



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

PAULO ANDRÉ FERREIRA DE FREITAS

ELEMENTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES DA
APLICAÇÃO EXÓGENA DE PROLINA EM PLANTAS DE SORGO SUBMETIDAS
À SALINIDADE

FORTALEZA

2018

PAULO ANDRÉ FERREIRA DE FREITAS

ELEMENTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES DA APLICAÇÃO
EXÓGENA DE PROLINA EM PLANTAS DE SORGO SUBMETIDAS À SALINIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de Concentração: Ciências Biológicas II.

Orientador: Prof^o Dr. Enéas Gomes Filho

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F937e Freitas, Paulo André Ferreira.
Elementos fisiológicos, bioquímicos e moleculares da aplicação exógena de prolina em plantas de sorgo submetidas à salinidade / Paulo André Ferreira Freitas. – 2018.
124 f. : il.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Enéas Gomes Filho.
1. Sorghum bicolor. 2. prolina. 3. salinidade. 4. metabolismo da prolina. 5. expressão gênica. I. Título.
CDD 572
-

PAULO ANDRÉ FERREIRA DE FREITAS

ELEMENTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES DA APLICAÇÃO
EXÓGENA DE PROLINA EM PLANTAS DE SORGO SUBMETIDAS À SALINIDADE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de Concentração: Ciências Biológicas II.

Aprovada em 27/03/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Enéas Gomes Filho (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^o. Dr. Danilo de Meneses Daloso

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Rosilene Oliveira Mesquita

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Fabrício Eulálio Leite Carvalho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Helen Paula Silva da Costa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, José Edivan e Teresinha, pelo apoio aos meus estudos e pela renúncia e dedicação...

A minha amada esposa, Lena Silva, pelo amor e compreensão desta etapa da vida e por viver junto esse sonho...

Dedico

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por segurar em minhas mãos e fazer enxergar o caminho tornando esse trabalho possível;

Ao professor Dr. **Eneas Gomes Filho**, pela oportunidade, apoio e confiança a mim depositados durante todo esse período. Sou grato por ter sido seu discípulo.

Ao Prof^o Dr. **Danilo de Meneses Daloso**, Prof^a Dra. **Rosilene Oliveira Mesquita**, ao Dr. **Fabricio Eulálio Leite Carvalho** e a Dra. **Helen Paula Silva da Costa** por participar da composição desta banca e pelas observações feitas a este trabalho de tese.

Ao prof^o Dr. **Helio Costa** por disponibilizar o espaço do laboratório de Bioenergética e a Dra. **Katia Daniella da Cruz Saraiva** pela orientação técnica e acadêmica das análises de biologia molecular.

Ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade (INCTsal)** e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo fomento a esse trabalho de tese.

A minha esposa **Lena Silva**, por suportar fortemente esse período, pelo apoio incondicional e pelo amor e carinho que fizeram dessa caminhada mais leve.

Aos amigos e colegas do laboratório de fisiologia vegetal (LABFIVE) **Aldelisa Viana “Teca”**, **Cinthia Queiroz**, **Cibelle Gadelha**, **Dalton Barreto**, **Daniel Coelho**, **Daniel Farias**, **Gyedre Araújo**, Prof^o **Humberto Henrique**, **Igor Moura**, **Isabel Ribeiro**, **Isabelle Pereira**, **Joanna Freitas**, **Karollyny Roger**, **Lineker Lopes**, **Luckas Huriel**, **Rafael Miranda**, **Stelamaris Paula**, **Wallace Edelky**, **Valéria Chaves** e tantos outros que fizeram parte da minha trajetória neste laboratório. Levo todas as coisas boas que pude aprender com todos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

*“Este é o fim
Dos meus temporais
Tudo o que eu senti desfalece aqui
Sim, este é o fim dos ventos
Que uivam sem direção
Tocam-me
Mas não me conduzem mais”*

