulam no solo, resultando em salinidade. Os solos salinos apresentam como características baixa permeabilidade e condutividade hidráulica e instabilidade dos agregados do solo (METTERNICHT; ZINCK, 2003). A acumulação de sais na rizosfera prejudica o crescimento e desenvolvimento das culturas, provocando uma diminuição da produtividade e

comprometendo a produção agrícola. Isto ocorre em razão da diminuição do potencial osmótico da solução do solo, prejudicando a absorção de água além de efeitos tóxicos dos íons absorvidos, ou pelas alterações das condições físicas e químicas do solo (ASHRAF; FOOLAD, 2007).

2.3. Efeitos da salinidade nas plantas

O estresse salino é um dos grandes problemas da agricultura enfrentados não só nas regiões semiáridas do Brasil, mas, também, em muitas outras regiões do mundo (FAO, 2006). A maioria das espécies vegetais submetidas à salinidade tem o crescimento reduzido, afetando sua produtividade (KRONZUCKER; BRITTO, 2011).

Desde o primeiro contato com o sal, a planta começa a desenvolver uma cascata de sinalização, iniciando eventos celulares que envolvem desidratação e plasmólise. Tendo em vista que as células começam a perder a capacidade de alongação, diminuindo a taxa de divisão celular, o que conduz a uma restrição do crescimento de folhas e raízes. Esses danos poderão ser sentidos nos estádios de desenvolvimentos posteriores, culminando em um crescimento reduzido ou, até mesmo, em uma eventual morte (LAUCHLI; GRATAN, 2007).

As consequências da salinidade se manifestam na planta tanto no âmbito fisiológico e bioquímico (MUNNS; TESTER, 2008), como no molecular (SAHI *et al.*, 2006). Segundo Munns e Tester (2008) resposta à salinidade pode ocorrer em duas fases. Inicialmente, a planta sofre com efeitos osmóticos os quais refletem principalmente na redução da taxa de crescimento da parte aérea devido ao acúmulo de sais na raiz, levando a uma redução na taxa de crescimento. Em seguida ocorre uma resposta íon-específica que inclui danos na permeabilidade das membranas celulares e de organelas citoplasmáticas; o desequilíbrio metabólico nos processos fotossintético e respiratório; as alterações no metabolismo dos

aminoácidos, das proteínas e dos ácidos nucléicos; as alterações nas atividades enzimáticas; e na ação de fito-hormônios (WILLADINO; CÂMARA, 2005).

2.4. Tolerância das plantas à salinidade

As plantas são classificadas de acordo com sua tolerância à salinidade em glicófitas e halófitas. As glicófitas não conseguem se desenvolver plenamente quando cultivadas em elevadas concentrações de sais (principalmente NaCl), ou seja, são sensíveis à salinidade. Em contrapartida, as halófitas conseguem se desenvolver normalmente em concentrações mais elevadas de sais, ou seja, são tolerantes à salinidade (LAUCHLI; GRATAN, 2007). A maioria das glicófitas apresenta seu crescimento reduzido quando a concentração de sais é maior que 10 mM, enquanto que as halófitas crescem em ambientes nos quais a concentração salina varia de 50 a 500 mM (ORCUTT; NILSEN, 2000).

Pesquisa recentes estabeleceram que a maioria das halófitas e glicófitas conseguem tolerar a salinidade por estratégias bastante semelhantes, muitas vezes usando processos táticos análogos (YOKOI; BRESSAN; HASEGAWA, 2002). Durante as fases iniciais do estresse salino, mecanismos de aclimação necessários para a sobrevivência são ativados tanto nas glicófitas quanto nas halófitas. Contudo, esses mecanismos nas halófitas parecem responder de maneira mais eficiente e rápida. Essas mudanças incluem a ativação ou repressão de genes envolvidos nos mecanismos de transporte de íons sódio, a partir do citoplasma para o apoplasto ou vacúolo, e a produção de solutos compatíveis a fim de que seja restaurada, em parte, a homeostase iônica e osmótica (ZAKHARIN; PANICHKIN, 2009).

2.5. Respostas das plantas à salinidade

2.5.1. Ajustamento osmótico e produção de substâncias osmoprotetoras

As plantas são capazes de se aclimatarem a condições de estresse pela acumulação de solutos orgânicos ou controlando os movimentos de íons permitindo elevadas concentrações intracelulares. O ajuste osmótico é um importante traço que minimiza a desidratação em ambientes cuja disponibilidade de água é limitada, uma vez que mantém a turgescência celular e processos fisiológicos (TURNER *et al.*, 2007).

Solutos orgânicos e íons inorgânicos desempenham um papel crucial no ajustamento osmótico, o qual depende da severidade do estresse salino, do tipo de sal aplicado, do conteúdo e contribuição relativa de cada íon, das espécies e cultivares ou mesmo de tecidos diferentes da mesma planta (MANE *et al.*, 2011). Os íons inorgânicos componentes do ajuste osmótico são principalmente Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- . O ajustamento osmótico é alcançado pela compartimentalização dos íons tóxicos nos vacúolos (principalmente Na^+ e Cl^-), diminuindo assim os efeitos citotóxicos (BLUMWALD *et al.*, 2000). Se quantidades excessivas desses íons não forem devidamente compartimentalizadas no vacúolo, pode haver reduções, por exemplo, na atividade fotossintética, e na ação de enzimas citosólicas, o que pode levar à morte celular (SHABALA, 2000).

Para obter um equilíbrio iônico com os vacúolos, o citosol acumula compostos de baixa massa molecular, designados por solutos compatíveis, os quais não interferem nas reações bioquímicas normais (HUSSAIN *et al.*, 2009). A acumulação destes solutos em resposta ao estresse salino é um processo onipresente em organismos tão diversos como bactérias, plantas e animais (ASHRAF; HARRIS, 2005). No entanto, os solutos que se acumulam variam de acordo com o organismo e a espécie de planta. As principais categorias

de solutos orgânicos são açúcares simples (principalmente frutose e glucose), álcoois derivados de açúcares (glicerol e inosítois metilados) e açúcares complexos (trealose, rafinose e frutanas) (BOHNERT; SHEN, 1999). Outros solutos orgânicos importantes incluem: compostos quaternários de amônio (glicinabetaína, betaína β -alanina, prolina betaína), aminoácidos (como a prolina) e aminas terciárias (1,4,5,6-tetra-hidro-2-metil-4-carboxil pirimidina) (NUCCIO *et al.*, 1999). Esses solutos podem atuar como osmoprotetores, sendo responsáveis pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) aumentado ainda mais a defesa (PANG; WANG, 2008).

2.5.2. Sistema antioxidativo de defesa

O estresse salino induz a acumulação de ROS, as quais são prejudiciais para as células das plantas quando em concentrações elevadas, causando danos oxidativos a várias moléculas biológicas (PANG; WANG, 2008). As ROS fazem parte do metabolismo normal da planta, porém os desajustes metabólicos da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e cloroplastos, causados pelo excesso de sais, resultam numa produção excessiva delas. Nessas condições, o oxigênio molecular (O_2) é parcialmente reduzido, levando à formação dos radicais superóxidos ($\cdot O_2^-$) e hidroxil ($\cdot OH$), além do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MITTLER *et al.*, 2011). Essas ROS podem causar danos a moléculas biológicas, como proteínas e lipídios, provocando danos às membranas biológicas (ABOGADALLAH, 2010).

A proteção das células e compartimentos subcelulares dos efeitos citotóxicos das ROS se dá pela ativação de diversas enzimas dentre as quais se destacam a dismutase do superóxido (SOD), a peroxidase do ascorbato (APX), a catalase (CAT) e a peroxidase do guaiacol (GPX) (REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004). Além dessas enzimas, outras moléculas podem aliviar os danos oxidativos, tais como: flavonóides, ascorbato,

tocoferol, alcalóides, ácido ascórbico, carotenóides e poliaminas (LAWLOR; CORNIC, 2002).

2.6. Características da prolina e biossíntese

A prolina se diferencia dos demais aminoácidos protéicos, porque contem uma cadeia alifática com estrutura cíclica, o que é incomum, sendo na verdade um iminoácido. Seu grupo amino secundário (ou grupo imino) é mantido em uma conformação rígida a qual reduz a flexibilidade estrutural de proteínas, contendo prolina (NELSON; COX, 2011).

A biossíntese da prolina foi primeiramente descrita em bactérias (KISHOR *et al.*, 2005) e o modelo para a biossíntese em plantas é mostrado na figura 1. A principal via de síntese utiliza como precursor o glutamato, o qual é fosforilado a γ -glutamil fosfato e, então, este é convertido espontaneamente em glutamato- γ -semialdeído (GSA) pelas enzimas quinase da γ -glutamil e desidrogenase do glutamato- γ -semialdeído, respectivamente (ASHRAF; FOOLAD, 2007). Em plantas, as atividades dessas duas enzimas encontram-se em uma única molécula, a qual possui atividade combinada, e é chamada de sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5CS), que utiliza ATP bem como NAD(P)H como poder redutor. O GSA formado, imediatamente sofre ciclização espontânea originando a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C). Finalmente, pela ação da enzima redutase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5CR), com o auxílio de NAD(P)H, a P5C é convertida em prolina, a qual pode ser utilizada para síntese protéica ou para outras funções metabólicas específicas. Em plantas, essa rota metabólica ocorre primordialmente no citosol ou no cloroplasto (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). A prolina ainda pode ser produzida por uma via alternativa que utiliza a ornitina como precursor. Na mitocôndria, a enzima ornitina- δ -aminotranferase converte ornitina e o α -cetoglutarato em P5C e glutamato por transaminação (STNINSKA *et al.*, 2008).

Nas plantas e em outros eucariotos, a degradação da prolina ocorre na mitocôndria, sendo espacialmente separada da via biossintética. A prolina oriunda da biossintese citoplasmática ou plastidial é catabolizada na mitocôndria graças à ação de um antiporte glutamato/prolina, que possibilita sua entrada nessa organela. Dentro da mitocôndria, a prolina é oxidada até P5C, pela enzima desidrogenase da prolina (PDH), também conhecida como prolina oxidase, a qual tem como cofator uma molécula de FAD. Essa enzima é encontrada ligada à membrana interna da mitocôndria. A P5C é, por sua vez, convertida a glutamato pela desidrogenase da P5C (P5CDH) requerendo uma molécula de NAD^+ . Os cofatores utilizados nessa via catabólica são aproveitados da cadeia transportadora de elétrons aumentando o *pool* de moléculas redutoras auxiliando no balanço de oxirredução celular (ASHRAF; FOOLAD,2007).

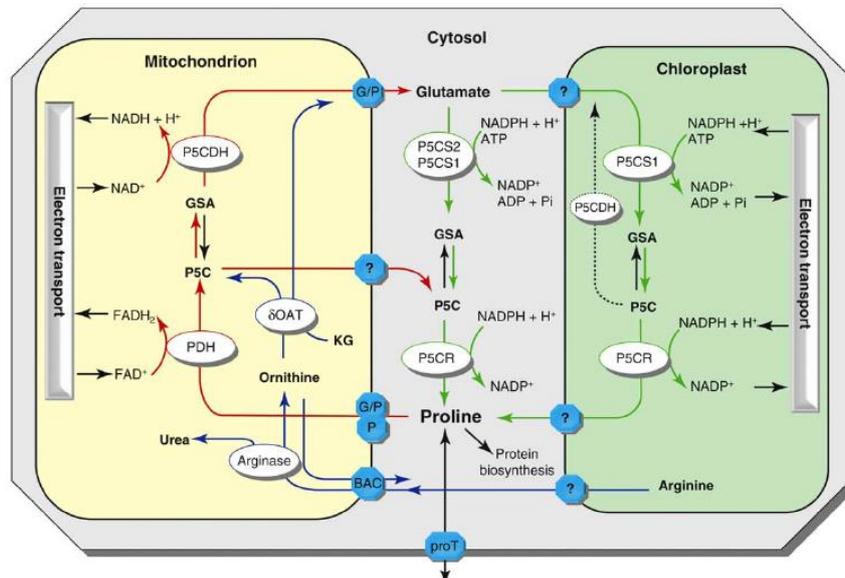


Figura 1. Modelo proposto para o metabolismo da prolina em plantas superiores. Os dados, em sua maioria, foram obtidos de estudos em *Arabidopsis*, mas também podem ser válidos para outras espécies (adaptado de Szabados *et al*, 2010).

2.7. Acúmulo de prolina e seus efeitos durante os estresses abióticos

A prolina, em condições de estresses abióticos, pode ser uma molécula chave de sinalização capaz de desencadear múltiplas respostas que fazem parte do processo de aclimatação. Estudos mostram que, o acúmulo de prolina, além de estar relacionado com o ajustamento osmótico pode: contribuir para a estabilização de membranas e proteínas; promover a eliminação de radicais livres; atuar na sinalização celular; participar do equilíbrio de oxirredução; e na indução da expressão de genes (ASHRAF; HARRIS, 2005).

Existe um grande interesse em melhorar plantas geneticamente a fim de compreender o metabolismo da prolina e os mecanismos intrínsecos que levam à minimização dos efeitos deletérios causados pelo estresse. Na última década, foram feitas tentativas para aumentar o nível de prolina em plantas por transferência de genes associados com sua biossíntese. Em plantas transgênicas com superexpressão de prolina, foram observadas maior tolerância à salinidade e melhor crescimento, sob condições de estresse salino (LEHMANN *et al.*, 2010; FALAKNAZ *et al.*, 2011). Kishor *et al.*, (2005) acreditam que diversos mutantes gerados ao longo dos anos, especialmente de *Arabidopsis thaliana*, irão proporcionar uma avaliação do papel exato da prolina durante o estresse salino.

2.8. Regulação do metabolismo da prolina durante o estresse

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos em *A. thaliana*, sendo a planta modelo mais estudada, principalmente por ter seu genoma relativamente pequeno e ter um ciclo de vida curto (SZÉKELY *et al.*, 2008). Em *A. thaliana* existem duas isoformas de P5CS, que desempenham papéis específicos no controle da biossíntese da prolina. A P5CS1 é sujeita à regulação por retroalimentação negativa por prolina (ZHANG; LU; VERMA, 1995). O gene dessa enzima é expresso, principalmente na parte aérea (PEREZ-ARELLANO *et al.*, 2010), e

sua transcrição é fortemente induzida em condições de alta salinidade, desidratação e baixas temperaturas (YOSHIBA *et al.*, 1997; HONG *et al.*, 2000; YAMADA *et al.*, 2005; BURRIT, 2012).

Em outras espécies de plantas a P5CS também é codificada por dois genes (MATTIOLI; CONSTANTINO; TROVATO, 2009; FALAKNAZ *et al.*, 2011), os quais codificam os domínios polipeptídicos. Os dois domínios enzimáticos da P5CS, codificados por seus genes, correspondem às proteínas ProB e ProA de *Escherichia coli*, que também são produzidas como polipeptídios, por exemplo, pelo gene tomPRO1 em tomate (FUJITA *et al.*, 1998) e pelo gene JcP5CS em *Jatropha curcas* L. (ZHUANG *et al.*, 2011).

Durante o desenvolvimento de *A. thaliana* na ausência de estresse, os níveis de prolina variam entre os órgãos. Altas concentrações de prolina são encontradas nos grãos de pólen, nas flores, nas sementes, nos frutos e, em baixos níveis, nas raízes (STINES *et al.*, 1999; HONG *et al.*, 2000). Os teores de prolina são também dependentes da idade da planta, da posição ou parte do tecido. Também, os níveis da enzima P5CS são correlacionados com o conteúdo de prolina nos diferentes órgãos (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; SILVA-ORTEGA *et al.*, 2009).

A expressão do gene da PDH (Figura 2) é diminuída quando as plantas são expostas a um baixo potencial hídrico ou a condições de salinidade (VERSLUES *et al.*, 2007; VERSLUES; SHARMA, 2010), mas a adição de prolina exógena eleva sua expressão (SATOH *et al.*, 2002). A menor expressão da PDH durante o estresse é amplamente aceita como um ponto de controle, que pode promover o acúmulo de prolina sob estresse (Figura 2). No entanto, uma superexpressão da PDH tem sido relatada, sob condições de estresse, quando níveis elevados de prolina são observados (KAPLAN *et al.*, 2007).

2.9. Tratamento das plantas com prolina

Alguns estudos mostram que a aplicação de prolina em plantas submetidas a estresses ambientais provoca um efeito preventivo ou de recuperação, entretanto, altas doses podem ser prejudiciais, causando efeitos inibitórios sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas e, mais especificamente, causando desbalanceamento metabólico (DEUSCHLE *et al.*, 2001;

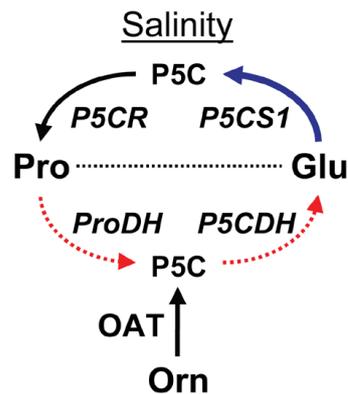


Figura 2. Regulação das enzimas do metabolismo da prolina sob condições de salinidade. As setas na cor preta indicam inexistência de elevação do nível de expressão basal. As setas na cor azul indicam expressão aumentada. As setas tracejadas na cor vermelha indicam diminuição na expressão (Adaptado de Versules e Sharma, 2010).

HARE *et al.*, 2003). De acordo com alguns autores, é primordial determinar a concentração adequada de prolina a ser aplicada para obtenção de efeitos benéficos às diferentes plantas. Por exemplo, Kumar e Sharma (1989), trabalhando com *Vigna radiata*, empregaram concentrações de prolina entre 22 e 30 mM no meio de crescimento e observaram mitigação dos efeitos deletérios provocados pelo estresse com NaCl, enquanto que concentrações de 50 mM (ou superiores) tiveram efeito inibitório, tanto em plantas estressadas quanto em condições controle. Há registros na literatura que mostram que a aplicação de prolina em concentrações muito baixas, já mostram efeitos benéficos. Por exemplo, Yan *et al.* (2011), utilizando prolina na concentração de 0,2 mM na solução nutritiva de plantas de meloeiro,

conseguiram minimizar os efeitos deletérios da salinidade. As concentrações mais comuns nos estudos sobre o uso de prolina exógena ficam na faixa de 1 a 20 mM, sendo as plantas submetidas a diferentes níveis de estresse.

Existem três formas de tratamento com prolina exógena: 1 – Aplicando-se a solução de prolina diretamente no meio nutritivo; 2 – Aspergindo-se a solução de prolina nas folhas, juntamente com um composto que facilite sua penetração, como Tween 20 ou Triton X-100; 3 – Pré-tratando-se as sementes com a solução de prolina. As diferentes formas de aplicação podem resultar em benéficos para as plantas, e há evidências indiretas de transportadores de prolina em diferentes órgãos das plantas (DELAUNEY *et al.*, 1993). Embora a via biossintética da prolina esteja bem caracterizada em plantas, sua captação pelas folhas e/ou raízes, e o seu transporte ainda não são bem compreendidos.

2.10. Importância da cultura do milho

Segundo estudos genéticos e filogenéticos, o milho é uma planta com origem no continente americano. Mais precisamente, há indícios que sua origem tenha sido no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos. O cultivo do milho é uma prática antiga, e vestígios arqueológicos e geológicos apontam que seu cultivo date de pelo menos 5.000 anos (BISPO, 2007).

O milho pertence à ordem Gramineae, família Graminaceae, subfamília Panicoideae, tribo Maydeae, gênero *Zea*, espécie *Zea mays* L. Em virtude de ser um cereal rico em energia, o milho é utilizado na alimentação humana e animal. Segundo Rostagno *et al.* (2005), o milho é composto principalmente por amido (62,48%) abundante em amilopectina, a qual é de mais fácil digestão pelos animais. Além do amido, o milho é fonte de aminoácidos como a metionina e a cisteína, fibras e lipídios (ROSTAGNO, *et al.*, 2005; PAES *et al.*, 2006).

O uso do milho em grão, como alimentação animal, representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70%, no mundo. Dados mostram que, nos Estados Unidos, cerca de 50% da produção de milho é destinada à ração animal, enquanto que no Brasil esse valor se situa entre 60 a 80%, dependendo da fonte da estimativa e do ano (PAES *et al.*, 2006). Muito embora a produção de milho não seja majoritariamente para o uso humano, em regiões de baixa renda, o milho constitui fator importante na nutrição dessas populações. No Brasil, é a matéria-prima de vários pratos da culinária típica brasileira, como canjica, cuscuz, polenta, angu, mingaus, cremes, bolos, pipocas ou simplesmente milho cozido. Na indústria, pode ser usados como componente para a fabricação de rebuçados, biscoitos, pães, chocolates, geleias, sorvetes e maionese (DUARTE *et al.*, 2000).

A produção nacional do milho é relativamente dispersa no país. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, as maiores regiões produtoras são o Sul, com 37,2% da produção nacional e o Centro Oeste com 30,6% (MAPA, 2012). A grande diversidade genética adquirida por milhares de anos de domesticação, seleção e melhoramento, permite ao milho uma ampla adaptação ao solo e ao clima. Segundo Toppa e Brambilla (2011), desde a década de 80, a produtividade do milho vem decrescendo, chegando a índices de 700 kg/ha na região Nordeste, em contraste com níveis de produtividade que alcançam valores de 11.000 kg/ha na região Sudeste. Dados atuais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística mostram que é esperada uma produção recorde de 74,2 milhões de toneladas em duas safras (IBGE, 2013). Dos cultivares disponibilizados pela EMBRAPA, na safra 2012/13, estão disponíveis 263 cultivares convencionais e 216 cultivares transgênicos, sendo, portanto, 479 cultivares ao todo.

Vários estudos relacionam os efeitos deletérios induzidos pelo estresse salino no crescimento e desenvolvimento de plantas de milho. Katerji *et al.* (2003) considera o milho

como uma espécie moderadamente tolerante à salinidade, sofrendo, como tal, redução progressiva no crescimento com o aumento da concentração de sais no solo. Todavia, cultivares diferentes apresentam comportamentos distintos quando em condições salinas (ALI *et al.*, 2004; AZEVEDO-NETO *et al.*, 2004) o que possibilita a demanda por cultivares mais tolerantes e necessidade de estudo dos efeitos do estresse sobre a fisiologia e bioquímica da planta.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

O presente trabalho tem por objetivo geral avaliar a influência da aplicação foliar de prolina no crescimento e desenvolvimento de plantas de milho, sob condições de salinidade, analisando as alterações fisiológicas e bioquímicas envolvidas.