O mestre dos ventos – Rosa de Saron

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos da aspersão foliar de prolina na bioquímica, fisiologia e biologia molecular de plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*), cultivar CSF 20, sob condições de estresse salino. Para tal, em um primeiro experimento, foram aspergidas soluções contendo prolina para indicar a concentração mais adequada a ser aspergida nas folhas de modo a promover melhoria no crescimento das plantas sob estresse com NaCl a 75 mM. Após 14 dias dos tratamentos (DAT), a análise das variáveis de crescimento demonstrou que a concentração de prolina que mostrou melhor resultado foi a de 30 mM. Em um segundo experimento, realizado nas mesmas condições de semeadura e crescimento que o anterior, as plantas foram submetidas aos seguintes tratamentos: 1. controle/água – Sem NaCl e aspergindo-se água desionizada; 2. controle/prolina - Sem NaCl e prolina a 30 mM; 3. salino/água - NaCl a 75 mM e aspergindo-se água desionizada; e 4. salino/prolina - NaCl a 75 mM e prolina a 30 mM. As plantas foram coletadas com 7 e 14 DAT. Como resultado, observou-se que o tratamento salino/prolina minorou os efeitos deletérios causados pela salinidade, principalmente aos 14 DAT, sendo menores as reduções nas massas fresca e seca de folhas e raízes e na área foliar. Isso se relacionou, em parte, com as menores reduções nos danos de membranas, nos teores relativos de água das folhas e nas taxas de fotossíntese líquida e de transpiração causadas pelo estresse salino. Também, no tratamento salino/prolina, aos 14 DAT, houve completa recuperação na diminuição da condutância estomática provocada pelo estresse salino e menor redução nos teores de clorofila *b* e *total*. No tratamento salino/prolina houve redução nos teores de Na⁺ e Cl⁻ e aumento nos teores de K⁺, Ca²⁺ e na relação K⁺/Na⁺, gerando uma situação de relação iônica mais favorável ao crescimento. Também nas folhas, os teores de N-aminossolúveis e Carboidratos aumentaram durante o tratamento salino com prolina aos 14 DAT e, independentemente do tempo de coleta, os teores de glutamina, glutamato, aspartato e asparagina foram, de modo geral, maiores no tratamento salino/prolina. Ainda nas folhas, aos 7 DAT, o grande aumento nos teores de prolina no tratamento salino/prolina, em relação ao tratamento salino/água, foi acompanhado por uma redução na atividade da enzima de síntese (P5CS) e aumento na atividade da enzima de degradação (ProDH), de tal modo que aos 14 DAT os teores de prolina foram iguais nesses dois tratamentos. Em um terceiro experimento, conduzido em condições semelhantes aos anteriores, estudou-se a expressão dos genes *p5cs1*, *p5cs2*, *oat* e *prodh*, envolvidos no metabolismo da prolina. Destes genes, destaca-se a modulação da expressão dos genes *p5cs1* (tanto nas folhas como nas raízes) e *prodh* (nas folhas) ao longo do tempo, e isso se relacionou com a variação na atividade da P5CS e da ProDH nas folhas, no

tratamento salino/prolina. Portanto, os resultados obtidos demonstram que a prolina exógena minimiza os efeitos deletérios da salinidade.

Palavras-chave: *Sorghum bicolor*, prolina, salinidade, metabolismo da prolina, expressão gênica