3.2. Específicos

Pretende-se, utilizando plantas de milho, sob condições controle ou de estresse salino, e submetidas ou não ao tratamento com prolina:

- Analisar o crescimento das plantas, através de medidas de área foliar e de massas secas da parte aérea e das raízes;
- Analisar os teores de proteínas solúveis, solutos orgânicos (carboidratos solúveis, N-aminossolúveis e prolina) e inorgânicos (Na^+ , K^+ e Cl^-) em folhas, colmos + bainhas e raízes;
- Analisar as trocas gasosas (condutância estomática, taxa fotossintética, taxa de transpiração e concentração interna de CO_2);
- Analisar os teores de malondialdeído e de peróxido de hidrogênio em folhas e raízes;
- Estudar a atividade das enzimas do metabolismo antioxidativo (dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase do guaiacol) em folhas e raízes;
- Estudar as enzimas do metabolismo da prolina (sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato e desidrogenase da prolina) em folhas e raízes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho, foram utilizadas sementes de milho (*Zea mays*), genótipo BR 205. Todos os experimentos foram conduzidos em condições de casa de vegetação pertencente ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil e as análises conduzidas nas dependências dos Laboratórios de Fisiologia Vegetal I e II do mesmo departamento. Foram realizados dois experimentos com o mesmo procedimento experimental, visando análises distintas.

4.1. Experimento I – Crescimento e acúmulo de solutos inorgânicos e orgânicos em plantas de milho em condições de salinidade e submetidos à aplicação foliar de prolina

4.1.1. Condições do experimento e tratamentos

O presente experimento teve como propósito apurar os efeitos do tratamento com prolina nas plantas de milho, analisando o crescimento e os teores de solutos orgânicos e inorgânicos, em condições controle e de salinidade. Para tal, as sementes de milho foram selecionadas e tratadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,7%, durante cerca de cinco minutos. Decorrido esse tempo, as sementes foram lavadas abundantemente com água destilada para a remoção do excesso do hipoclorito. Então, as sementes foram colocadas em copos de plástico (200 mL) contendo vermiculita umedecida com água destilada. As plantas em desenvolvimento foram irrigadas diariamente com água destilada por 7 dias e, depois, foram transferidas para bacias plásticas contendo 10 L de solução nutritiva de Clarck (CLARCK, 1975), onde permaneceram por dois dias para aclimação à condição hidropônica (Figura 3). Depois disso, as plantas foram transferidas individualmente para baldes contendo 6 L da mesma solução nutritiva, quando as plantas foram submetidas a quatro tratamentos: **1. controle/água:** aspersão foliar de 10 mL de água desionizada e sem adição de NaCl na



Figura 3: Visão geral do experimento mostrando as plantas de milho em copos plásticos e em bacias sob condições hidropônicas em casa de vegetação.

solução nutritiva; **2. controle/prolina:** aspersão foliar de 10 mL de prolina a 30 mM e sem adição de NaCl na solução nutritiva; **3. salino/água:** aspersão foliar de 10 mL de água desionizada e adição de NaCl a 80 mM na solução nutritiva; e **4. salino/prolina:** aspersão foliar de 10 mL de prolina 30 mM e adição de NaCl a 80 mM na solução nutritiva. Cada tratamento constou de seis repetições, cada uma correspondendo a uma planta no balde. As doses de NaCl e de prolina utilizadas foram determinadas em experimentos preliminares.

O NaCl foi adicionado em duas parcelas de 40 mM em dias consecutivos a fim de evitar o choque osmótico no sistema radicular. A penetração da prolina nas folhas foi facilitada pela adição de Tween 20 a 0,1% na solução de aspersão. As alíquotas contendo a prolina foram pulverizadas duas vezes ao dia, durante dois dias seguidos, sendo a primeira antes das 7 h e, a segunda, após as 17 h. Em cada aplicação, todo os 10 mL da solução contendo a prolina foi utilizada. A primeira aplicação de prolina foi concomitante com a adição da primeira parcela de NaCl, como sugerido por Ben Ahmed et al. (2011). A solução nutritiva foi aerada e seus níveis mantidos pela adição diária de água destilada, sendo o pH mantido próximo a 5,0. A solução nutritiva foi trocada a cada quatro dias.

Por todo o experimento, as médias de temperatura na casa de vegetação foram de $30,7 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $28,7 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, durante o dia e a noite, respectivamente, sendo a umidade relativa do ar igual $75 \pm 11\%$.

4.1.2. Coleta do material e análise de crescimento

Foram realizadas duas coletas, sendo a primeira aos 7 dias e a segunda aos 14 dias depois das quatro aplicações de prolina e com o NaCl a 80 mM. A cada coleta, o material foi separado em folhas, colmos + bainhas e raízes. A área foliar (AF) foi determinada com um integrador de área (LI – 3100 Area Meter, Li-Cor., Inc, Lincoln, Nebraska, USA.). Após essa

medição, todos os tecidos foram acondicionados a -25 °C, sendo em seguida liofilizados e pesados para a obtenção da massa seca (MS).

4.1.3. Determinação de solutos inorgânicos

Os extratos foram preparados a partir da homogeneização de 50 mg do material liofilizado com 5 mL de água desionizada, sob agitação constante, durante 1 h a 40 °C. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3.000 x g por 10 min, sendo o sobrenadante coletado e filtrado em papel de filtro, e armazenado a -25 °C até sua utilização.

A determinação dos teores de sódio e potássio foi realizada segundo Malavolta *et al.* (1989), utilizando-se um fotômetro de chama, sendo feita uma leitura para cada extrato. Para a determinação dos teores de cloreto, a 3,0 mL de extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL de solução formada pela mistura das soluções de $\text{Hg}(\text{SCN})_2$ a 13,2 mM, em metanol e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a 20,2%, em água desionizada na proporção 4:1 (v/v). A mistura foi agitada em vortex e depois deixada em repouso por 15 min. Decorrido esse tempo, foram feitas as leituras espectrofotométricas a 460 nm, sendo os teores de cloreto estimados utilizando-se uma curva padrão com NaCl (GAINES; PARKER; GASCHO, 1984). Os resultados de solutos inorgânicos foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS.

4.1.4. Determinação de solutos orgânicos

4.1.4.1. Preparação dos extratos

Cada extrato foi preparado a partir do pó liofilizado dos órgãos da planta. Homogeneizaram-se 30 mg de tecidos das folhas, colmos + bainhas ou raízes com 5 mL de etanol a 80% (v/v). O homogenato foi mantido a 75°C em banho-maria, durante 1h, com agitações a cada 15 min. Transcorrido esse tempo, a amostra foi centrifugada a 3.000 x g por 10 min a 4°C, e o sobrenadante coletado. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes,

partindo-se do precipitado restante, sob as condições já descritas, à exceção do tempo de extração, que foi reduzido para 30 min. Ao fim do processo, todos os sobrenadantes (contendo os solutos solúveis) coletados foram reunidos e tiveram seu volume completado para 25 mL com etanol a 80% (v/v), sendo, em seguida armazenados a -25°C até sua posterior utilização.

4.1.4.2. Proteínas solúveis

Os teores de proteínas solúveis foram determinados de acordo com o método descrito por Bradford (1976). Em tubos de ensaio, foi adicionado a 100 µL de extrato, convenientemente diluído, 1,0 mL da solução contendo o reagente Comassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Company). Essa solução foi preparada dissolvendo-se 100 mg do reagente em 50 mL de etanol a 95%, acrescida de 100 mL de ácido fosfórico a 85%, sendo o volume final completado para 1.000 mL com água desionizada. As proteínas solúveis foram estimadas por medida espectrofotométrica a 595 nm, utilizando-se como branco a mistura de 100 µL de água desionizada com 1 mL do reagente de Comassie. Os teores de proteína foram estimados através de uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

4.1.4.3. Carboidratos solúveis

Os teores de carboidratos solúveis foram determinados de acordo com o método descrito por Dubois *et al.* (1956). Em tubos de ensaio, foram adicionados 500 µL do extrato convenientemente diluído e, em seguida, 500 µL de fenol a 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 20 min até seu resfriamento. Decorrido esse tempo, a quantificação de carboidratos solúveis foi feita por medidas de absorvância a 490 nm. Como branco, foi utilizada água desionizada no lugar do extrato acrescido dos demais reagentes. Os teores de carboidratos solúveis foram

estimados através de uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de D (+) glicose anidra.

4.1.4.4. N-aminossolúveis

Os teores de N-aminossolúveis foram determinados de acordo com o método descrito por Yemm e Cocking (1955). Em tubos de ensaio com tampas rosqueadas, foram adicionados 500 μ L do extrato convenientemente diluído, 250 μ L de tampão citrato de sódio a 0,2 M, pH 5,0, 500 μ L de KCN a 0,2 mM, em metilcelosolve a 100%, e 100 μ L de ninhidrina a 5%, também em metilcelosolve a 100%. Após agitação, os tubos foram fechados e transferidos para um banho-maria a 100 °C, durante 15 min. Decorrido esse tempo, a reação foi encerrada pelo resfriamento em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados aos tubos 650 μ L de etanol a 60% (v/v). Os N-aminossolúveis foram quantificados por leituras de absorvância em 570 nm. Como branco, no lugar do extrato, foram adicionados 500 μ L de água desionizada, acrescidos dos demais componentes. Os teores de N-aminossolúveis foram determinados através de uma curva padrão com concentrações conhecidas de L-glicina.

4.1.4.5. Prolina

Os teores de prolina foram determinados de acordo com o método descrito por Bates, Waldren e Teare (1973). Em tubos de ensaio com tampas rosqueadas, foram adicionados 1,0 mL de extrato convenientemente diluído, 1,0 mL de ninhidrina ácida (1,25 g de ninhidrina em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico a 6 M) e 1,0 mL de ácido acético glacial. A mistura foi aquecida a 100 °C, por 1 h, para o desenvolvimento da cor. Em seguida, a reação foi interrompida por resfriamento dos tubos em banho de gelo durante 10 min. Passado esse tempo, foram adicionados 2,0 mL de tolueno aos tubos, os quais foram agitados vigorosamente e deixados em repouso. Então, formou-se uma mistura bifásica a qual teve sua

fase superior (contendo o cromóforo + tolueno) retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A quantificação dos teores de prolina foi feita pelas leituras de absorbância a 520 nm na fase contendo o cromóforo. Como branco, foi utilizada uma alíquota de tolueno. Os teores de prolina foram estimados através de uma curva padrão com concentrações conhecidas de L-prolina.

Nas determinações dos solutos orgânicos e proteínas solúveis, cada extrato foi dosado em duplicata. Os teores de solutos orgânicos foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS e os de proteínas solúveis foram expressos em mg g^{-1} MS.

4.1.5. Delineamento experimental

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com dois níveis de prolina (0 ou 30 mM), dois níveis de salinidade (0 ou 80 mM de NaCl) e dois tempos de coleta (plantas com 7 e 14 dias após a aplicação dos tratamentos.), com seis repetições. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa Sisvar, utilizando o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

4.2. Experimento II – Trocas gasosas, teores de H_2O_2 , teores de malondialdeído e atividade das enzimas antioxidativas e do metabolismo da prolina em plantas de milho sob condições de salinidade e submetidas à aplicação foliar de prolina

Neste experimento, foram determinadas as trocas gasosas, os teores de malondialdeído e H_2O_2 e, ainda, as atividades das enzimas sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato, desidrogenase da prolina, dismutase do superóxido, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase do guaiacol. O experimento foi conduzido com os mesmos tratamentos e em condições semelhantes àsquelas do Experimento I, porém o estudo foi feito apenas em folhas e raízes, sendo as coletas também realizadas aos 7 e 14 dias dos tratamentos. Nesse

experimento, as médias de temperatura na casa de vegetação foram de $30,9\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$ e $28,5 \pm 2\text{ °C}$, durante o dia e a noite, respectivamente, sendo a umidade relativa do ar igual $73 \pm 12\%$.

4.2.1. Trocas gasosas

As medições de trocas gasosas foram efetuadas na primeira folha expandida, a contar do ápice, e em condições de temperatura e umidade do ar ambientais. No dia em que foram realizadas as coletas, entre 9 e 11 h do dia, foram medidas a taxa de fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s), a taxa de transpiração (E) e a concentração interna de CO_2 (C_i). Para essas medidas, utilizou-se um analisador portátil de gás no infravermelho (IRGA, mod. LCI, ADC, Hoddesdon, UK), portando uma fonte de luz com intensidade de $1500\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (ADC, Hoddesdon, UK).

4.2.2. Teores de peróxido de hidrogênio

Os teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Velikova *et al.* (2000). Os extratos foram preparados a partir da homogeneização, em nitrogênio líquido, de 250 mg do material fresco de folhas e raízes com 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1%. O homogenato foi centrifugado a $12.000 \times g$, por 15 min, a 4 °C e, decorrido esse tempo, o sobrenadante foi coletado. Alíquotas de 500 μL do sobrenadante foram adicionadas a um meio de reação composto por 500 μL do tampão fosfato de potássio a 10 mM, pH 7,0, e 1 mL de KI a 1 M. A quantificação dos teores de H_2O_2 foi feita pelas leituras de absorbância a 390 nm e estimadas através de uma curva de calibração preparada com concentrações conhecidas de H_2O_2 . Os teores de peróxido de hidrogênio foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF (massa fresca).

4.2.3. Teores de malondialdeído

Os teores de malondialdeído (MDA) foram determinados pela metodologia proposta por Llesuy (2002). Os extratos foram os mesmos utilizados para a determinação dos teores de H_2O_2 . Em tubos de ensaio de tampa rosqueada, foram adicionadas alíquotas de 250 μ L do extrato, juntamente com 250 μ L de água desionizada e 250 μ L de uma solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) a 5% e TCA a 20%. Os tubos foram agitados e, em seguida, aquecidos em banho-maria a 95 °C durante 30 min. Decorrido esse tempo, os tubos de ensaio foram levados a um banho de gelo até a parada da reação. Depois, os tubos foram centrifugados a 3.000 x g, durante 10 min. No sobrenadante, foram realizadas leituras de absorbância a 532 nm, representando a máxima absorção do complexo MDA-TBA, e a 600 nm, representando a absorção de turbidez não específica. Os teores de MDA foram expressos μ mol g⁻¹ MF, usando para os cálculos seu coeficiente de extinção molar (155 mM⁻¹ cm⁻¹).

4.2.4. Enzimas do metabolismo da prolina

4.2.4.1. Preparação dos extratos

Para a análise das enzimas do metabolismo da prolina, foram utilizados o tecido fresco de folhas e raízes, os quais foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, sendo em seguida armazenados a -80 °C até sua utilização. A extração foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Wang *et al.* (2011), com pequenas modificações. Os extratos foram preparados a partir da homogeneização, com nitrogênio líquido, de 3 g do material fresco congelado, adicionando 6 mL de uma solução contendo: tampão fosfato de potássio à 100 mM, pH 7,4; ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 1 mM; β – mercaptoetanol a 10 mM; polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 1% (p/v); MgCl₂ a 5 mM e KCl a 60 mM. O homogenato foi centrifugado a 12000 x g por 20 min à 4 °C. O sobrenadante

resultante foi mantido a -80°C até a determinação das atividades. A solução foi previamente resfriada para 4°C .

4.2.4.2. Sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato

A atividade da sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5CS) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Wang *et al.* (2011). Em um volume final de 2 mL da mistura de reação, em tubos de ensaio contendo tampão Tris-HCl a 100 mM, pH 7,2, glutamato a 75 mM, MgCl_2 a 20 mM, ATP a 5 mM e NADPH a 0,4 mM foram adicionados 500 μL do extrato enzimático. Os tubos foram incubados a 37°C em banho-maria, por 20 min. Passado esse tempo, a atividade da P5CS foi determinada pela oxidação do NADPH e medida pelo aumento linear na absorbância a 340 nm, por 5 min. A P5CS foi expressa como unidade de atividade (U) por miligrama de proteína (U mg^{-1} proteína), sendo uma U definida como sendo o aumento em 0,001 unidade de absorbância por minuto.

4.2.4.3. Desidrogenase da prolina

A atividade da desidrogenase da prolina (PDH) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Sakuraba *et al.* (2001) com modificações. Em um volume final de 1 mL da mistura de reação, contendo tampão Tris-HCl a 200 mM, 2,6 dicloroindofenol (DCIP) a 0,1 mM e 100 μL do extrato bruto. A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C durante 3 min e, decorrido esse tempo, a reação se iniciou com a adição de 200 μL de L-prolina a 100 mM. A atividade da PDH foi estimada pela diminuição da absorbância a 600 nm, causada pela redução do DCIP. Os resultados foram expressos em U mg^{-1} de proteína considerando o coeficiente de extinção molar do DCIP de $21,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Uma U de atividade foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μmol de DCIP por minuto a 50°C .

4.2.5. Delineamento experimental

O delineamento experimental e análise dos resultados foram feitos da mesma forma que no Experimento I e estão descritos no item 4.1.5.

4.5.4. Enzimas do metabolismo de proteção oxidativa

4.2.5.1. Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados a partir dos tecidos de folhas e raízes. O extrato base para a determinação das atividades enzimáticas foi obtido a partir da maceração, em almofariz, de 200 mg do tecido liofilizado de folhas ou 150 mg de raízes com 4 mL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM e ascorbato a 2 mM. O macerado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a 12000 x g durante 15 min. Todos os procedimentos foram conduzidos a 4° C e o sobrenadante (extrato) foi armazenado a -25 °C até o momento das análises.

4.2.5.2. Dismutase do superóxido

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) foi determinada de acordo com o método descrito por Beauchamp e Fridovich (1971). Em tubos de ensaio e em local pouco iluminado, foram adicionados 50 µL do extrato diluído e 1450 µL da mistura de reação formada por metionina a 13 mM, azul de *p* – nitrotetrazólio (NBT) a 75 µM, EDTA a 100 mM e riboflavina a 2 µM, todos em tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8. A reação da riboflavina em presença de luz foi conduzida em uma câmara de madeira contendo lâmpadas fluorescentes de 20 W e revestida internamente com papel alumínio (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). A atividade da SOD foi estimada pelo aumento da absorbância em 560 nm, pelo desenvolvimento da cor azul (produção de formazana) decorrente da redução do NBT. Os resultados foram expressos em unidades de atividade (UA) g⁻¹ MS, sendo uma UA definida

como sendo a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da redução do NBT, no período de 15 min.

4.2.5.3. Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Harvir e MacHale (1987). Em tubos de ensaios, foram adicionados 1290 μL de tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM e, em seguida, os tubos foram transferidos para banho-maria a 30 °C. Alíquotas de 60 μL de H_2O_2 foram colocadas nos tubos e, depois, foram adicionados 150 μL do extrato diluído, iniciando-se a reação. A atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo na absorbância em 240 nm, devido ao consumo de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MS}$, usando para os cálculos o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.2.5.4. Peroxidase do ascorbato

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi determinada de acordo com método descrito por Nakano e Asada (1981). Em tubos de ensaio, foram adicionados 1110 μL de uma mistura, contendo tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 6,0, e EDTA a 5 mM, sendo os tubos transferidos para um banho-maria a 30 °C. Em seguida, alíquotas de 50 μL de H_2O_2 a 0,03 M e ascorbato a 15 mM foram adicionados aos tubos e, finalmente a reação enzimática foi iniciada pela adição de 300 μL do extrato devidamente diluído. A atividade da enzima foi determinada pela oxidação do ascorbato, medida pelo decréscimo na absorbância em 290 nm. Os resultados foram expressos em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ MS}$ e, para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do ascorbato ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Levou-se em consideração que para cada mol de H_2O_2 consumido, dois moles de ascorbato são utilizados.

4.2.5.5. Peroxidase do guaiacol

A atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) foi determinada pelo método proposto por Kar e Mishra (1976). Em tubos de ensaio, foram adicionados 950 μL de uma mistura contendo tampão fosfato de potássio a 100 mM e EDTA a 10 mM, sendo em seguida, os tubos levados ao banho-maria a 30 °C. Aliquotas de 500 μL de guaiacol a 20 mM e H_2O_2 a 6 mM foram adicionadas aos tubos e, para dar início a reação, 50 μL do extrato convenientemente diluído foi adicionado à mistura de reação. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ de massa seca usando-se, e para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ($26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para os cálculos foi usada a estequiometria de que quatro moles de H_2O_2 envolve a formação de um mol de tetraguaiacol.

4.2.6. Delineamento experimental

O delineamento experimental e análise dos resultados foram feitos da mesma forma que no Experimento I e estão descritos no item 4.1.5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Experimento I - Crescimento e acúmulo de solutos inorgânicos e orgânicos em plantas de milho em condições de salinidade e submetidas à aplicação foliar de prolina

5.1.1. Crescimento das plantas

Com relação à massa seca da parte aérea (MSPA), foi observado que, em relação ao tratamento controle/água, as plantas do tratamento controle/prolina não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 4A). As reduções na MSPA do tratamento salino/água foram de 44 e 64%, respectivamente nas plantas aos 7 e 14 dias após a imposição dos tratamentos quando comparado com plantas do tratamento controle/água. Já as reduções na MSPA das plantas do tratamento salino/prolina foram, em relação ao tratamento controle/prolina, de apenas 30 e 27% aos 7 e 14 dias após os tratamentos, respectivamente. Portanto, observa-se que as plantas, sob condições salinas, tiveram uma maior redução na MSPA com um maior tempo de estresse, porém quando aspergidas em suas folhas com prolina essa redução foi menor, evidenciando um menor agravo em seu crescimento.

Sob condições controle, a prolina não alterou significativamente a massa seca das raízes (MSR), não havendo diferenças significativas entre o tratamento controle/água e o controle/prolina. A salinidade reduziu a MSR das plantas do tratamento salino/água nos dois tempos de coleta estudados com maior intensidade aos 14 dias (Figura 4B). Observou-se que, aos 7 dias de estresse, as plantas do tratamento salino/prolina tiveram o crescimento de suas raízes similar ao das plantas crescendo na ausência de sal. Aos 14 dias, as plantas do tratamento salino/prolina tiveram o crescimento das raízes reduzido em 26%, entretanto, nas plantas submetidas apenas ao NaCl a redução foi ainda maior (54% em relação ao respectivo

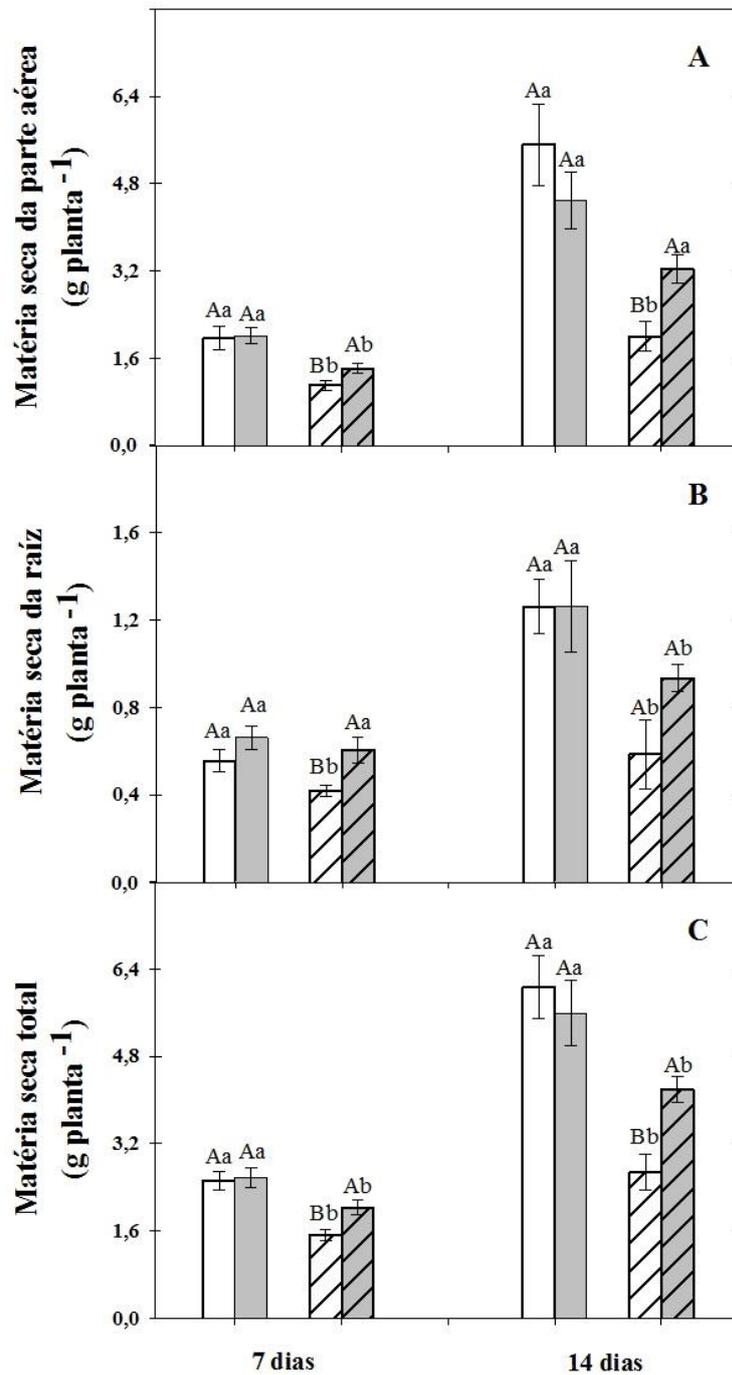


Figura 4. Massas secas da parte aérea (MSPA, A), das raízes (MSR, B) e total (MST, C) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▨) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▨) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

controle). Aos 7 e 14 dias, as plantas do tratamento salino/prolina apresentaram MSR 44 e 63% maiores que aqueles dos respectivos tratamentos salino/água.

A matéria seca total (MST) das plantas de milho, sob condições controle, não foi afetada pelo tratamento com prolina em nenhum dos tempos de coleta (Figura 4C). Mais uma vez, os tratamentos salinos tiveram suas massas secas diminuídas em relação aos controles. Entretanto, as reduções na MST das plantas do tratamento salino/prolina foram menos pronunciadas (21 e 25%, aos 7 e 14 dias, respectivamente) quando comparadas às plantas tratamento salino/água (40 e 56%, aos 7 e 14 dias, respectivamente).

Reduções no crescimento das plantas em decorrência da salinidade têm sido verificadas por outros autores, assim como diminuição de seus efeitos deletérios pelo tratamento com prolina (ALI; ASHRAF; SHAHBAZ, 2008; CRAMER *et al.*, 2011; BAYUELO-JIMENES *et al.*, 2012). No presente trabalho, a aplicação foliar de prolina minorou a redução no crescimento das plantas pela salinidade. Huang *et al.* (2009), estudando plantas de pepino sob condições de salinidade, verificaram que a adição de prolina a 10 mM, na solução nutritiva, minimizou a redução na massa seca das plantas. El-samad *et al.* (2011), em trabalho realizado com plantas de milho e feijão, em diferentes condições de salinidade verificaram que a massa seca das plantas diminuiu em todos os tratamentos salinos e que o tratamento com prolina a 10 ppm adicionada no solo recuperou o crescimento dessas plantas. Entretanto, Khedr *et al.* (2003), não encontraram diferenças no crescimento de plantas de *Pancreaticum maritimum* tratadas com várias doses de sal em ausência ou presença de prolina a 5 mM adicionada na solução nutritiva.

A área foliar (AF) das plantas de milho aos 7 dias de tratamentos foi alterada apenas em função da salinidade (Figura 5). Em média, a AF das plantas dos tratamentos salinos foi 42% menor que aquelas das plantas controle. Aos 14 dias, apesar da MSPA ter sido similar

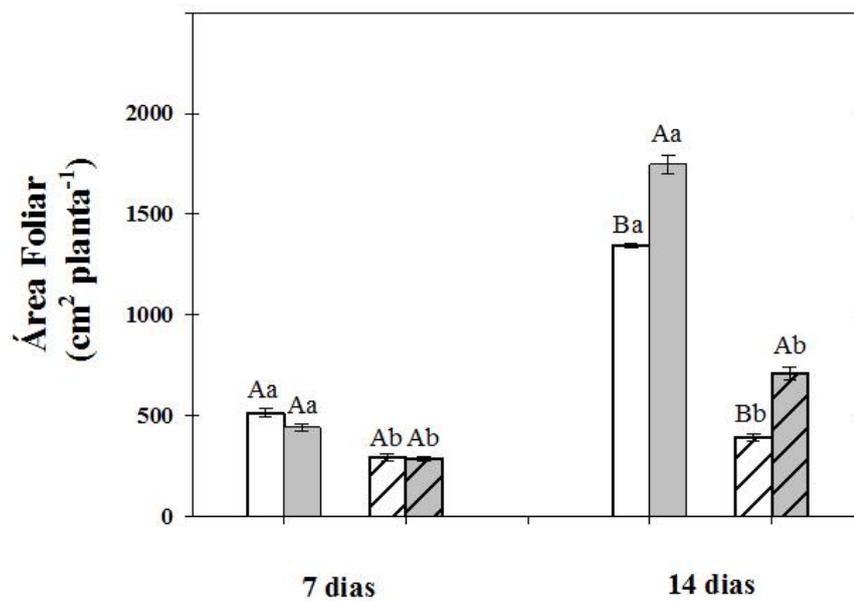


Figura 5. Área foliar (AF) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▨) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (■) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média \pm o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

entre os tratamentos controle/água e controle/prolina (Figura 4A), observou-se que houve um aumento na AF de 23% devido somente à aplicação foliar de prolina. Já nas plantas estressadas, a AF das plantas do tratamento salino/prolina foi 48% maior do que aquele do tratamento salino/água (Figura 5).

Segundo Mane *et al.* (2011), a redução na área foliar é um sinal importante dos efeitos do estresse salino, mesmo em genótipos tolerantes. Os resultados obtidos mostram que a pulverização foliar com prolina foi eficiente em aumentar a área foliar tanto em condições controle como em condições de salinidade (Figura 5). Aumentos na área foliar devido à prolina exógena têm sido observados por vários autores (ALI *et al.*, 2008, em milho; EL-SAMAD *et al.*, 2010, também em milho; LACERDA *et al.*, 2012, em meloeiro). Hare *et al.* (2010), estudando a organogênese *in vitro* de explantes da parte aérea de *Arabidopsis thaliana*, observaram que a adição de prolina a 1 mM no meio de crescimento foi eficiente em estimular a divisão e a diferenciação celular.

5.1.2. Solutos inorgânicos

Nas folhas, os teores de Na^+ foram alterados em função da salinidade, sendo os valores médios sob salinidade, aos 7 e 14 dias dos tratamentos, respectivamente, 10 e 16 vezes maiores que os valores médios dos respectivos controles (Figura 6A). Aos 7 dias, não foram observadas diferenças nos teores de Na^+ entre os tratamentos salino/prolina e salino/água. Entretanto, o efeito benéfico da pulverização foliar das plantas com prolina foi evidente aos 14 dias dos tratamentos, quando os teores do íon tóxico Na^+ nas folhas do tratamento salino/prolina foram 29% inferiores àqueles do tratamento salino/água (Figura 6A). Nos tecidos dos colmos + bainhas, houve o maior acúmulo do íon sódio entre os tecidos estudados (Figura 6). Não foram observadas diferenças significativas no teor de sódio entre as plantas controle/água e aquelas do tratamento controle/prolina.

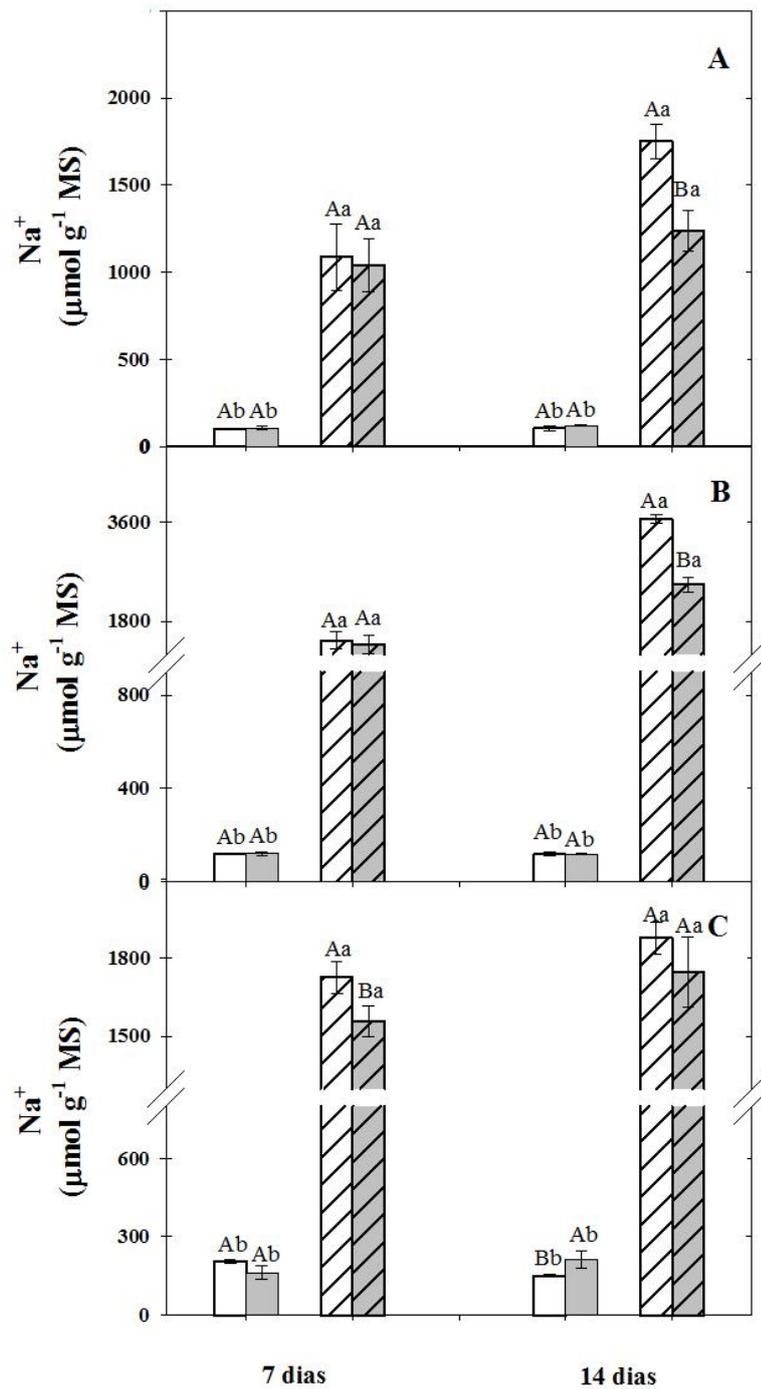


Figura 6. Teores de Na⁺ nas folhas (A), colmos + bainha (B) e raízes (C) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▨) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▨) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Aos 7 dias, não houve diferença significativa nos teores de sódio entre os tratamentos salino/água e salino/prolina. Entretanto, aos 14 dias dos tratamentos, a aplicação de prolina exógena foi eficiente em reduzir os teores de Na^+ nos colmos + bainhas, sendo o acúmulo desse íon tóxico no tratamento salino/prolina 31% menor que aquele no tratamento salino/água.

Nas raízes das plantas de milho com 7 dias, sob condições controle, verificou-se que a prolina exógena não interferiu no acúmulo de sódio (Figura 6C). Por outro lado, nas plantas do tratamento salino, os teores de Na^+ nas raízes foram, em média, 8 e 12 vezes superiores àqueles das plantas controles, respectivamente, na primeira e segunda coletas. Aos 7 dias, o acúmulo de sódio foi 10% menor nas plantas do tratamento salino/prolina, em relação àquele do tratamento salino/água. Entretanto, aos 14 dias dos tratamentos não houve diferenças significativas no acúmulo de sódio nas raízes das plantas dos tratamentos salinos (Figura 6C).

Um grande número de pesquisas tem concentrado esforços nos efeitos deletérios provocados pelo Na^+ . Esses efeitos são aliviados pela inibição do influxo de Na^+ através de dois mecanismos principais: 1) compartimentalizando o íon dentro dos vacúolos via antiportes Na^+/H^+ na membrana do tonoplasto; 2) aumentando a extrusão ativa do Na^+ para o ambiente externo por antiportes Na^+/H^+ encontrados na membrana plasmática da raiz (BRINI; MASMOUDI, 2012). O menor acúmulo de Na^+ nas plantas sob estresse salino, causado pela prolina, aqui observado, foi relatado por outros autores (HUANG *et al.*, 2009; NOUNJAN *et al.*, 2012). Ben Ahmed *et al.* (2010) afirmam que um menor teor de Na^+ em plantas tratadas com prolina demonstra a habilidade que esse iminoácido tem de excluir o Na^+ da seiva do xilema, evitando seu transporte para a parte aérea. Heuer (2003), em estudo realizado com plantas de tomate submetidas à salinidade, observou que a aplicação de prolina a 5 mM causou redução de aproximadamente 20% no teor de Na^+ nas folhas provavelmente como

resultado de um efeito osmoprotetor. A osmoproteção e a exclusão de Na^+ pelas raízes causados pela aplicação de prolina podem, em conjunto, ter agido de forma a reduzir os teores desse íon na parte aérea como observado no presente trabalho.

Sob condições controle, exceto nos colmos + bainhas das plantas aos 7 dias dos tratamentos, os teores de K^+ não foram alterados pela prolina exógena. Por outro lado, os teores desse íon foram reduzidos pela salinidade em todos os órgãos estudados, nas duas coletas (Figura 7).

Nas folhas, aos 7 dias dos tratamentos, a salinidade reduziu os teores de potássio em 46%, não sendo observadas diferenças entre os tratamentos salino/prolina e salino/água. Nas plantas da segunda coleta, os teores de K^+ nas folhas apresentaram-se com valores e comportamento semelhantes àqueles da primeira coleta, porém, sob condições de salinidade, a aplicação foliar de prolina causou um aumento de 26% no teor de potássio, em relação ao tratamento salino/água.

Aos 7 dias, nos tecidos dos colmos + bainhas, houve um pequeno incremento do teor de K^+ das plantas do tratamento controle/prolina, relativamente ao tratamento controle/água (Figura 7B). Nesse período, em relação aos controles, houve redução nos teores desse íon nos tratamentos salinos de aproximadamente 39%, sem haver diferenças significativas entre os tratamentos salino/água e salino/prolina. Da mesma forma que nas folhas, foram observados nos colmos + bainhas, aos 14 dias dos tratamentos, um aumento de 23% teores de K^+ no tratamento salino/prolina em relação ao tratamento salino/água.

Nas raízes, também foram observadas reduções nos teores de K^+ pela salinidade, sendo os valores, em média, 52% menores que aqueles dos tratamentos controles, em ambas as épocas de coleta (Figura 7C). Contudo, não foram observadas alterações nos teores de

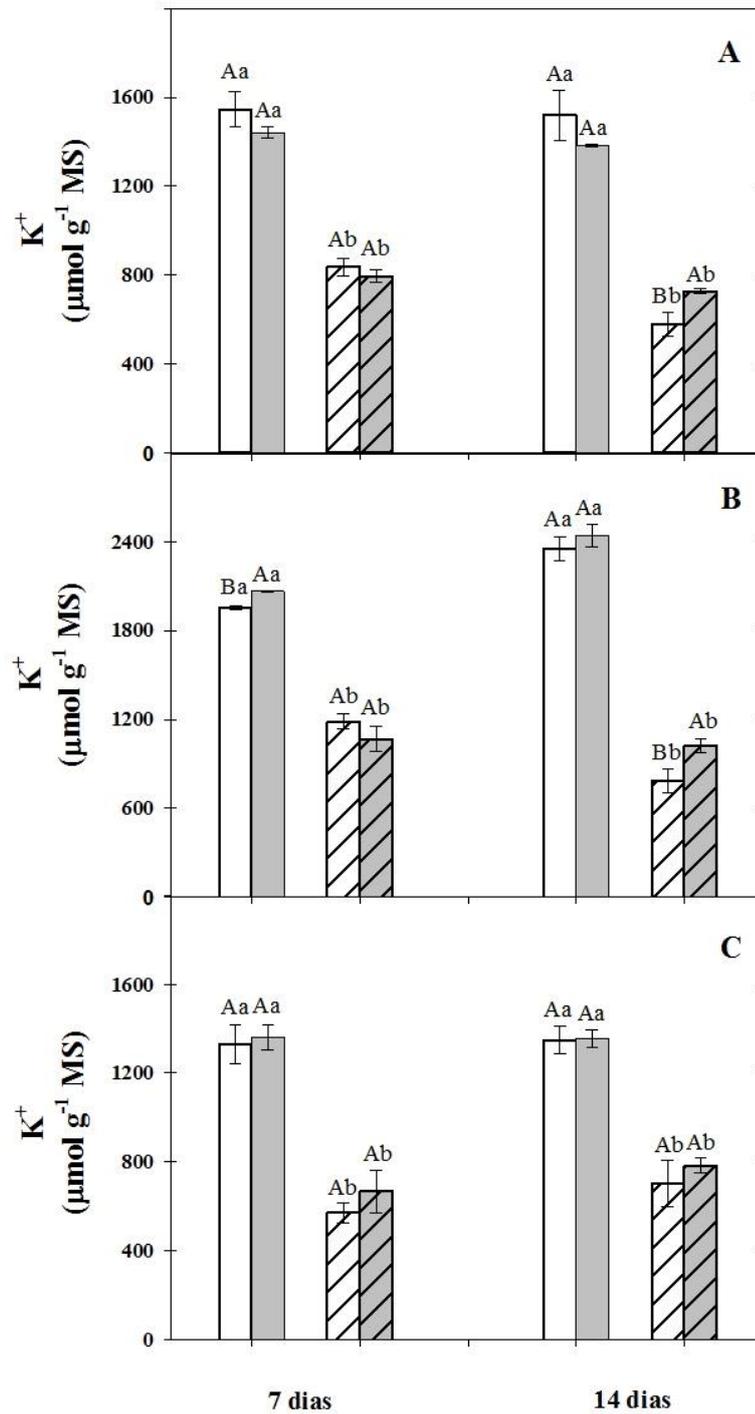


Figura 7. Teores de K⁺ nas folhas (A), colmos + bainhas (B) e raízes (C) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▨) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▨) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey (P ≤ 0,05).

potássio em função do tratamento com prolina em nenhum dos tempos de coleta, para ambos os tratamentos (controle e salino).

As concentrações de K^+ são de suma importância para a manutenção na homeostase celular. Durante o estresse salino, o excesso do íon sódio na solução do solo resulta numa diminuição na absorção e na translocação de nutrientes minerais, especialmente o K^+ (WANG et al., 2013). Altos níveis Na^+ no solo podem: 1) diminuir a atividade do K^+ no solo diminuindo sua disponibilidade; 2) competir com K^+ por sítios de ligações de transportadores, reduzindo sua absorção e, por conseguinte, sua translocação; desestabilizar a membrana plasmática de forma a favorecer o escoamento de K^+ causando distúrbios no metabolismo da planta. Como observado no presente trabalho, a aplicação de prolina reduziu a perda de K^+ podendo, em parte, contribuir para minimizar os efeitos da salinidade.

Em seu trabalho, Cuin e Shabala (2007), trabalhando com plantas de *Arabidopsis thaliana*, verificaram que a aplicação de 5 mM de prolina foi eficiente em reduzir o efluxo de K^+ . Sobahan et al. (2012), trabalhando com dois genótipos de arroz com tolerância diferencial à salinidade, observaram que o genótipo tolerante elevou o teor de K^+ quando suprido com 1 mM de prolina exógena.

Nas folhas das plantas de milho, com 7 dias dos tratamentos, a prolina exógena não alterou significativamente a relação K^+/Na^+ tanto em condições controle como de estresse salino (Figura 8A). No entanto, essa relação foi reduzida, em média, 94% pela salinidade, em relação àquelas das plantas controle. Já aos 14 dias, essa relação nas plantas sob condições controle foi menor naquelas tratadas com prolina, enquanto que em condições salinas ocorreu o inverso, ou seja, ela foi maior em cerca de 96% nas plantas tratadas com prolina, (Figura 8A).