ABSTRACT

The aim of this present work was to evaluate the effects of foliar proline spray on biochemistry, physiology and molecular biology of sorghum plants (*Sorghum bicolor*), CSF 20 cultivar, under saline stress conditions. For this, in a first experiment, proline solutions were sprayed to indicate the most suitable concentration to be sprayed onto the leaves in order to promote improvement in plant growth under stress with 75 mM NaCl. At 14 days after the treatments (DAT), analysis of growth parameters showed that the proline concentration that presented the best result was 30 mM. In a second experiment, performed under the same sowing and growing conditions as the previous one, plants were submitted to the following treatments: 1. control/water – without NaCl and spraying with deionized water; 2. control/proline – without NaCl and proline at 30 mM; 3. saline/water – 75 mM NaCl and spraying with deionized water; and 4. saline/proline – 75 mM NaCl and proline at 30 mM. The plants were collected with 7 and 14 DAT. As a result, it was observed that the saline/proline treatment reduced deleterious effects caused by salinity, mainly at 14 DAT, being smaller the reductions in leaves and roots fresh and dry masses and in leaf area. This was related, in part, to lower reductions in membrane damage, relative leaf water content, and net photosynthesis and transpiration rates caused by saline stress. Also, in the saline/proline treatment, at 14 DAT, there was complete recovery in reduction of stomatal conductance caused by saline stress and lower reduction in *b* and total chlorophyll contents. In saline/proline treatment, Na⁺ and Cl⁻ contents decreased and K⁺, Ca²⁺ and K⁺/Na⁺ increased, resulting in a more favorable ionic relationship. Also in leaves, N-compounds and Carbohydrate levels was increased during proline saline treatment at 14 DAT and, regardless of sampling time, glutamine, glutamate, aspartate and asparagine contents were generally higher in saline/proline treatment. In leaves, at 7 DAT, the large increase in proline levels in saline/proline treatment, compared to saline/water treatment, was accompanied by a reduction in activity of synthesis enzyme (P5CS) and increase in activity of degradation enzyme (ProDH), such that at 14 DAT the proline levels were the same in these two treatments. In a third experiment, conducted under similar conditions described, gene expression of *p5cs1*, *p5cs2*, *oat* and *prodh* genes involved in proline metabolism was studied. Of these genes, *p5cs1* expression (in leaf and root) and *prodh* (in leaves) genes was modulated over time, and this was related to the variation in P5CS and ProDH activity in leaves of saline/proline treatment. Therefore, the results obtained demonstrate that exogenous proline minimizes deleterious effects of salinity.

Keywords: *Sorghum bicolor*, proline, salinity, proline metabolism, gene expression

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Massas frescas da parte aérea e raízes e massas secas da parte aérea e das raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos..... 62
- Figura 2. Área foliar de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos..... 63
- Figura 3. Danos de membrana e teor relativo de água em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos..... 64
- Figura 4. Taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração e concentração interna de CO₂ de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos..... 67
- Figura 5. Teores de clorofila *a*, *b*, *total* e carotenóides em plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos..... 69
- Figura 6. Teores de potássio, sódio e relação K⁺/Na⁺ em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos..... 71
- Figura 7. Teores de cálcio e cloreto em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias

da aplicação dos tratamentos.....	74
Figura 8. Teores de N-aminossolúveis e carboidratos solúveis em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	77
Figura 9. Teores de prolina e atividades enzimáticas da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase, aminotransferase da ornitina e desitrogenase da prolina em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	80
Figura 10. Teores de glutamato e glutamina em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	84
Figura 11. Teores de asparagina, aspartato e serina em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	86
Figura 12. Análise da integridade do RNA total em gel de agarose (1,5 %), evidenciando as bandas do RNA ribossomal 18S e 28S. As amostras foram extraídas de folhas e raízes de plantas de sorgo.....	90
Figura 13. Expressão relativa do gene <i>p5cs1</i> em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal nos tempos de coleta propostos.....	92
Figura 14. Expressão relativa do gene <i>p5cs2</i> em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75	

mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal nos tempos de coleta propostos..... 95

Figura 15. Expressão relativa do gene *oat* em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal nos tempos de coleta propostos..... 97