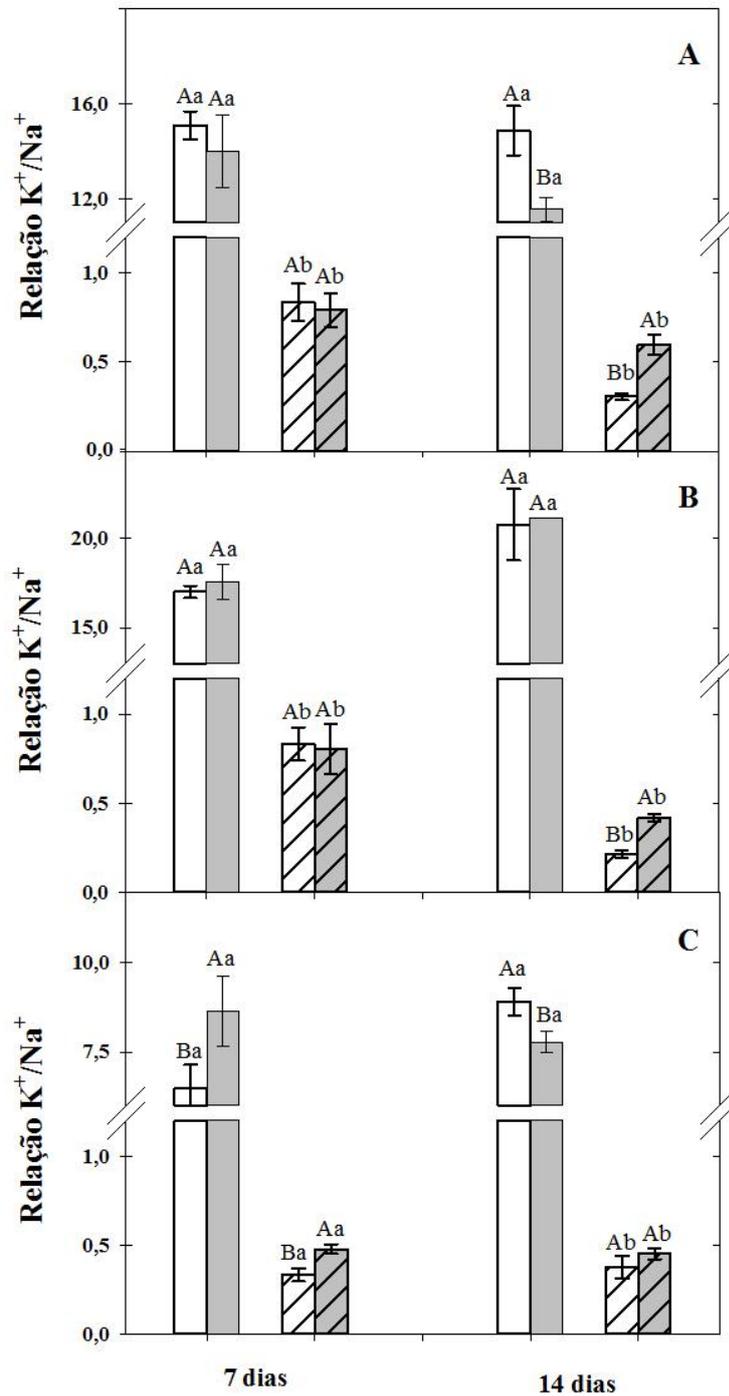


Figura 8. Relação K^+/Na^+ nas folhas (A), colmos + bainhas (B) e raízes (C) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (\square) e na presença (\blacksquare) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (\square) e presença de sal (\blacksquare) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média \pm o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Nos tecidos de colmos + bainhas, a prolina não alterou a relação K^+/Na^+ nos tratamentos controles nos dois tempos de coleta, porém ela foi fortemente reduzida pela salinidade aos 14 dias dos tratamentos (Figura 8B). A prolina exógena somente alterou essa relação nas plantas sob salinidade e aos 14 dias, tendo o tratamento salino/prolina se mostrado 96% maior que o salino/água. Nas raízes e aos 7 dias dos tratamentos, a prolina exógena elevou a relação K^+/Na^+ em 34% no tratamento controle/prolina, em relação ao controle/água, e em 43% no tratamento salino/prolina, em relação ao tratamento salino/água (Figura 8B). Já aos 14 dias, a relação K^+/Na^+ nas plantas controle/água foi 15% superior àquela do tratamento controle/prolina não sendo observadas diferenças significativas nos tratamentos salinos/água e salino/prolina.

De maneira geral, os resultados demonstram que a salinidade reduziu a relação K^+/Na^+ . A redução da relação entre esses dois íons é uma resposta comum ao estresse salino (KHAN *et al.*, 2009; RAMEEH *et al.*, 2012). Aumentos na concentração de K^+ são difíceis em condições salinas devido a uma concorrência direta com o Na^+ por sítios de ligação dependentes de carga durante o transporte de íons além da pequena diferença de potencial eletroquímico para a absorção passiva de K^+ (CHEN *et al.*, 2007). Mesmo assim, como mostrado nos resultados, a prolina exógena elevou a relação K^+/Na^+ na parte aérea das plantas de milho aos 14 dias dos tratamentos. Sobahan *et al.* (2012), trabalhando com dois genótipos de arroz com tolerância diferencial à salinidade, observaram que o genótipo tolerante elevou a relação K^+/Na^+ quando suprido com prolina exógena adicionada na solução nutritiva. Nounjan e Theerakulpisut, em trabalho com plantas de arroz, observaram que a aplicação de prolina a 10 mM na solução nutritiva teve efeitos durante o período de recuperação das plantas expostas a 6 dias de salinidade, elevando a relação K^+/Na^+ a patamares maiores que aqueles onde não foi aplicada a prolina.

Nas plantas de milho com 7 dias dos tratamentos, os teores de cloreto nos tratamentos controles não foram alterados pela prolina exógena, em todos os tecidos estudados (Figura 9). Nas folhas, aos 7 dias dos tratamento, houve um acúmulo, em média, de 235% nos teores de cloreto nos tratamentos salinos, não se observando diferenças significativas entre eles. Ainda nas folhas, aos 14 dias, o teor de cloreto no tratamento salino/prolina foi 30% inferior àquele do tratamento salino/água. Nos tecidos dos colmos + bainhas, aos 7 dias dos tratamentos, observou-se um menor teor de cloreto nas plantas do tratamento salino onde se aplicou a prolina, sendo 16% inferior em relação ao tratamento salino/água (Figura 9B). Aos 14 dias dos tratamentos, nesses mesmos órgãos, não foram observadas alterações significativas nos teores de cloreto devidas à prolina exógena, sendo observado apenas um aumento nos teores desse íon tóxico pela salinidade (em média 282%, em relação aos controles). Nas raízes, os teores de cloreto não sofreram alterações pelo tratamento com prolina, porém foram alterados pela salinidade sendo, em média, 72% maiores em relação aos tratamentos controles (Figura 9C).

Assim como observado para o Na^+ (Figura 6), os teores de cloreto foram fortemente aumentados em função da salinidade, em todos os órgãos estudados; entretanto, a prolina exógena foi capaz de propiciar uma redução no teor desse íon tóxico nas folhas, aos 14 dias, e nos colmos + bainhas, aos 7 dias dos tratamentos. Esse efeito da prolina exógena foi semelhante ao causado no teor de sódio, o qual foi reduzido por esse tratamento na parte aérea, aos 14 dias dos tratamentos. Heuer (2003), trabalhando com plantas de tomate sob condições de estresse salino, observou após três semanas de exposição ao estresse, uma redução nos teores de Cl^- nas folhas e nas raízes pela aplicação de prolina a 1mM na solução nutritiva.

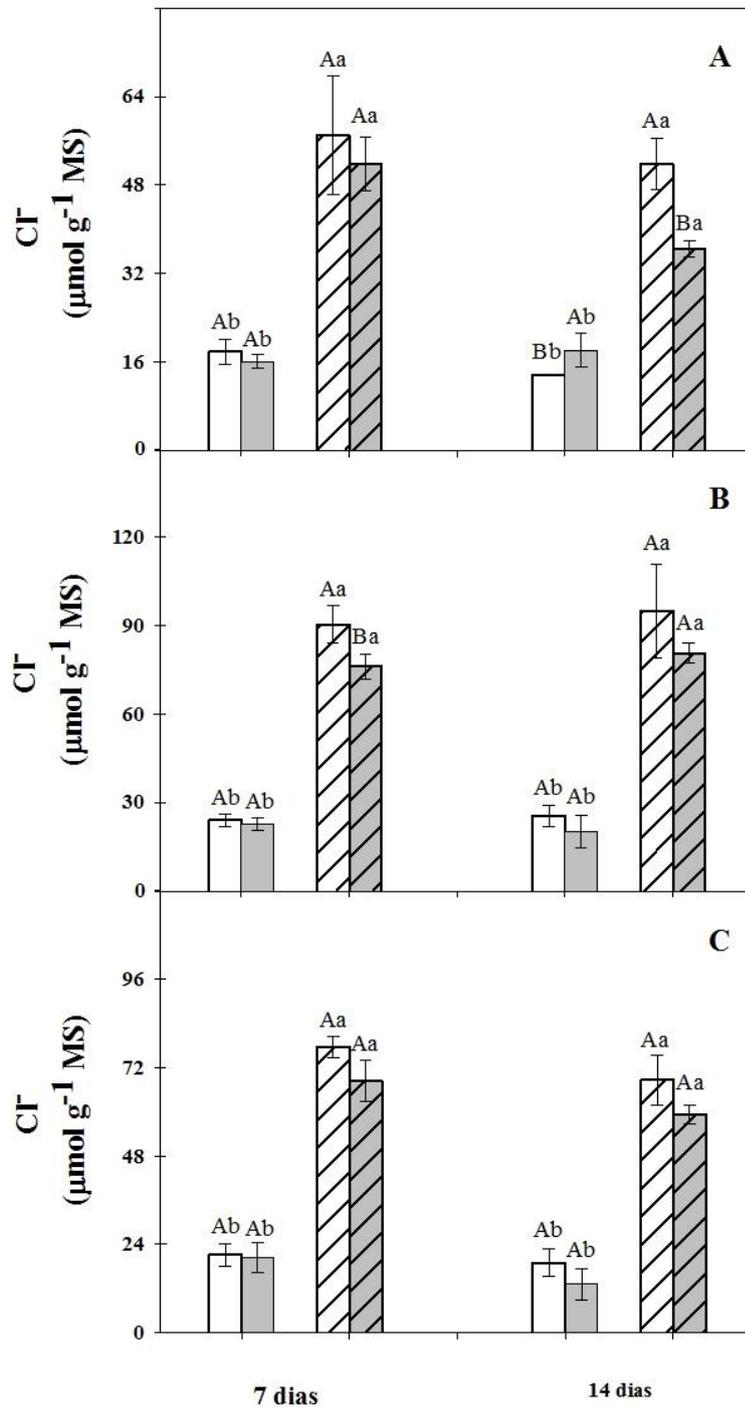


Figura 9. Teores de Cl⁻ nas folhas (A), colmos + bainha (B) e raízes (C) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▣) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▣) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey (P ≤ 0,05).

5.1.3. Solutos orgânicos

5.1.3.1. Carboidratos solúveis

Sob condições controle, exceto nos colmos das plantas aos 14 dias dos tratamentos, os teores de carboidratos solúveis não foram alterados em função da aplicação foliar de prolina (Figura 10). Nas folhas, os teores desses solutos orgânicos não foram alterados pela salinidade aos 7 dias, porém com 14 dias dos tratamentos, o estresse salino promoveu um maior acúmulo de carboidratos, em relação aos controles (Figura 10A). Em relação aos respectivos controles, na segunda coleta, os teores de carboidratos solúveis nas plantas do tratamento salino/água e salino/prolina foram, em média, 71 e 44% maiores.

Nos colmos + bainhas, aos 7 dias dos tratamentos, houve um maior acúmulo de carboidratos solúveis nos tratamentos salinos, que foram, em média, 48% superiores aos controles (Figura 10B). Aos 14 dias, observou-se que nesses órgãos o tratamento controle/prolina acumulou mais carboidratos solúveis que o controle/água. Além disso, os teores desses solutos orgânicos foram estimulados pela salinidade, tendo o tratamento salino/água apresentado um aumento de 69% nos teores de carboidratos solúveis, em relação ao tratamento controle/água. No entanto, sob condições salinas e em presença de prolina exógena, aos 14 dias, o teor de carboidratos solúveis não sofreu alteração significativa, em relação ao tratamento controle/prolina.

Nas raízes, aos 7 dias dos tratamentos, os teores de carboidratos solúveis, sob condições salinas, foram aumentados, em média, 39% em relação aos controles, não sendo observadas diferenças nessas condições pelo tratamento com prolina (Figura 10B). Entretanto, aos 14 dias, embora os teores de carboidratos tenham permanecido elevados no tratamento aos 14 dias, embora os teores de carboidratos tenham permanecido elevados no tratamento

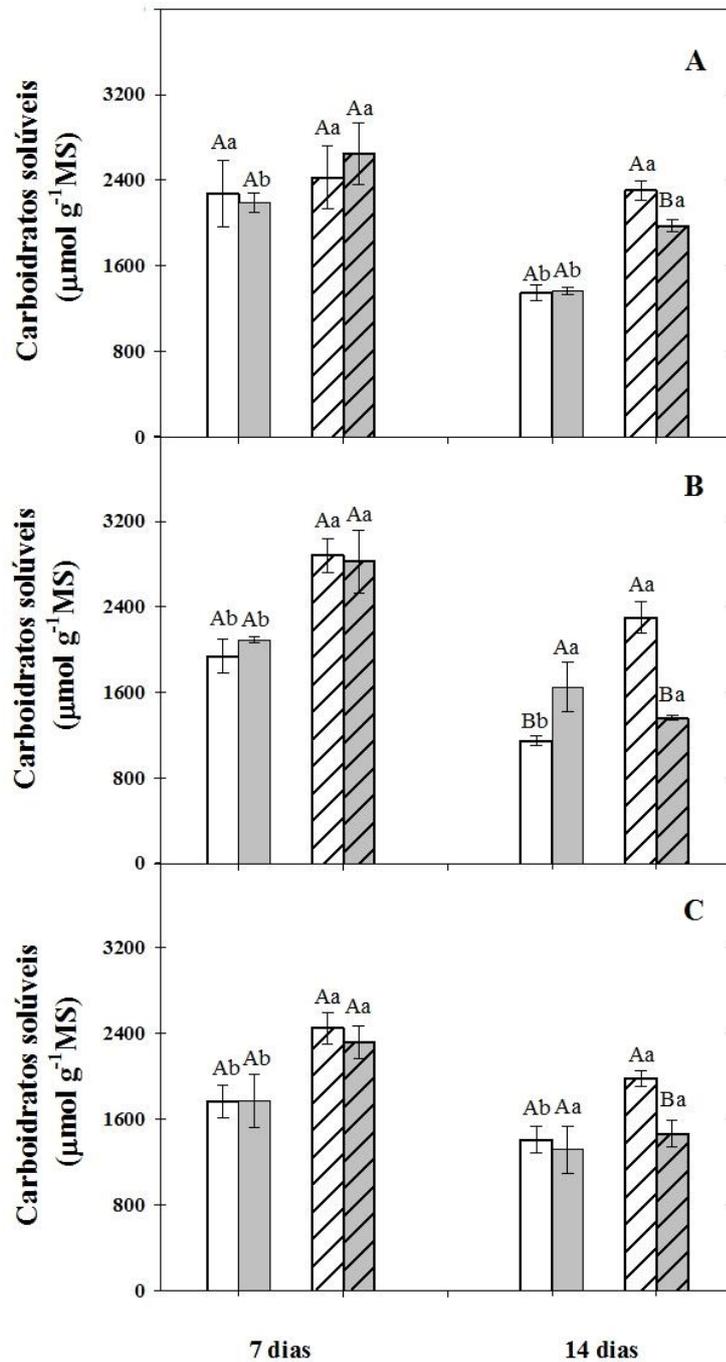


Figura 10. Teores de carboidratos nas folhas (A), colmos + bainhas (B) e raízes (C) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (\square) e na presença (\blacksquare) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (\square) e presença de sal (\blacksquare) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média \pm o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). salino/água, houve uma redução nesses teores no tratamento salino/prolina sendo comparados aos níveis dos controles.

salino/água, houve uma redução nesses teores no tratamento salino/prolina sendo comparados aos níveis dos controles.

O acúmulo de carboidratos em plantas sob salinidade, observado no presente trabalho, principalmente na parte aérea das plantas de milho, é bastante noticiado, muito embora possa ocorrer com diminuição da taxa de assimilação de CO₂ (MANE et al, 2011). Pattanagul e Thitisaksakul (2008), trabalhando com genótipos de *Oryza sativa* com diferentes tolerâncias aos sais, observaram que houve acúmulo de carboidratos solúveis nas folhas do genótipo sensível, enquanto nos genótipos tolerantes não houve alterações nos teores desses solutos, pela salinidade. Todavia, os teores de carboidratos solúveis foram menores nos genótipos tolerantes de *Oryza sativa* L., principalmente em grandes doses de NaCl (ZHANG et al., 2012). No trabalho de Prasad e Potluri (1996), a aplicação exógena de prolina em plantas de tomate em condições de estresse salino, diferentemente do encontrado no presente trabalho, não alterou os teores de carboidratos na parte aérea.

5.1.3.2. Proteínas solúveis

Em condições controles, considerando todos os órgãos estudados das plantas de milho e independentemente do tempo de coleta, os teores de proteínas solúveis não foram alterados pelo tratamento com prolina (Figura 11). Por outro lado, nas plantas sob salinidade e tratadas com prolina foram observados aumentos significativos quando comparadas àquelas aspergidas com água, em todos os órgãos, nos dois tempos estudados. Nas folhas, aos 7 dias de tratamento, o teor de proteínas solúveis no tratamento salino/água foi 40% menor em relação ao controle, enquanto que aos 14 dias essa redução foi de apenas 29% (Figura 11A). Comparando os tratamentos salino/prolina com os tratamentos salino/água, aos 7 e 14 dias, os primeiros apresentaram teores de proteínas solúveis, respectivamente, 36 e 40% maiores.

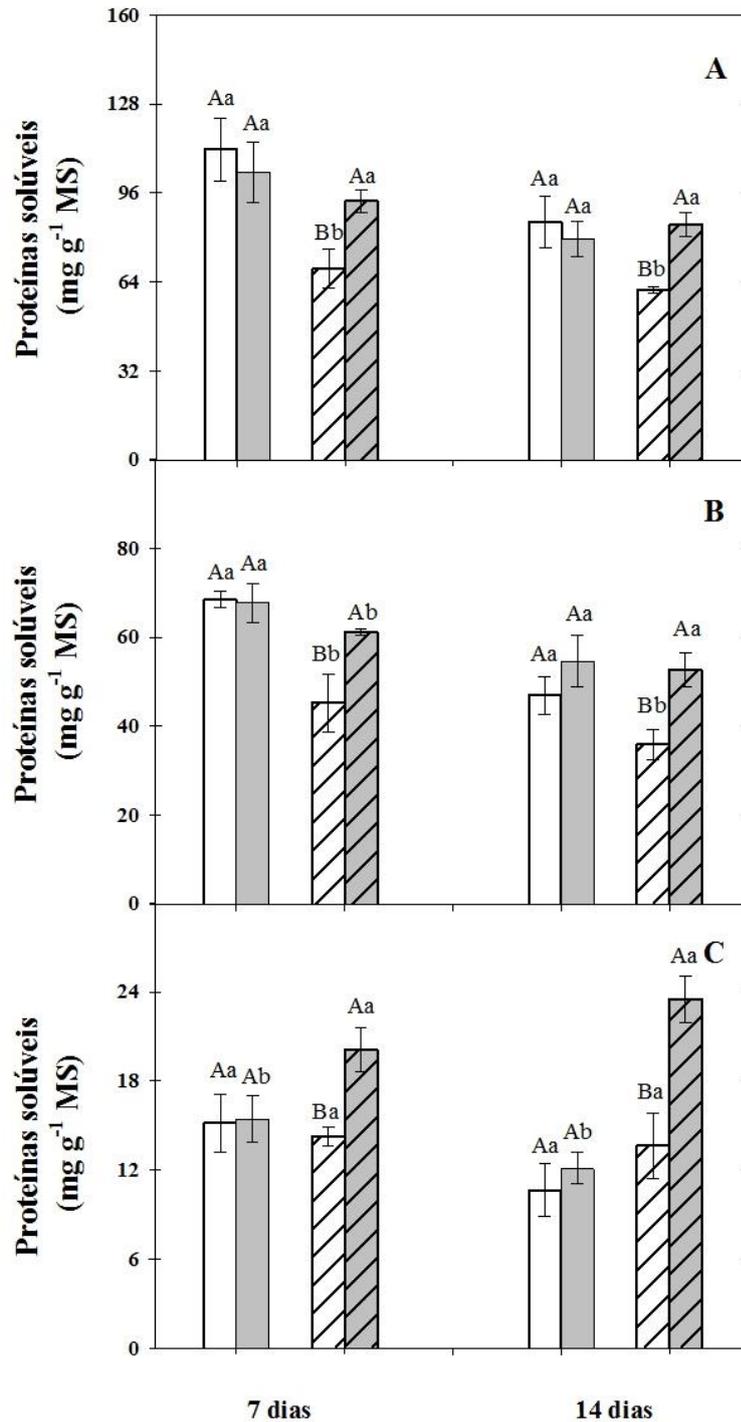


Figura 11. Teores de proteínas nas folhas (A), colmos + bainhas (B) e raízes (C) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▣) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▣) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média \pm o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Nos colmos + bainhas, aos 7 e 14 dias de tratamento, os teores de proteínas solúveis nos tratamentos salino/água foram, respectivamente, 34% e 24% menores em relação aos controles (Figura 11B). Nesses mesmos órgãos, no entanto, os tratamentos salino/prolina, tanto aos 7 como aos 14 dias de tratamento, não diferiram dos respectivos controles. Tais resultados demonstram que a aplicação foliar com prolina evita a redução nos teores de proteínas solúveis pela salinidade.

Nas raízes, a salinidade não afetou de forma significativa os teores de proteínas solúveis, no período em que os tratamentos foram realizados (Figura 11C). No entanto, em condições de salinidade e na presença de prolina exógena foram observados aumentos nos teores de proteínas solúveis. Aos 7 e 14 dias dos tratamento, os teores de proteínas solúveis nos tratamentos salino/prolina foram, respectivamente, 30 e 95% superiores àqueles dos controles (Figura 11C).

Em plantas sob condições de salinidade, geralmente se verifica uma redução na quantidade total de proteínas, muito embora algumas possam ser induzidas (PARIDA *et al.*, 2004; NAM *et al.*, 2012). Entretanto, Doganlar *et al.* (2010) trabalhando com três cultivares de tomate submetidos a várias concentrações de NaCl, observaram que os teores de proteínas totais aumentaram em função da concentração de sal e do tempo de exposição ao estresse.

Como visto na figura 11, na parte aérea (folhas e colmos + bainhas) a prolina exógena foi capaz de reverter completamente a redução nos teores de proteínas pelo estresse salino. Além disso, nas raízes, apesar do teor de proteínas solúveis não ter diminuído em função da salinidade, a prolina exógena induziu os aumento, o qual foi mais marcante aos 14 dias de estresse. Khedr *et al.* (2003), em estudo com *Pancreatim maritimum*, observaram que a redução no teor de proteínas induzida por várias concentrações de sal foi minimizada pela adição de prolina 5 mM na solução nutritiva.

5.1.3.3. N-aminossolúveis

Em todos os órgãos estudados e nos dois tempos analisados, os teores de N-aminossolúveis das plantas sob condições controle não foram alterados pelo tratamento com prolina (Figura 12). Nas folhas, a única alteração significativa com relação aos teores de N-aminossolúveis, pela salinidade, somente ocorreu nas plantas com 14 dias de tratamento e quando tratadas com prolina, sendo o teor de n-aminossolúveis 25% maior em relação ao seu controle (Figura 12A). Nos colmos + bainhas, aos 7 e 14 dias, o tratamento salino reduziu os teores de N-aminossolúveis, porém apenas no 7º dia de estresse, a prolina exógena reverteu essa diminuição nos teores desses solutos orgânicos (Figura 12B). Nas raízes, os teores de N-aminossolúveis não sofreram modificações significativas entre os tratamentos aplicados, durante os dois períodos de estudo (Figura 12C).

A exposição das plantas ao estresse salino promove o acúmulo de compostos nitrogenados de baixa massa molecular, como aminoácidos, amidas e poliaminas (YADAV *et al.*, 2011). O acúmulo desses compostos pode estar relacionado com a tolerância à salinidade das plantas (MANSOUR, 2000). Azevedo-Neto *et al.* (2004), estudando genótipos de milho com tolerância diferencial à salinidade, observaram que os genótipos mais tolerantes de milho apresentaram níveis mais elevados de N-aminossolúveis. No presente trabalho, as plantas praticamente não apresentaram aumentos pela salinidade nos teores de N-aminossolúveis; ao contrário foram observadas reduções nos teores desses solutos orgânicos, especialmente nos caules + bainhas. No entanto, a prolina exógena somente foi eficiente em reverter esse efeito da salinidade nos colmos + bainha e aos 7 dias dos tratamentos. É importante destacar que, na literatura pesquisada, não foram encontrados relatos dos efeitos da prolina exógena nos teores de N-aminossolúveis.

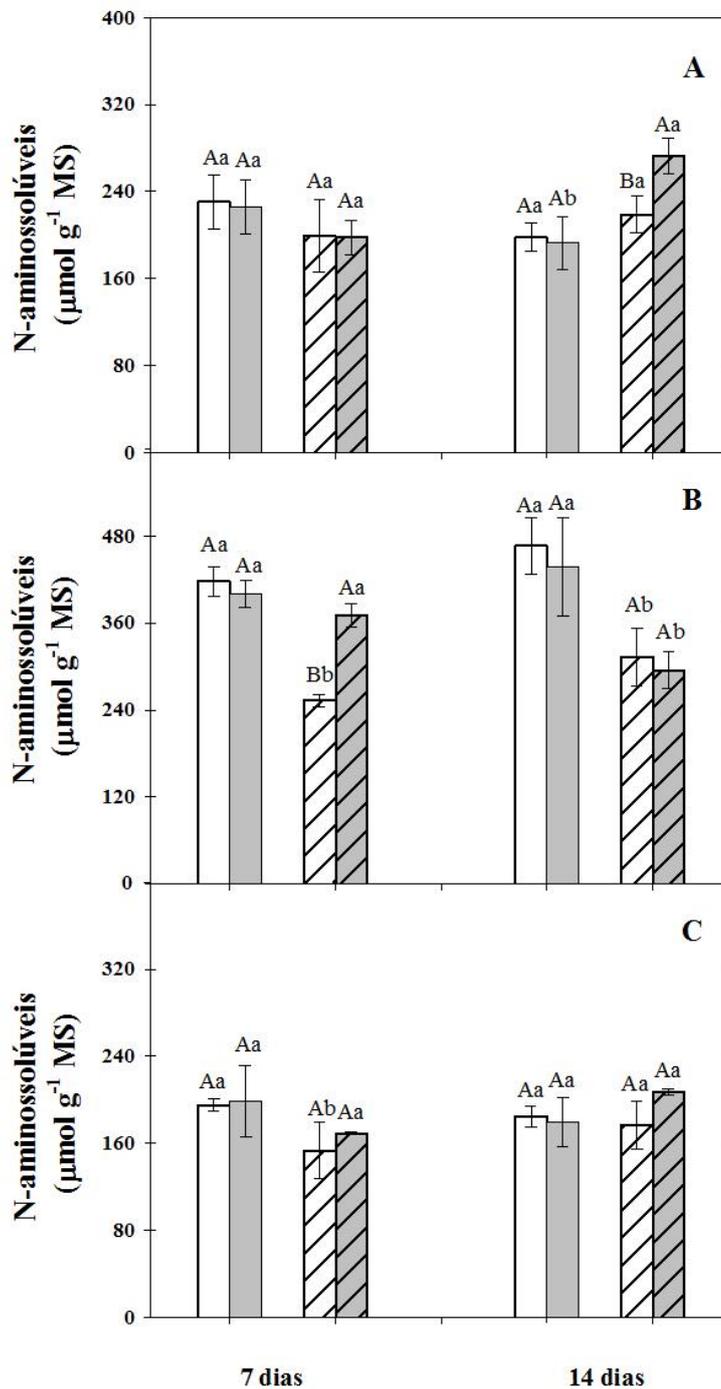


Figura 12. Teores de N-aminossolúveis nas folhas (A), colmos + bainhas (B) e raízes (C) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (\square) e na presença (\blacksquare) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (\square) e presença de sal (\blacksquare) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média \pm o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

5.1.3.4. Prolina

Sob condições controle, aos 7 dias de tratamento, foram observadas alterações nos teores de prolina, pelo tratamento com prolina exógena, somente nas folhas e colmos + bainhas das plantas (Figura 13). Nas folhas, nessas condições, o aumento foi de 37% em relação em relação ao tratamento controle/água, enquanto nos colmos o aumento foi de 56%. Nas folhas, os teores de prolina foram aumentados pela salinidade, tanto aos 7 quanto aos 14 dias dos tratamentos (Figura 13A). Contudo, aos 7 dias, enquanto o tratamento com prolina ampliou esse aumento, aos 14 dias ele teve um efeito contrário, isto é os teores de prolina foram menores no tratamento salino/prolina, em relação ao tratamento salino/água (cerca de 40%). Nos colmos + bainhas, enquanto no 7º dia de tratamento, a salinidade não exerceu influência nos teores de prolina, aos 14 dias houve um aumento nesses teores, em média, 47% em relação aos controles (Figura 13B). Embora aos 14 dias o teor de prolina no tratamento salino/prolina não tenha diferido daquele do tratamento controle/prolina, aos 7 dias ele foi cerca de 13% maior. Nas raízes, a única alteração significativa ocorreu aos 14 dias dos tratamentos, quando as plantas dos tratamentos salino/água e salino/prolina apresentaram teores de prolina, respectivamente, 66 e 36% superiores aos dos controles (Figura 13C).

A prolina tem mostrado funcionar como uma chaperona molecular, capaz de proteger a integridade de proteínas e aumentar a atividade de enzimas responsáveis pela eliminação das espécies reativas de oxigênio. Além disso, pode reduzir a peroxidação de lipídeos, proteger o aparato fotossintético e restaurar o equilíbrio oxidorreduutivo (SZABADOS; SAVOURÉ, 2009). É possível, portanto, que o aumento no teor de prolina, nas folhas, devido ao tratamento com prolina, logo aos 7 dias de tratamento (Figura 13A), tenha sido benéfico no sentido de minorar os efeitos deletérios da salinidade. Em plantas de tomate, sob condições de salinidade, Heuer (2003) observou um incremento de 39% no teor de prolina nas plantas que

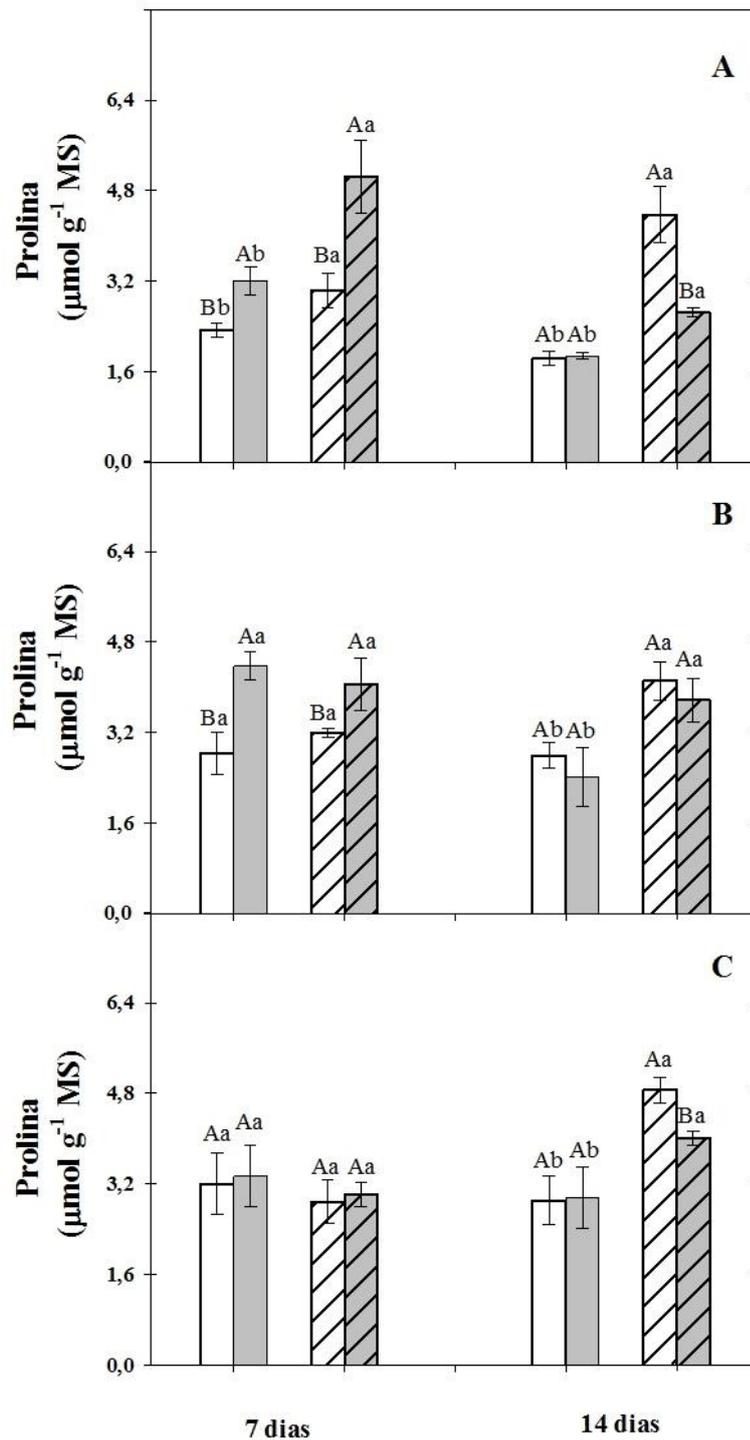


Figura 13. Teores de prolina nas folhas (A), colmos + bainhas (B) e raízes (C) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (\square) e na presença (\blacksquare) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (\square) e presença de sal (\blacksquare) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média \pm o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

tiveram suas folhas pulverizadas com prolina a 1mM. É possível, no presente trabalho, a redução no conteúdo reduzido de prolina observado aos 14 dias nas folhas tenha sido direcionada para a síntese de proteínas, visto que o teor destas se manteve semelhante no tratamento salino/prolina em relação ao tratamento controle.

5.2. Experimento II – Trocas gasosas, estresse oxidativo e atividade de enzimas de proteção oxidativa e do metabolismo da prolina em plantas de milho sob condições de salinidade e submetidas à aplicação foliar de prolina

5.2.1. Trocas Gasosas

A taxa fotossintética (A) das plantas de milho, com 7 ou 14 dias do início dos tratamentos, não foi alterada em função do tratamento de aplicação foliar com prolina, porém foi reduzida em função da salinidade (Figura 14A). Em média, houve uma redução na A de aproximadamente 16% em relação aos controles. Da mesma maneira, o tratamento com prolina não causou alteração na condutância estomática (g_s), havendo apenas uma diminuição nos valores desse parâmetro em função da salinidade (Figura 14B). Em média, a redução na g_s foi de 31% em relação aos controles. Com relação à taxa de transpiração (E) nas plantas sob condições controle, tanto aos 7 quanto aos 14 dias do início dos tratamentos, bem como naquelas sob salinidade aos 7 dias, o tratamento com prolina não causou nenhuma alteração significativa (Figura 14C). Todavia, sob condições salinas e aos 14 dias do início dos tratamentos, a E apresentou um pequeno aumento em função da aplicação foliar de prolina (cerca de 19%), apresentando valor que não diferiu daquele do tratamento controle/prolina. Nas plantas sob condições de estresse salino, aos 7 dias dos tratamentos, observou-se uma redução em E de 33% em relação aos controles. Da mesma forma que a fotossíntese e a condutância estomática, a concentração interna de CO_2 (C_i) foi alterada apenas em função salinidade (Figura 14 D). Os valores de C_i para os tratamentos salinos foram, em média, 56%

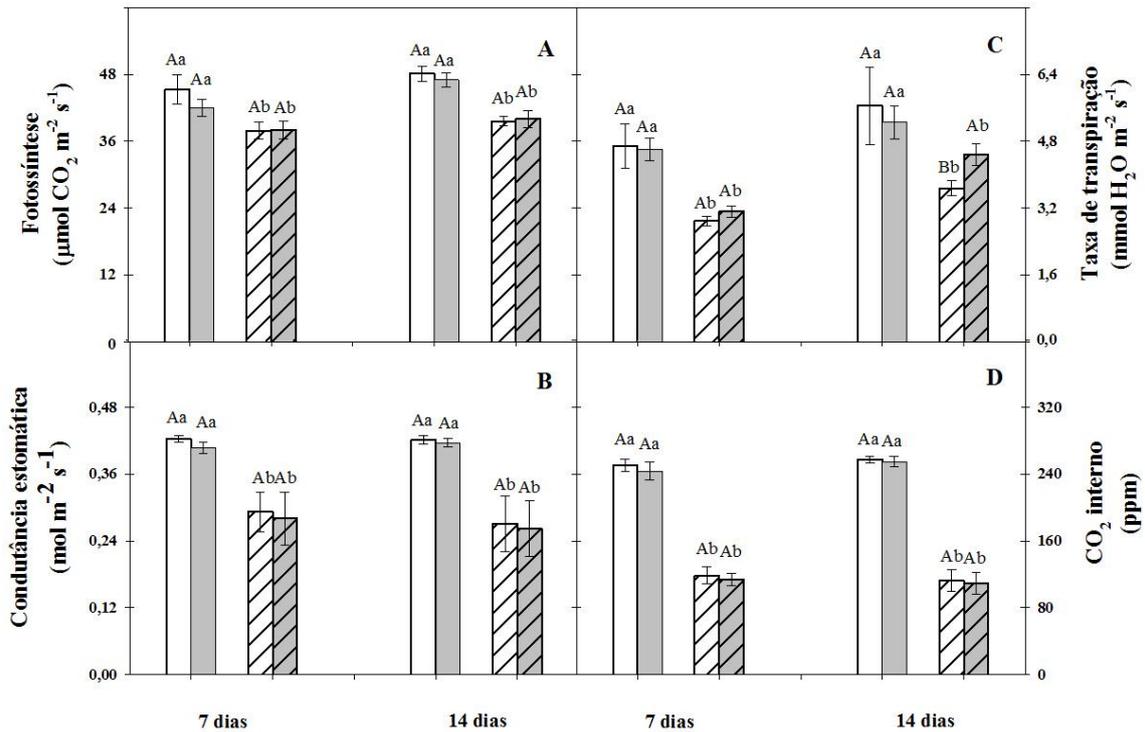


Figura 14. Fotossíntese (A), condutância estomática (B), Taxa de transpiração (C) e CO₂ interno (D) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▨) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▨) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

inferiores àqueles dos controles durante o período experimental, indicando que a queda na fotossíntese devida à salinidade parece ser em função de limitações estomáticas.

É importante destacar que, embora a taxa fotossintética não tenha sido alterada pelo tratamento com prolina, houve uma melhora no crescimento das plantas sob condições salinas quando tratadas com esse iminoácido, principalmente aos 14 dias de estresse (Experimento I, Figuras 4 e 5). Essa aparente discrepância deve-se, provavelmente, ao fato da taxa fotossintética ser uma medida pontual, pois representa o CO₂ no momento da leitura e expresso por unidade de área foliar. Portanto, se levarmos em conta que o tratamento com prolina causou uma menor redução na área foliar das plantas submetidas à salinidade, a fotossíntese total deve também ter sido aumentada pelo referido tratamento.

Nossos resultados, foram concordantes com os observados por Ali *et al.* (2008), trabalhando com plantas de milho submetidas à aplicação foliar com prolina, sob condições de estresse hídrico, e estudando as trocas gasosas, que encontraram apenas aumento na transpiração. Por outro lado, Lacerda *et al.* (2012), trabalhando com plantas de meloeiro tratadas sob diferentes concentrações de NaCl, observaram melhorias nas trocas gasosas (*A*, *E* e *C_i*) das plantas que receberam o tratamento com prolina. Já, Ben Ahmed *et al.* (2010), trabalhando com plantas de *Olea europaea*, sob condições de salinidade, observaram uma recuperação na atividade fotossintética das plantas tratadas com diferentes concentrações de prolina.

5.2.2. Teores de peróxido de hidrogênio

Tanto nas folhas como nas raízes das plantas de milho sob condições controle, e independentemente do tempo de coleta, os teores de H₂O₂ praticamente não foram afetados pelo tratamento com prolina (Figura 15). Nesses mesmos órgãos, no entanto, os teores dessa

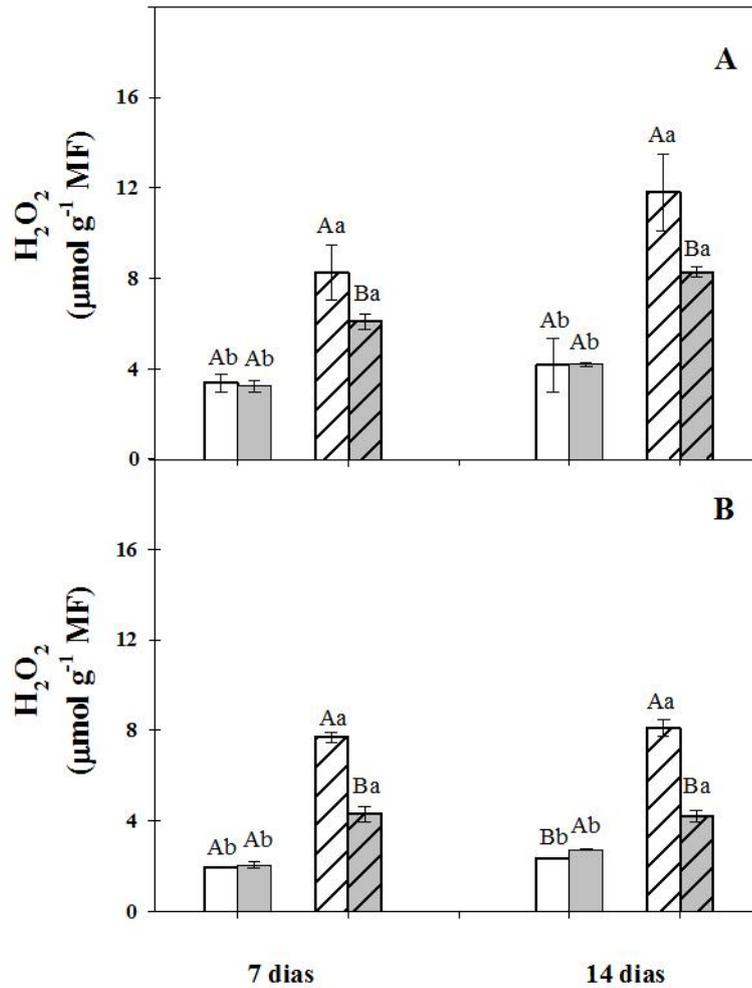


Figura 15. Teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (\square) e na presença (\square) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (\square) e presença de sal (\square) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média \pm o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

ROS foram elevados pela salinidade nas duas coletas realizadas, porém o tratamento com prolina atuou no sentido de reduzir esse aumento. Nas folhas, na primeira coleta, enquanto no tratamento salino/água o teor de H₂O₂ foi 142% mais elevado que aquele do tratamento controle/água, no tratamento salino/prolina esse aumento, foi de apenas 85% em relação ao tratamento controle/prolina (Figura 15A). Esse efeito benéfico da prolina foi mais evidente nas raízes, onde tanto na primeira como na segunda coleta, nos teores de H₂O₂ tratamento salino/prolina foram, em média, cerca de 55% daqueles dos respectivos controles (Figura 15B).

Os resultados obtidos, portanto, demonstram que a aplicação foliar de prolina nas plantas de milho foi eficiente em minimizar o acúmulo de H₂O₂, tornando menor um eventual estresse oxidativo. Uma eliminação rápida de H₂O₂ pode ser determinante para a tolerância das plantas às condições de salinidade (PANG; WANG, 2008). Nounjan *et al.* (2012), trabalhando com plantas de arroz em condições de salinidade, observaram que o tratamento com prolina a 10 mM, na solução nutritiva, reduziu os teores de peróxido de hidrogênio. Outros autores também verificaram diminuição nos teores de H₂O₂ em virtude da aplicação de prolina (AGGARWAL *et al.*, 2011, em feijão; YAN *et al.*, 2011, em melão NOUJAN; THEERAKULPISUT, 2012, em arroz)

5.2.3. Teores de malondialdeído

Os teores de malondialdeído (MDA) nas folhas e raízes das plantas de milho crescendo sob condições controle, não foram alterados significativamente pelo tratamento com prolina (Figura 16). A salinidade, no entanto, provocou um acúmulo de MDA tanto nas folhas como nas raízes. Porém, nessas condições, o tratamento com prolina foi efetivo em reduzir ou eliminar o aumento nos teores de MDA, tanto nas folhas como nas raízes (Figura 16). Nas folhas, na primeira coleta o tratamento salino/prolina foi 21% inferior ao tratamento

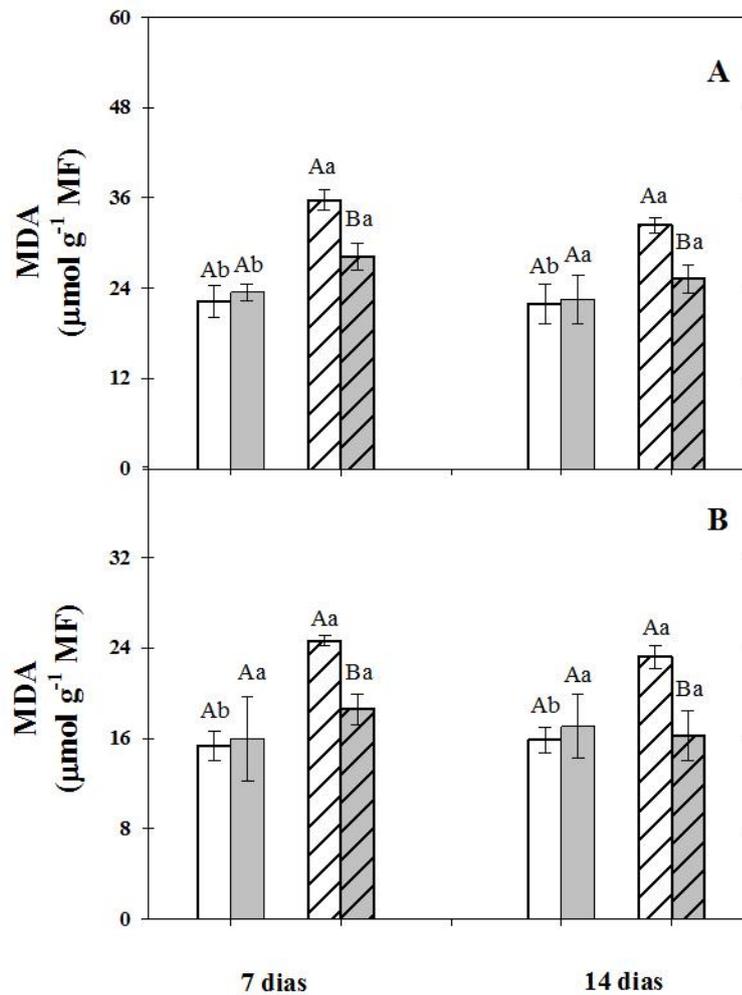


Figura 16. Teores de malondialdeído (MDA) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (■) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (■) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média \pm o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

salino/água, enquanto que na segunda coleta esse tratamento já não diferiu do respectivo controle (Figura 16A). Resultado semelhante a esse foi observado com relação às raízes, sendo o aumento nos teores de MDA, pela salinidade, completamente revertido pelo tratamento com prolina (Figura 16B).

Os resultados dos efeitos da salinidade sobre os teores de MDA foram concordantes com aqueles observados sobre os teores de H₂O₂ (Figura 15), que sugerem que a salinidade induz um estresse oxidativo. É importante destacar, que a redução nos teores de peróxido de hidrogênio das plantas sob salinidade pelo tratamento com prolina, foi também acompanhada por uma redução nos teores de MDA nessas mesmas plantas. Os resultados sugerem, dessa forma, que a prolina exógena, pelo menos em parte, reduziu os danos oxidativos às membranas causados por ROS, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio (AGGARWAL *et al.*, 2010). A redução nos teores de MDA, aqui observada, corrobora com o relatado por outros autores (HUANG *et al.*, 2009; MOUSTAKAS *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2011).

5.2.4. Enzimas do metabolismo da prolina

5.2.4.1. Atividade da sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato

Tanto nas folhas como nas raízes das plantas de milho, sob condições controle e em qualquer tempo de coleta, a atividade da sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5CS) não foi alterada pelo tratamento com prolina (Figura 17). Por outro lado, sem a aplicação exógena de prolina, nesses dois órgãos a atividade dessa enzima foi fortemente aumentada pela salinidade. Nas folhas, sob condições de salinidade o tratamento com prolina exógena reverteu totalmente este aumento (na primeira coleta) ou parcialmente (na segunda coleta) (Figura 17A), contudo o mesmo não aconteceu nas raízes, em que a atividade da P5CS não foi

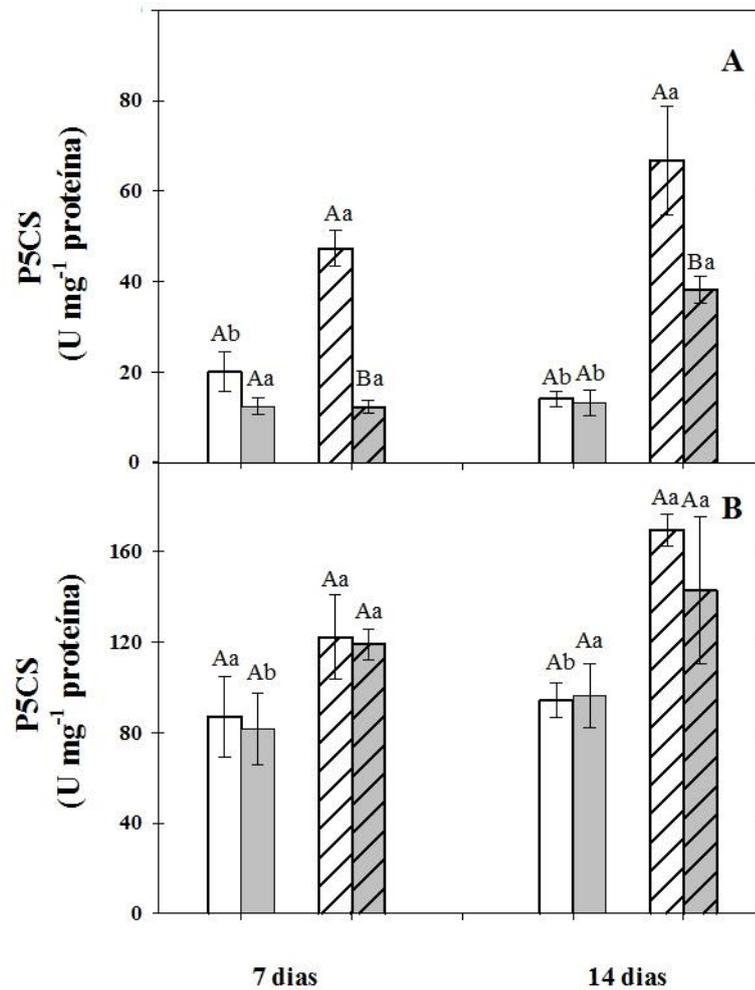


Figura 17. Atividade da sintetase da pirrolina-5-carboxilato (P5CS) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (■) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (■) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

influenciada por esse tratamento (Figura 17B). Em termos absolutos a atividade dessa enzima foi, em média, três vezes maior nas raízes que nas folhas.

Nas folhas, o aumento na atividade da P5CS (enzima da via de síntese da prolina), devido à salinidade, foi concordante com os mais altos teores desse iminoácido em condições salinas, especialmente aos 14 dias do início dos tratamentos (Figura 13A). Nesse mesmo tempo e nessas mesmas condições, a queda na atividade da P5CS pela prolina exógena foi acompanhada de redução nos teores de prolina, fato que não ocorreu aos 7 dias (Figura 17A). Aumentos na atividade da P5CS sob condições de estresse salino foi observado em cactos (SILVA-ORTEGA *et al.*, 2008), *Saussurea amara*, (WANG, *et al.*, 2011) e canola (SAADIA *et al.*, 2012). Comportamento diferente do que ocorreu na segunda coleta, foi observado aos 7 dias de estresse, em que a atividade dessa enzima foi fortemente reduzida pela prolina exógena, porém foi elevado o acúmulo de prolina nos tecidos foliares (Figura 13A). Tais resultados sugerem que nesse tempo a prolina possivelmente não estava sendo utilizada para outros fins biossintéticos, sendo acumulada, por exemplo, para fins de osmoproteção (ASHRAF; FOOLAD, 2007).

De acordo com Verbruggen e Hermans (2008), a P5CS é uma enzima limitante da biossíntese de prolina e está sujeita à inibição por *feedback* por esse iminoácido. Por outro lado, Hong *et al.* (2000) consideram que essa inibição da P5CS desempenha um papel importante no controle do nível de prolina, tanto em condições normais como de estresse osmótico. O aumento na atividade da P5CS nas folhas aos 14 dias de estresse salino (Figura 17A) pode suscitar um aparente paradoxo, pois uma elevação nos teores de prolina (Figura 13A) poderia, possivelmente, inibir a atividade da enzima. Todavia, Hong *et al.* (2000) sugerem que a P5CS pode apresentar uma mudança conformacional durante o estresse salino e perder sua propriedade regulatória.

5.2.4.2. Atividade da desidrogenase da prolina

A atividade da desidrogenase da prolina (PDH), sob condições controle, foi afetada apenas nas folhas das plantas de milho com 7 dias do início dos tratamentos (Figura 18). Nesses órgãos, a atividade da PDH no tratamento controle/prolina foi 110% maior que aquela no tratamento controle/água. Ainda nas folhas, a atividade da PDH foi diminuída pela salinidade nos dois tempos de estresse estudados, porém o tratamento com prolina nessas mesmas plantas causou um forte aumento na atividade dessa enzima (Figura 18A). Em relação ao tratamento salino/água, a atividade da PDH no tratamento salino/prolina foi, em média, 300% maior, levando em conta os dois tempos de coleta. Já nas raízes, o tratamento com prolina somente aumentou a atividade da PDH das plantas sob estresse salino aos 14 dias (Figura 18B). Além disso, em termos absolutos, a atividade da PDH nas raízes foi mais baixa que aquela nas folhas, especialmente, na primeira coleta.

É possível que o aumento em atividade da PDH, nas folhas, em resposta à prolina exógena, ocorra no sentido de evitar concentrações muito elevadas desse iminoácido nas células. Corroborando com esse ponto de vista, Verbruggen e Hermans (2008) observaram que o suprimento exógeno de prolina aumentou consideravelmente a expressão da PDH e, conseqüentemente, sua atividade. Por outro lado, os baixos níveis de atividade da PDH, observado nas plantas sob salinidade e não submetidas ao tratamento com prolina (Figura 18), foram condizentes com os observados por Wang *et al.* (2011), em *Saussurea amara* e Yang *et al.* (2012), em *Nitraria tangutorum*. O aumento em atividade da PDH, nas folhas das plantas sob estresse salino e tratadas com prolina exógena, observado no segundo tempo de coleta (Figura 18A) pode, juntamente com a baixa atividade da P5CS observada nesse mesmo tratamento (Figura 17A), pelo menos em parte, justificar a queda nos teores de prolina das plantas estressadas e tratadas com prolina nesse tempo de coleta (Figura 13A). No entanto, a

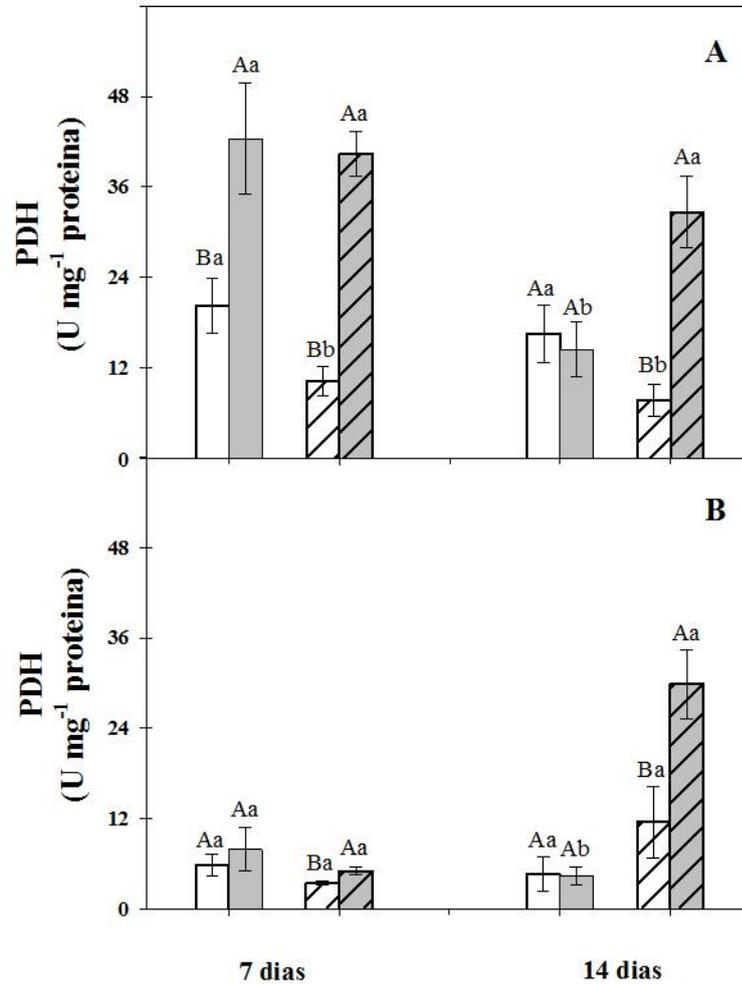


Figura 18. Atividade da desidrogenase da prolina (PDH) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▣) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▣) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

mesma correlação não pode ser feita com os dados observados na primeira coleta, em que as plantas do tratamento salino/prolina apresentaram baixos níveis de atividade da P5CS (Figura 17A) e elevados níveis da PDH (Figura 18A), porém foram elevados os teores de prolina nesse mesmo tratamento (Figura 13A). Já nas raízes, o aumento em atividade da PDH pelo tratamento com prolina nas plantas aos 14 dias sob condições salinas, foi condizente com a queda nos teores de prolina também causada pela prolina exógena, desde que a P5CS não foi alterada por esse tratamento (Figuras 13C, 17B e 18B).

5.2.5. Enzimas de proteção oxidativa

5.2.5.1. Atividade da dismutase do superóxido

Nas plantas de milho, sob condições controle, não foram constatadas diferenças significativas na atividade da dismutase do superóxido (SOD) causadas pelo tratamento com prolina, exceto o aumento de 18% na atividade dessa enzima nas folhas da primeira coleta (Figura 19). Nas folhas, a salinidade, nos dois tempos de estresse estudados, causou aumento na atividade dessa enzima (em média, 15%), o qual foi intensificado pela prolina exógena (Figura 19A). Nas raízes, no entanto, o aumento em atividade da SOD pela salinidade somente ocorreu nas plantas com 14 dias de estresse, o qual também foi intensificado pelo tratamento com prolina (Figura 19B).

A SOD é uma importante enzima do sistema de proteção oxidativa, pois converte o radical superóxido em H_2O_2 e água, estando presente no cloroplasto, mitocôndria, citoplasma, apoplasto e peroxissomo, e é considerada a primeira linha de defesa contra as ROS (GRENE, 2002; ABOGADALLAH, 2010). Jalali-e-Eman *et al.* (2011), trabalhando com genótipos de *Brassica napus*, com diferentes sensibilidades aos sais, observaram aumento em atividade da SOD, sendo tal aumento relacionado à minimização dos efeitos do estresse salino. Dessa

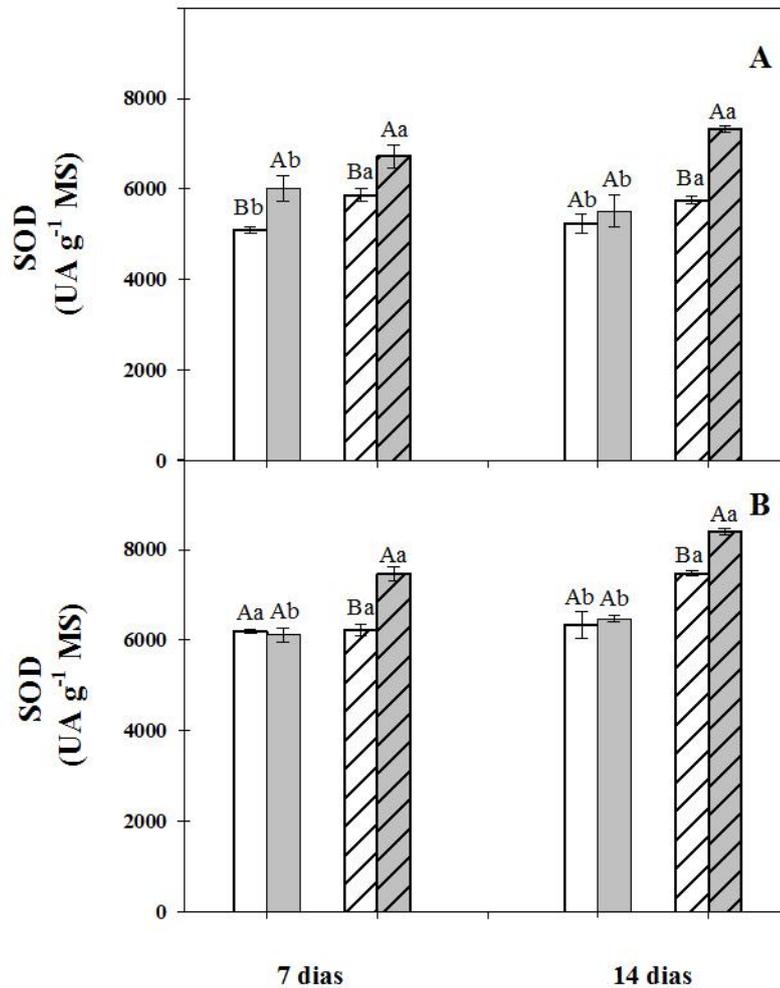


Figura 19. Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▨) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▩) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

forma, o aumento em atividade da SOD nas plantas sob estresse salino e tratadas com prolina, pode ter contribuído para minimizar os efeitos deletérios da salinidade no crescimento, observados no presente trabalho (Figuras 4 e 5). Yan *et al.* (2011), trabalhando com dois cultivares de melão, observaram que a adição de prolina na solução nutritiva, na concentração de 0,2 mM, aumentou a atividade dessa enzima e reduziu os efeitos deletérios da salinidade (NaCl a 100 mM). Sendo da mesma forma, Ben Ahmed *et al.* (2010), trabalhando com *Olea euopeaea*, verificaram que a atividade da SOD foi aumentada quando essas plantas foram submetidas a 200 mM de NaCl e tratadas com prolina a 50 mM na solução nutritiva.

5.2.5.2. Atividade da catalase

Sob condições controle, a atividade da catalase (CAT) nas folhas e em ambos os tempos de estresse, não foi alterada pelo tratamento com prolina (Figura 20A). Já em condições salinas, nesses mesmos órgãos, a atividade da CAT foi diminuída no primeiro tempo de coleta (redução de 55%, em relação ao respectivo controle), porém foi fortemente aumentada no segundo tempo de coleta (70%, em relação ao respectivo controle). O tratamento com prolina foi efetivo em aumentar a atividade da CAT, porém isso somente ocorreu nas plantas com 7 dias de estresse salino, quando o tratamento salino/prolina foi 209% maior que o salino/controle. Ressalte-se que esse aumento em atividade da CAT, pela prolina exógena, fez com que a atividade dessa enzima ficasse com valor igual àquele do respectivo controle (Figura 20A). Nas raízes, por outro lado, não foram detectados níveis significativos da CAT aos 7 dias dos tratamentos, enquanto que aos 14 dias a atividade dessa enzima se mostrou em níveis muito mais baixos que aqueles observados nas folhas e não foi alterada pela salinidade ou pelo tratamento com prolina exógena (Figura 20B).

A CAT exerce um importante papel na proteção oxidativa ao eliminar o peróxido de hidrogênio, produzindo H₂O e O₂. Com isso essa enzima, que é encontrada em diversos

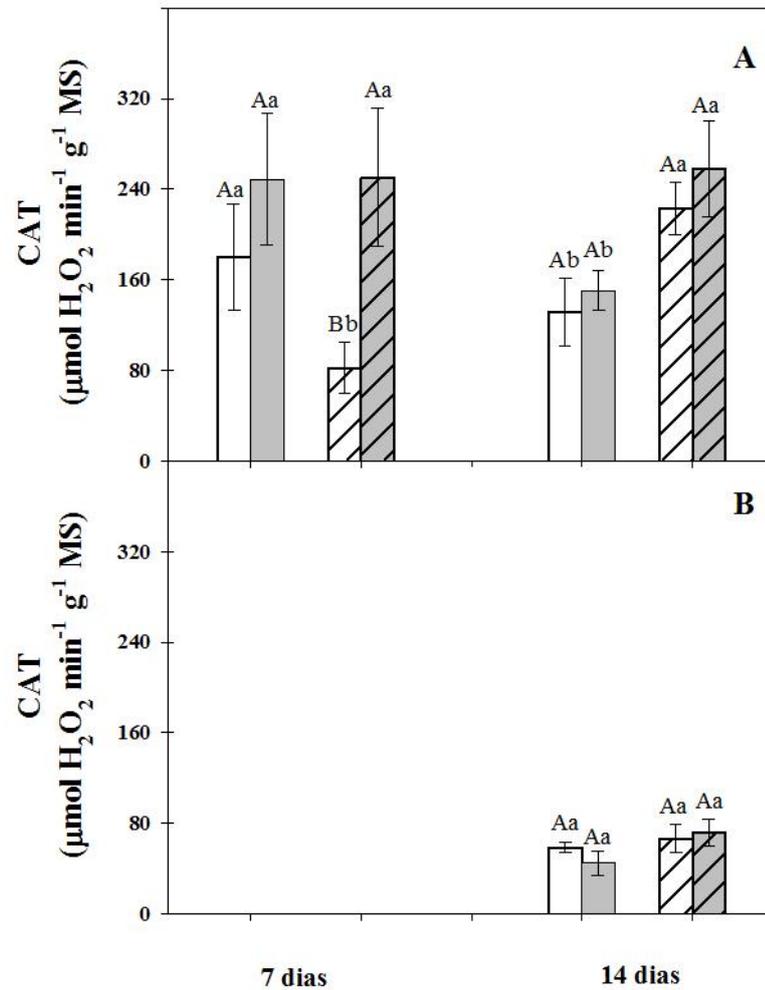


Figura 20. Atividade da catalase (CAT) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (■) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▨) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média \pm o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

compartimentos celulares, como peroxissomos, glioxissomos e organelas relacionadas (GRENE, 2002), evita a formação do radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), o qual causa peroxidação dos lipídios de membranas celulares, afetando, conseqüentemente, o crescimento vegetal (ABOGADALLAH, 2010). Dessa forma, o aumento em atividade da CAT pelo tratamento com prolina, nas folhas, logo aos 7 dias de estresse pode, em parte, ser responsável pelos mais baixos níveis de H_2O_2 e MDA nas plantas do tratamento salino/prolina, em relação tratamento salino/água (Figuras 20A, 15A e 16A). Esse aumento em atividade da CAT pela prolina exógena também foi concordante com os observados por outros autores, em plantas sob condições de estresse salino (HOQUE *et al.*, 2007, em tabaco; MEDEIROS, 2010, em cana-de-açúcar; YAN *et al.*, 2011, em meloeiro). No entanto, ele contrasta com os observados por Ozden *et al.* (2009) que verificaram que a aplicação de prolina em folhas de videira causou diminuição na atividade dessa enzima. Tais resultados sugerem que essa resposta da CAT ao tratamento com prolina depende não apenas da espécie, como do órgão analisado, bem como do tempo de estresse, já que aos 14 dias de estresse a atividade da CAT nas folhas ou nas raízes (Figura 20) não foi afetada pelo tratamento com esse iminoácido.

5.2.5.3. Atividade da peroxidase do ascorbato.

Como observado na figura 21, a atividade da peroxidase do ascorbato (APX), em folhas e raízes, não foi influenciada pelo tratamento com prolina nas plantas de milho sob condições controle ou de estresse salino, e em nenhum dos tempos analisados. Todavia a atividade da APX foi aumentada pela salinidade, tanto nas folhas (Figura 21A) como nas raízes (Figura 21B). Nas folhas da primeira coleta, o aumento em atividade da APX foi, em média, de 182%, em relação aos controles, e na da segunda coleta, o aumento pela salinidade foi, em média, 550%. Já nas raízes, o aumento em atividade da APX pela salinidade foi

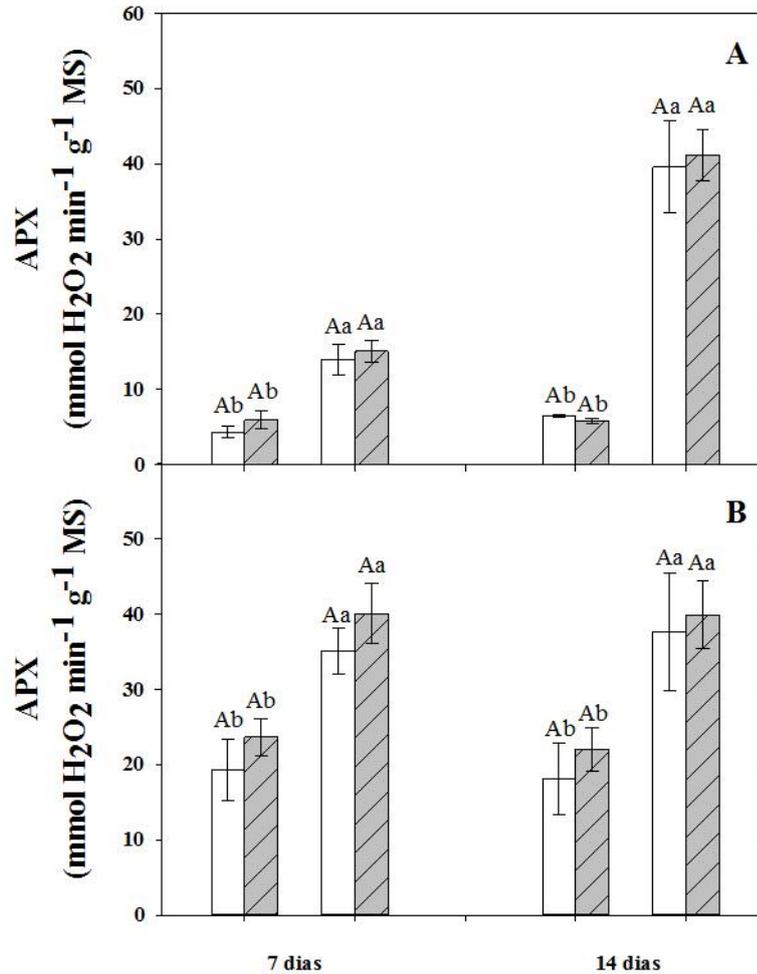


Figura 21. Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▨) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▨) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

aproximadamente o mesmo nos dois tempos de análise, em média, cerca de 85%, em relação aos controles (Figura 21B).

A APX, da mesma forma que a CAT, tem como função eliminar o H_2O_2 , sendo que para isso ela utiliza o ascorbato como doador específico de elétron, reduzindo o peróxido de hidrogênio à água e oxidando o ascorbato a monodesidroascorbato (ASADA, 1997). Aumentos na atividade da APX, pela salinidade, também foram observados por outros autores em diversas espécies (PARIDA; DAS, 2005; CHEN; JIANG, 2010; MANE *et al*, 2012; YADAV *et al*, 2012).

Por outro lado, nossos resultados também foram concordantes como os de Huang *et al*. (2009), em pepino, os quais não detectaram diferenças significativas na atividade da APX pelo tratamento foliar com prolina a 10 mM, nas plantas sob estresse salino. Porém discordam dos encontrados por Noujan *et al*. (2012), em plantas de arroz submetidas à salinidade que observaram um aumento em atividade da APX pelo tratamento das plantas de arroz com prolina a 10 mM, porém essa foi aplicada na solução nutritiva.

5.2.5.4. Atividade da peroxidase do guaiacol

A atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) foi pouco alterada em função do tratamento com prolina, tanto em folhas como em raízes, e nos dois tempos de estresse estudados (Figura 22). Apenas aos 7 dias do início dos tratamentos, é que a atividade da GPX, nas folhas, foi aumentada pela prolina exógena, tanto em condições controle como de salinidade, sendo que o tratamento salino/prolina apresentou atividade cerca de 34% maior que aquela do tratamento salino/água (Figura 22A). Por outro lado, nas folhas das plantas aos 14 dias dos tratamentos, a atividade da GPX foi fortemente estimulada pela salinidade. Em média, as plantas dos tratamentos salino (salino/água e salino/prolina) apresentaram um valor

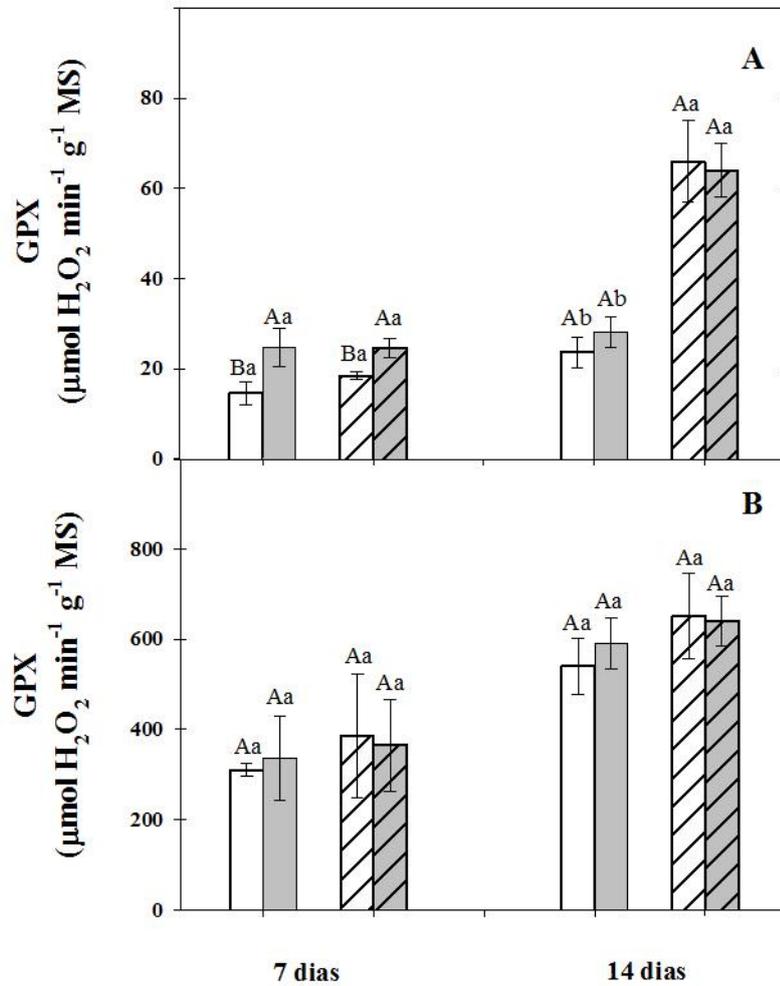


Figura 22. Atividade da peroxidase do guaiacol (GPX) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▣) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▣) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo tempo de coleta, diferenças significativas decorrentes do estresse salino são indicadas por letras minúsculas e diferenças significativas em função do tratamento com prolina são indicadas por letras maiúsculas utilizando o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

de atividade da GPX, nas folhas, 182% maior que aquela dos controles (Figura 22A). Já nas raízes, a atividade da GPX não foi alterada pela salinidade, embora a atividade dessa enzima tenha se mostrado muito maior do que aquela das folhas, sendo, em média, 13 vezes maior (Figura 22B). Tanto nas folhas quanto nas raízes, observa-se que a atividade da GPX aumentou da primeira para a segunda coleta, especialmente nas plantas sob condições de salinidade.

A GPX, da mesma forma que a CAT e a APX, atua na proteção contra o estresse oxidativo eliminando o H_2O_2 , em uma reação envolvendo o guaiacol (BRAY *et al.*, 2000). Portanto, o grande aumento em atividade dessa enzima nas folhas das plantas de milho sob salinidade, observado aos 14 dias dos tratamentos (Figura 22A), ocorreu, provavelmente, como uma reação da planta para reduzir os níveis de H_2O_2 que, como visto, se elevam em condições de salinidade (Figura 15A). Costa *et al.* (2005), trabalhando com dois genótipos de sorgo sob condições de salinidade, observaram que no mais tolerante houve um aumento na atividade da GPX, enquanto no mais sensível a atividade diminuiu. Diferentemente do aqui observado, Hossain e Fujita (2010) estudando os efeitos do tratamento com prolina a 15 mM na solução nutritiva, em plantas de *Vigna radiata* sob condições salinas, verificaram um significativo aumento na atividade da GPX logo nos três primeiros dias de estresse. Também, o tratamento com prolina a 10 mM na solução nutritiva foi eficiente em elevar a atividade da GPX em plantas de arroz sob condições de salinidade (NOUJAN *et al.*, 2012).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o trabalho tenha sido apresentado como dois experimentos, na verdade eles foram idênticos, apenas com objetivos diferentes e para evitar os problemas envolvidos em se trabalhar com um grande número de plantas simultaneamente. Para que as condições ambientais dos dois experimentos fossem as mais próximas possíveis, logo após a coleta do primeiro experimento o segundo foi instalado. É importante ressaltar que, inicialmente, foram feitos alguns testes preliminares para se escolher a melhor concentração de prolina a ser utilizada nos experimentos definitivos.

Inicialmente, demonstrou-se que a pulverização foliar das plantas de milho com prolina a 30 mM foi eficiente em reduzir os efeitos do estresse salino no crescimento das plantas, especialmente naquelas da segunda coleta (aos 14 dias dos tratamentos). Isso foi comprovado pelas determinações de massas secas e área foliar das plantas, que foram reduzidas pela salinidade, mas que o tratamento com prolina exógena reverteu parcialmente esse efeito.

Para esclarecer essa ação benéfica da prolina exógena no crescimento, algumas análises fisiológicas, químicas e bioquímicas foram realizadas nas diversas partes das plantas de milho (folhas, colmos + bainhas e raízes). Estudando-se os solutos inorgânicos, foi constatado que a prolina exógena exerceu um efeito benéfico, reduzindo o acúmulo de íons tóxicos (Na^+ e Cl^-) nas folhas e revertendo, em parte, a grande redução na relação K^+/Na^+ , causada pela salinidade na parte aérea das plantas de milho.

Um resultado bastante significativo foi obtido com relação às proteínas solúveis, quando se constatou que o tratamento com prolina foi muito eficiente em reverter as quedas nos teores de proteínas solúveis na parte aérea pela salinidade, resposta bastante comum à

salinidade, além de ter causado significativo aumento nas raízes. Com relação aos solutos orgânicos, constatou-se que o tratamento com prolina reduziu significativamente o acúmulo de carboidratos solúveis, pela salinidade, em todos os órgãos estudados das plantas de milho, porém isso somente foi observado na segunda coleta. Por outro lado, enquanto nas raízes os N-aminossolúveis foram pouco afetados pela salinidade e a prolina exógena não exerceu qualquer efeito, nas folhas esse tratamento intensificou o acúmulo desses solutos pela salinidade, porém isso ocorreu apenas na segunda coleta. Já, nos colmos + bainhas, o tratamento com prolina reverteu totalmente a queda no acúmulo de N-aminossolúveis pela salinidade, porém apenas na primeira coleta (aos 7 dias dos tratamentos). O tratamento com prolina exógena, por si só, induziu aumentos nos teores de prolina dos tecidos da parte aérea, o que ficou demonstrado pelo aumento observado nas plantas mesmo sob condições controle. No entanto, de forma inesperada, enquanto esse tratamento, na primeira coleta, intensificou o aumento nos teores de prolina pela salinidade, na segunda coleta ele causou uma redução. É interessante observar que a prolina usada no tratamento se encontrava numa concentração relativamente alta (30 mM), porém os aumentos nos teores desse iminoácido nos tecidos foliares foram relativamente pequenos, o que sugere que a prolina pulverizada nas folhas não entrou completamente nas folhas ou então que ao entrar nas células tenha sido rapidamente metabolizada. Portanto, as respostas das plantas à prolina exógena sobre o acúmulo de solutos orgânicos dependeram, não só do tempo de coleta analisado, mas também do órgão estudado, o que dificulta o entendimento de seu papel nas condições osmóticas da planta.

Tendo em vista que diferentes autores têm demonstrado que a salinidade gera um estresse oxidativo, investigamos o efeito da aplicação foliar de prolina nas plantas de milho sobre os teores de peróxido de hidrogênio, uma ROS, bem como seus efeitos no acúmulo de malondialdeído, um indicador de danos oxidativos às membranas. Os resultados mostraram

de forma inequívoca, tanto nas folhas como nas raízes e nos dois tempos de coleta analisados, que o tratamento com prolina exógena além reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio, que são aumentados pela salinidade, também reduziu o acúmulo de malondialdeído, demonstrando, portanto, um efeito benéfico em minorar o estresse oxidativo causado pelo estresse salino.

Analisando o sistema enzimático de proteção contra o estresse oxidativo, resultado bastante significativo foi observado com relação à dismutase do superóxido e à catalase. Tanto nas folhas como nas raízes, a dismutase do superóxido teve sua atividade aumentada pela salinidade e a prolina exógena amplificou esse efeito, o que pode ter contribuído para minimizar o estresse oxidativo causado pelo radical superóxido, ânion que é extremamente danoso aos sistemas biológicos. Por outro lado, a catalase, que se mostrou a principal eliminadora de peróxido de hidrogênio nas folhas, teve grande redução em sua atividade pela salinidade na primeira semana de estresse salino, porém o tratamento com prolina exógena foi eficiente em reverter completamente esta queda em atividade, o que muito provavelmente contribuiu para minorar eventuais danos oxidativos causados por essa ROS.

Numa outra etapa do trabalho, na tentativa de esclarecer os efeitos da prolina exógena nos níveis de prolina endógena, foram estudadas duas principais enzimas do metabolismo da prolina: uma da via de síntese, a sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato e outra da via catábólica, a desidrogenase da prolina. Esta última, nas folhas, teve sua atividade fortemente estimulada pela prolina exógena, tanto em condições controle como de estresse salino, o que deve ter contribuído para limitar a concentração de prolina no interior dos tecidos. Essa enzima teve sua atividade grandemente reduzida pela salinidade, mas o tratamento com prolina exógena foi eficaz em reverter essa inibição. Por outro lado, compatível com o comportamento de uma enzima da via de síntese da prolina, a sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-

carboxilato, que foi estimulada pela salinidade, teve sua atividade fortemente reduzida pelo tratamento com prolina exógena. Esses resultados foram concordantes com a queda nos níveis de prolina nas folhas das plantas da segunda coleta, provocada pelo tratamento com prolina, porém não explicam o grande estímulo nos níveis de prolina por esse mesmo tratamento na primeira coleta. Portanto, os resultados obtidos demonstram a complexidade das respostas das plantas de milho ao tratamento com prolina exógena, principalmente com relação ao metabolismo da prolina, e sinalizam que mais estudos são necessários para aumentar nossa compreensão o verdadeiro papel da prolina em plantas sob condições de estresse salino.

7. CONCLUSÕES

- A aplicação foliar com prolina a 30 mM foi eficiente em minorar os efeitos deletérios da salinidade no crescimento das plantas de milho, especialmente aos 14 dias de estresse;
- Na parte aérea das plantas de milho, aos 14 dias de estresse, a grande diminuição na relação K^+/Na^+ pela salinidade, foi parcialmente revertida pela prolina exógena, bem como o grande acúmulo dos íons tóxicos (Na^+ e Cl^-) nas folhas foi parcialmente reduzido;
- Na parte aérea, o tratamento com prolina reverteu a redução nos teores de proteínas solúveis, pela salinidade, enquanto nas raízes esses teores foram aumentados a níveis maiores do que os dos próprios controles.
- Os teores de carboidratos solúveis que, de modo geral, foram maiores sob condições de salinidade, nas plantas de milho aos 14 dias de estresse e que foram tratadas com prolina, eles foram menores. Os teores de N-aminossolúveis, de modo geral, foram pouco influenciados pela prolina exógena. Os teores de prolina, na parte aérea das plantas da primeira coleta foram aumentados, tanto em condições controle como de salinidade, pela aplicação foliar de prolina, porém esse tratamento causou diminuição nos teores desse iminoácido nas folhas das plantas da segunda coleta;
- As trocas gasosas foram, de modo geral, reduzidas pela salinidade e a prolina exógena pouco influenciou nesses parâmetros, exceto a taxa de transpiração que foi levemente aumentada;
- O aumento nos teores de H_2O_2 pela salinidade, nas folhas e raízes, foi acompanhado por aumentos nos teores de malondialdeído, sendo ambos os efeitos parcialmente reduzidos pela aplicação foliar de prolina das plantas de milho;
- O tratamento com prolina exógena pouco influenciou nas atividades das enzimas APX e GPX, porém ele aumentou as da SOD e, especialmente a da CAT, revertendo completamente

a redução em sua atividade pela salinidade, nas folhas aos 7 dias dos tratamentos, contribuindo para a redução dos teores de H_2O_2 e dos danos de membranas;

- Nas folhas, sob condições de salinidade, a atividade da P5CS foi fortemente aumentada pela salinidade e o tratamento com prolina exógena causou forte redução nessa atividade, o que sugere inibição de sua síntese por excesso de prolina;

- Nas folhas, aos 7 dias dos tratamentos, a atividade da PDH foi fortemente estimulada pelo tratamento com prolina, tanto em condições controle como de estresse salino, demonstrando que essa enzima é induzida pelo excesso de prolina nos tecidos;

- Nas folhas, aos 14 dias dos tratamentos, foi possível observar-se um padrão consistente entre os níveis de prolina nos tecidos e as alterações nas atividades das duas enzimas do metabolismo da prolina, a PC5CS e a PDH, entretanto o mesmo não pôde ser observado com relação às plantas de milho aos 7 dias de estresse salino.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOGADALLAH, G. M. Antioxidative defense under salt stress. **Plant Signaling and Behavior**. v. 5, n. 4, p. 369–74, 2010.

AGGARWAL, M.; SHARMA, S.; KAUR, N.; PATHANIA, D.; BHANDHARI, K.; KAUSHAL, N.; KAUR, R.; et al. Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimising oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Biological Trace Element Research**. v. 140, n. 3, p. 354–67, 2011.

ALI, Q., ASHRAF, M.; SHAHBAZ, M. Ameliorating effect of foliar applied proline on nutrient uptake in water stressed maize (*Zea mays* L.) plants. **Pakistan Journal Of Botany**. v. 40, p. 211–219, 2008.

ALI, Y.; ASLAM, Z.; ASHRAF, M. Y.; TAHIR, G. R. Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield components of rice genotypes grown under saline environment. **International Journal of Enviomental Science and Technology**. v. 1, p. 221–225, 2004.

ASADA, K. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase in H₂O₂ scavenging in plants. In: SCANDALIOS, J. G. **Oxidative stress and molecular biology of antioxidant defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 715-735, 1997.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, p. 206–216, 2007.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant Science**, v. 166, p. 3–16, 2005.

AZEVEDO NETO, A. D. *et al.* Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 31-38, 2004.

BARROS, M.de F.C.; FONTES, M. P. F.; RUIZ, H. A.; ALVAREZ, V. V. H. Recuperação de solos afetados por sais no Nordeste do Brasil pela aplicação de gesso de jazida e calcário.

Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. Campina Grande; v.8, p.59 - 64, 2004a.

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.

BAYUELO-JIMÉNEZ, J. S.; JASSO-PLATA, N.; OCHOA, I. Growth and Physiological Responses of Phaseolus Species to Salinity Stress. **International Journal of Agronomy**. 13p., 2012.

BEAUCHAMP, C.; FRICOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and na assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p 276 – 287, 1971.

BEN AHMED, C.; BEN ROUINA, B.; SENSOY, S.; BOUKHRISS, M.; BEN ABDULLAH, F. Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 4216–4222, 2010.

BEN AHMED, C.; MAGDICH, S.; BEN ROUINA, B.; SENSOY, S.; BOUKHRIS, M.; BEN ABDULLAH, F. Exogenous proline effects on water relations and ions contents in leaves and roots of young olive. **Amino Acids**, v. 40, p. 565–573, 2011.

BISPO, N. B. Progresso genético e caracterização fenotípica e molecular em **híbridos de milho provenientes de diferentes programas de melhoramento genético**. 2007, 66 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BLANCO, F.F. **Tolerância do pepino enxertado à salinidade em ambiente protegido e controle da salinização do solo**. 1999. Piracicaba: USP/ESALQ, 104p. (Dissertação Mestrado).

BOHNERT, H.J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, v. 78, p. 237-60, 1999.

BLUMWALD, E.; AHARON, G.S.; APSE, M.P. Sodium transport in plant cells. **Biochemica et Biophysica Acta**. v. 1465, p. 140-151, 2000.

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.

BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: ASPP, p.1158 – 1203. 2000.

BRINI, F.; MASMOUDI, K.; Ion transporters and abiotic stress tolerance in plants. **ISRN Molecular Biology**, 13p., 2012.

BURRITT, D. J. **Proline and the Cryopreservation of Plant Tissues: Functions and Practical Applications**, 17p., 2012.

CHINNUSAMY, V.; JAGENDORF, A.; ZHU J.K. Understanding and improving salt tolerance in plants. **Crop Science**. v. 45, p. 437 – 448, 2005.

CHEN, Z.; ZHOU, M.; NEWMAN, I.A.; SHABALA, S. Potassium and sodium relations in salinized barley tissues as a basis of differential salt tolerance, **Functional Plant Biology**, v. 34, p. 150 – 162, 2007.

CHENG, H.; JIANG, J.-G. Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. **Environmental Reviews**, v. 18, p. 309–319, 2010.

CLARCK, R.B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of agriculture and food chemistry**, v.23, p.458-460, 1975.

COSTA, P.H.A.; AZEVEDO-NETO, A.D.; BEZERRA, M.A.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 17, p. 353-361, 2005.

CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC plant biology**, v. 11, p. 163, 2011.

CUIN, T.A.; SHABALA, S. Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, p. 875 – 885, 2007.

DELAUNEY, A.J.; VERMA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **Plant Journal**. v. 4, p. 215–223, 1993.

DEUSCHLE, K.; FUNCK, D.; HELLMANN, H.; DASCHNER, K.; BINDER, S.; FROMMER, W.B. A nuclear gene encoding mitochondrial D1-pyrroline- 5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. **Plant Journal**. v. 27, p. 345–355, 2001.

DJILIANOV, D.; GEORGIEVA, T.; MOYANKOVA, D.; ATANASSOV, A.; SHINOZAKI, K.; SMEEKEN, S.C.M.; VERMA, D.P.S.; MURATA, N. Improved abiotic stress tolerance in plants by accumulation of osmoprotectants - gene transfer approach. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**. v. 19, p. 63–71, 2005.

DOGANLAR, Z. B.; DEMIR, K.; BASAK, H.; GUL, I. Effects of salt stress on pigment and total soluble protein contents of three different tomato cultivars. **African Journal of Agricultural Research**. v. 5, p. 2056–2065, 2010.

DUARTE, A.P.; MARTINS, A.C.N.; BRUNINI, O.; CANTARELLA, H.; DEUBER, R.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; TSUNECHIRO, A.; SAWAZAKI, E.; DENUCCL, S.; FANTIN, G.M.; RECO, P.C. **Milho Safrinha; técnicas para o cultivo no Estado de São Paulo**. Campinas: CATI, 2000. 16p. (Documento Técnico, 113).

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350 – 356, 1956.

EL-SAMAD, H. M. A.; SHADDAD, M. A. K.; BARAKAT, N. Improvement of plants salt tolerance by exogenous application of amino acids. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 5, p. 5692–5699, 2011.

FALAKNAZ, M.; HEIDARI, P.; MEHRABI, A.A.; KAHRIZI, D.; YARI, K. Phylogeny of 1-Pyrroline-5-Carboxylate Synthase (P5CS) Gene in Differential Spices of Plant using cDNA AFLP Analysis. **American Journal of Scientific Research**. v. 19, p. 13–21, 2011.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 2006. TerraSTAT database. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agl/agll/terrastat/>> Acesso em 05 de Março de 2013.

FUJITA, T.; MAGGIO, A.; GARCIA-RIOS, M.; BRESSAN, R. A.; CSONKA, L. N. Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for Delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. **Plant physiology**. v. 118, p. 661–74, 1998.

GAINES, M T. P.; PARKER, M.B.; GASCHO, G. J. Automated determination of chlorides in soil and plant tissue by sodium nitrate, *Agronomy Journal*, v. 76, p. 371 – 374, 1984.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxides dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309 – 314, 1977.

GRENE, R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. **The Arabidopsis book**. American Society of Plant Biologists, 20p., 2002.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; van STADEN, J. A regulatory role for proline metabolism in stimulating *Arabidopsis thaliana* seed germination. **Plant Growth Regulation**. v. 30, p. 41–50, 2003.

HARVIR, E.A.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450 – 455, 1987.

HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; ZHU, J. K.; BOHNERT, H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 463 -499, 2000.

HEUER, B. Influence of exogenous application of proline and glycinebetaine on growth of salt-stressed tomato plants. **Plant Science**. v. 165, p. 693 – 699, 2003.

HONG, Z.; LAKKINENI, K.; ZHANG, Z.; VERMA, D. P. Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant physiology**, v. 122, p. 1129–1136, 2000.

HOQUE, M. A.; OKUMA, E.; BANU, M. N. A.; NAKAMURA, Y.; SHIMOISHI, Y.; MURATA, Y. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. **Journal Of Plant Physiology**. v. 164, p. 553–61, 2007.

HOSSAIN, M. A.; FUJITA, M. Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**. v. 16, p. 19–29, 2010.

HUANG, Y.; BIE, Z.; LIU, Z.; ZHEN, A.; WANG, W. Protective role of proline against salt stress is partially related to the improvement of water status and peroxidase enzyme activity in cucumber. **Soil Science and Plant Nutrition**. v. 55, p. 698–704, 2009.

HUSSAIN, K.; MAJEED, A.; NAWAZ, K.; BHATTI, K.H.; NISAR, F.K. Effect of Different Levels of Salinity on Growth and Ion Contents of Black Seeds (*Nigella sativa* L.). *Current Research Journal Biological Science*. v. 1, p. 135 – 138, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estatística da produção agrícola**, 2013.

JALALI-E-EMAM, S. M. S.; ALIZADEH, B.; ZAEFIZADEH, M.; ZAKARYA, R. A.; Khayatnezhad, M. Superoxide Dismutase (SOD) Activity in NaCl Stress in Salt-Sensitive and Salt-Tolerance Genotypes of Colza (*Brassica napus* L.). **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 7, p. 7–11, 2011.

KAPLAN F.; KOPKA J.; SUNG D.Y.; ZHAO W.; POPP M.; PORAT R.; GUY C.L. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. **The Plant Journal**. v. 50, p. 967–981, 2007.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315 – 319, 1976.

KATERJI, N.; VAN HOORN, J.; HAMDY, A.; MASTRORILLI, M. Salinity effect on crop development and yield, analysis of salt tolerance according to several classification methods. **Agricultural Water Management**, v. 62, p. 37–66, 2003.

KHAN, M.A.; ANSARI, R.; ALI,H.; GUL, B.; NIELSEN, B.L. *Panicum turgidum*: a sustainable feed alternative for cattle in saline areas. **Agricultural Ecosystems Environment**, v. 129, p. 542 – 546, 2009.

KHEDR, A. H. A. ABBAS, M. A.; WAHID, A. A.; QUICK, W. P.; ABOGADALLAH, G. M. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. **Journal of experimental botany**, v. 54, p. 2553–2562, 2003.

KISHOR, P. B. K.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; LAXMI, P. S.; NAIDU, K. R., RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; *et al.* Regulation of proline biosynthesis , degradation , uptake and transport in higher plants : Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance, **Current Science**, v. 88, p. 424 – 438, 2005.

KRONZUCKER, H. J.; BRITTO, D. T. Sodium transport in plants : a critical review, **New Phytologist**, v. 189, p. 54–81, 2011.

KUMAR, V.; SHARMA, D.R. Effect of exogenous proline on growth and ion content in NaCl stressed and nonstressed cells of mungbean, *Vigna radiata* var. radiata. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 27, p. 813–815, 1989.

LACERDA, F.H.D.; PEREIRA, F.H.F.; NEVES, D.S.; BORGES, F.Q.C; CAMPOS JUNIOR, J.E. Aplicação exógena de prolina na redução de estresse salino em meloeiro. **Revista verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. 2012.

LÄUCHLI, A.; GRATTAN, S. R. **Chapter 1: plant growth and development under salinity stress**, p. 1–32, 2007.

LAUCHLI, A.; LUTTGE, U. **Salinity in the soil environment**. In *Salinity: Environment-plants-molecules*. Edited by K.K. Tanji. Boston Kluwer Academic Publishers Boston. p. 21–23, 2002.

LAWLOR, D.W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**. v. 25p. 275-294, 2002.

LEHMANN, S.; FUNCK, D.; SZABADOS, L.; RENTSCH, D. Proline metabolism and transport in plant development. **Amino acids**, v. 39, p. 949–62, 2010.

LLESUY, S.F. **Introducción y espécies activas de oxigênio**. In: MARRONI, N. P. (org.). *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. Canoas: Ed. ULBRA, 2002, p.21-32.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S.A. DE. **Avaliação do estudo nutricional das plantas, princípios e aplicações**. Piracicaba, SP. Associação Brasileira de Pesquisa da Potassa e do Fosfato. 1989.

MANE A. V.; DESHPANDE T.V.; WAGH V.B.; KARADGE B. A.; SAMANT J. S. A critical review on physiological changes associated with reference to salinity. **International Journal of Environmental Sciences**. v. 1, p. 1192–1216 ,2011.

MANSOUR, M.M.F. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum** v. 43, p. 491–500, 2000.

MATTIOLI, R.; COSTANTINO, P.; TROVATO, M. Proline accumulation in plants: not only stress. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4, p. 1016–1018, 2009.

MEDEIROS, M.J.L. **Ação da prolina exógena no cultivo in vitro de genótipos de cana-de-açúcar submetidos ao estresse**. 2010. 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.

METTERNICHT, G.; ZINCK, J. Remote sensing of soil salinity: potentials and onstraints. **Remote Sensing of Environment**. v. 85, p. 1–20, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), **Brasil, Projeções do agronegócio 2011/2012 a 2021/2022**, 2012, 50 p., Acessoria de Gestão

Estratégica, Disponível em:
<[http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20\(2\)\(1\).pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/gestao/projecao/Projecoes%20do%20Agronegocio%20Brasil%202011-20012%20a%202021-2022%20(2)(1).pdf)> Acesso em 15, março, 2013.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V.B.; VAND EPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends in Plant Science**. v. 16, p. 300-309, 2011.

MOUSTAKAS, M.; SPERDOULI, I.; KOUNA, T.; ANTONOPOULOU, C.-I.; THERIOS, I. Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of Arabidopsis thaliana leaves. **Plant Growth Regulation**. v. 65, p. 315–325, 2011.

MUNNS, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytology**. v. 167, p. 645 – 663, 2005.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 651 – 681, 2008.

NAM, M. H.; HUH, S. M.; KIM, K. M.; PARK, W. J.; SEO, J. B.; CHO, K.; KIM, D. Y.; et al. Comparative proteomic analysis of early salt stress-responsive proteins in roots of SnRK2 transgenic rice. **Proteome Science**. v. 10, 25p., 2012.

NEILL, S. et al. Hydrogen peroxide signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 388 – 395, 2002.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOUNJAN, N.; NGHIA, P. T.; THEERAKULPISUT, P. Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. **Journal of plant physiology**. v. 169, p. 596–604, 2012.

NOUNJAN, N.; THEERAKULPISUT, P. Effects of exogenous proline and trehalose on physiological responses in rice seedlings during salt-stress and after recovery. **Plant Soil Environment**. v. 2012, p. 309–315, 2012.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867 – 880, 1981.

NUCCIO, M.L.; RHODES, D.; MCNEIL, S.D.; HANSON, A.D. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. **Current Opinion Plant Biology**, v. 2, p. 128 – 134, 1999.

ORCUTT, D.M.; NILSEN, E.T. *Physiology of Plants Under Stress*. **New York, John Wiley & Sons**, 2000.

OZDEN, M.; DEMIREL, U.; KAHRAMAN, A. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. **Scientia Horticulturae**. v. 119, p. 163-168, 2009.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos dos Grãos do Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 2006. 6 p. (Circular Técnica n. 75).

PANG, C.A.; WANG, B. Oxidative Stress and Salt Tolerance in Plants. **Progress in Botany**. v. 69, p. 231 – 246, 2008.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B.; MOHANTY, P. Salt-stress induced alterations in protein profile and protease activity in the mangrove *Bruguiera parviflora*. *Zeitschrift für Naturforschung. C. Journal of biosciences*, v. 59, p. 408–14, 2004.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 60, p. 324–49, 2005.

PATTANAGUL, W.; THITISAKSAKUL, M. Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 46, p. 736–742, 2008.

PÉREZ-ARELLANO, I.; CARMONA-ALVAREZ, F.; MARTÍNEZ, A. I.; RODRÍGUEZ-DÍAZ, J.; CERVERA, J. Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: from

osmotolerance to rare metabolic disease. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 19, p. 372–82, 2010.

PRASSAD, P. V. D.; POTLURI, S. D. P. Influence Of Proline And Hydroxyproline On Salt-Stressed Axillary Bud Cultures Of Two Varieties Of Potato (*Solanum tuberosum*). **In Vitro Cellular and Developmental Biology**. v. 32, p. 47 – 50, 1996.

REDDY, A.R.; CHAITANYA, K.V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 16 p. 1189-1202, 2004.

RAMEEH, V.; CHERATI, A.; ABBASZADEH, F. Relationship between Seed Yield and Shoot Ions at Vegetative and Reproductive Stages of Rapeseed Genotypes under Saline Environment. **International Journal of Plant Research**. v. 2, p. 61–64, 2012.

RICHARDS, R.A. (Ed.) **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Washington: US Department of Agriculture, Handbook n° 60, 1954. 160p.

ROSTAGNO H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 2005 2 ed. Viçosa: UFV, Departamento de Zootecnia, 186p.

SAADIA, M.; JAMIL, A.; AKRAM, N. A.; ASHRAF, M. A study of proline metabolism in canola (*Brassica napus* L.) seedlings under salt stress. **Molecules**, v. 17, p. 5803–5815, 2012.

SAHI, C.; SINGH, A.; BLUMWALD, E.; GROVER, A. Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. **Physiologia Plantarum**, v.127, p. 1-9, 2006.

SAIRAM, R. K.; TYAGI, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants, **Current Science**. v. 86, p. 407–421, 2004.

SAKURABA, H.; TAKAMATSU, Y.; SATOMURA, T.; KAWAKAMI, R. Purification, Characterization , and Application of a Novel Dye- Linked L -Proline Dehydrogenase from a Hyperthermophilic Archaeon , *Thermococcus profundus*, **Applied and Enviromental Microbiology**. v. 67, p. 1470–1475, 2001.

SATOH, R.; NAKASHIMA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ACTCAT, a novel cis-acting element for proline- and hypoosmolarity-responsive expression of the ProDH gene encoding proline dehydrogenase in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v. 130, p. 709-719, 2002.

SHABALA, S. Ionic and osmotic components of salt stress specifically modulate net ion fluxes from bean leaf mesophyll. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 825–837, 2000.

SILVA-ORTEGA, C. O.; OCHOA-ALFARO, A. E.; REYES-AGÜERO, J. A.; AGUADO-SANTACRUZ, G. A.; JIMÉNEZ-BREMONT, J. F. Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. **Plant physiology and biochemistry**. p. 46, p. 82–92, 2009.

SILVA, Ê. F. F. **Avaliação da eficiência de diversos produtos na recuperação de um solo salino-sódico e seus efeitos na cultura de arroz (*Oryza sativa* L.)**. Campina Grande, PB, 1997. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal da Paraíba

SILVEIRA, J. A. G.; SILVA, S. L. F.; SILVA, E. N.; VIÉGAS, R. A. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados**. Fortaleza, CE: INCT Sal, 2010, v. 1, p. 166 – 185.

SOBAHAN, M. A.; AKTER, N.; OHNO, M.; OKUMA, E.; HIRAI, Y.; MORI, I. C.; NAKAMURA, Y.; et al. Effects of Exogenous Proline and Glycinebetaine on the Salt Tolerance of Rice Cultivars. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 76, n. 8, p. 1568–1570, 2012.

STINES, A. P.; NAYLOR, D. J.; HØJ, P. B.; VAN HEESWIJCK, R. Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. **Plant physiology**. v. 120, p. 923 - 931 1999.

STNINSKA, J.; KOPECNY, D.; TYLICHOWA, M.; SNEGAROFF, J.; SEBELA, M. Ornithine o-aminotransferase: an enzyme implicated in salt tolerance in higher plants. **Plant and Signal Behavior**, v. 3, p. 929 – 935, 2008.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in plant science**, v. 15, p. 89–97, 2010.

SZÉKELY, G.; ABRAHÁM, E.; CSÉPO, A.; RIGÓ, G.; ZSIGMOND, L.; CSISZÁR, J. AYAYDIN, F.; STRIZHOV, N.; JÁSIK, J.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **The Plant Journal**, v. 53, p. 11–28, 2008.

TESTER, M.; BACIC, A. Abiotic stress tolerance in grasses from model plants to crop plants. **Plant Physiology**. v. 137, p. 791–793, 2005.

TOPPA, E.V.B.; BRAMBRILLA, W.P.; O melhoramento de plantas e a salinidade dos solos. Revista Verde De **Agroecologia E Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde De Agricultura Alternativa**. v. 6, p. 21–25, 2011.

TURNER, N.C.; ABBO, S.; BERGER, J.D.; CHATURVEDI, S.K.; FRENCH, R.J.; LUDWIG, C.; MANNUR, D.M.; SINGH, S.J.; YADAVA, H.S. Osmotic adjustment in chickpea (*Cicer arietinum* L.) results in no yield benefit under terminal drought. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 187–194, 2007.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59 – 66, 2000.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino acids**, v. 35, p. 753–759, 2008.

VERSLUES, P. E.; SHARMA, S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. **The Arabidopsis Book**. v. 8, p. 23p., 2010.

WANG, K.; LIU, Y.; DONG, K.; DONG, J.; KANG, J.; YANG, Q. The effect of NaCl on proline metabolism in *Saussurea amara* seedlings, **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 2886–2893, 2011.

WANG, M; ZHENG, Q.; SHEN, Q.; GUO, S. The critical role of potassium in plant stress response. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 7370 – 7390, 2013.

WILLADINO, L.; CAMARA, T.R. Aspectos fisiológicos do estresse salino em plantas. In: NOGUEIRA, R.J.M.C.; ARAÚJO, E. DE L.; WILLADINO, L.; CAVALCANTE, U.M.T. (eds). **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife. MXM Gráfica e Editora. parte.II, cap. 10, p. 118 – 126, 2005.

YADAV, S.; IRFAN, M.; AHMAD, A.; HAYAT, S. Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *Journal of environmental biology*. **Academy of Environmental Biology**. v.32, p. 667–685, 2011.

YAMADA, M., MORISHITA, H., URANO, K., SHIOZAKI, N., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress, **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p.1975–1981, 2005.

YAN, Z.; GUO, S.; SHU, S.; SUN, J.; TEZUKA, T. Effects of proline on photosynthesis, root reactive oxygen species (ROS) metabolism in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.) under NaCl stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 18381–18390, 2011.

YANG, Y.; YANG, F.; LI, X.; SHI, R.; LU, J. Signal regulation of proline metabolism in callus of the halophyte *Nitraria tangutorum* Bobr. grown under salinity stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**. v. 1121, p. 33–42, 2012.

YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. **Plant and Cell Physiology**, v. 38, p. 1095–1102, 1997.

YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p. 209-213, 1955.

YOKOI, S.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Salt Stress Tolerance of Plants, **Japan International Research Center of Agricultural Sciences**. p. 25–33, 2002.

ZAKHARIN, A. A.; PANICHKIN, L.A. Glycophyte salt resistance. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 56, p. 94–103, 2009.

ZHANG, C.S.; LU, Q.; VERMA, D.P.S. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry** v. 270, p. 20491 – 20496, 1995.

ZHANG, Z.; QIANG, L. I. U.; HAI-XING, S.; XIANG-MIN, R. Responses of different rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to salt stress and relation to carbohydrate metabolism and chlorophyll content. **African Journal of Agricultural Research**. v. 7, p. 19–27, 2012.

ZHAO, G.Q.; MA, B.L., REN, C.Z. (2007). Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, and ion content of naked oat in response to salinity. **Crop Science**, v. 47, p. 123-131, 2007.

ZHUANG, G.; LI, B.; GUO, H.; LIU, J.; CHEN, F.; ACADEMY, S. Molecular cloning and characterization of P5CS gene from *Jatropha curcas* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 14803–14811, 2011.