Figura 16. Expressão relativa do gene *prodh* em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência ou na presença de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência ou na presença de sal nos tempos de coleta propostos..... 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes-alvo e constitutivos utilizados nas análises de expressão por qRT-PCR de folhas e raízes de sorgo.....	54
Tabela 2. Volumes dos reagentes aplicados para cada reação de transcrição reversa.....	56
Tabela 3. Massas fresca e seca da parte aérea e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na presença de NaCl a 75 mM e aspergidas com diversas doses de prolina, após 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	58
Tabela 4. Área foliar, diâmetro e altura do colmo de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na presença de NaCl a 75 mM e aspergidas com diversas doses de prolina após 14 dias da aplicação dos tratamentos.....	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1. Problemática da salinização dos solos	19
2.2. Efeitos da salinidade nas plantas	21
2.3. Tolerância e aclimação das plantas à salinidade	23
2.4. A prolina: propriedades e seu papel no contexto vegetal	26
2.5. Metabolismo da prolina	29
2.6. Regulação do metabolismo da prolina durante o estresse	31
2.7. Fornecimento exógeno de prolina	33
2.8. O sorgo	34
3. HIPÓTESES	37
4. OBJETIVOS	38
4.1. Objetivos gerais	38
4.2. Objetivos específicos	38
5. MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1. Experimento I – Determinação da concentração de prolina a ser aspergida nas folhas das plantas de sorgo	39
5.1.1. Semeadura, tratamentos e coleta	39
5.1.3. Delineamento experimental e análise estatística	41
5.2. Experimento II – Alterações no crescimento, bioquímica e fisiologia de plantas de sorgo em condições de salinidade e influência da prolina exógena	42
5.2.2. Coleta do material vegetal e parâmetros de crescimento	42
5.2.3. Determinação de danos de membrana e teor relativo de água	42
5.2.4. Trocas gasosas	43
5.2.5. Pigmentos fotossintéticos	44
5.2.6. Solutos inorgânicos: sódio, potássio, cálcio e cloreto	44
5.2.7. Solutos orgânicos	45
5.2.7.1. N-aminossolúvel e carboidratos solúveis	45
5.2.7.2. Prolina livre	46
5.2.7.3. Aminoácidos livres: asparagina, aspártico, glutâmico, glutamina e serina	47
5.2.7.3.1. Derivatização dos aminoácidos	48
5.2.7.3.2. Quantificação dos aminoácidos	49
5.2.8. Enzimas do metabolismo da prolina	49
5.2.8.1. Sintetase da Δ^1-pirrolina-5-carboxilato	50
5.2.8.2. Aminotransferase da δ-ornitina	50
5.2.8.3. Desidrogenase da prolina	51

5.2.9 <i>Dosagem de proteínas</i>	51
5.2.10. <i>Delineamento experimental e estatística</i>	52
5.3. Experimento III – Modulação da expressão dos genes envolvidos no metabolismo da prolina em folhas e raízes de plantas de sorgo sob condições de salinidade e influência da prolina exógena no processo	52
5.3.1. <i>Condições de crescimento</i>	52
5.3.2. <i>Identificação in silico dos genes envolvidos no metabolismo da prolina</i>	53
5.3.3. <i>Desenho dos primers específicos</i>	53
5.3.4. <i>Análise da expressão gênica via RT-qPCR</i>	54
5.3.4.1. <i>Extração do RNA total</i>	54
5.3.4.2. <i>Avaliação da qualidade do RNA total</i>	55
5.3.4.3. <i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	56
5.3.4.4. <i>PCR em tempo real (RT - qPCR)</i>	56
5.4. <i>Análise dos dados de expressão gênica</i>	57
5.5. <i>Delineamento experimental e estatística</i>	57
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
6.1. Experimento I – Determinação da dose crítica de prolina	58
6.2. Experimento II – Alterações no crescimento, bioquímica e fisiologia de plantas de sorgo em condições de salinidade e influência da prolina exógena no processo	61
6.2.1. <i>Crescimento, danos de membrana e teor relativo de água</i>	61
6.2.2. <i>Trocas Gasosas</i>	66
6.2.3. <i>Pigmentos fotossintéticos</i>	68
6.2.4. <i>Solutos inorgânicos</i>	70
6.2.5. <i>Solutos orgânicos</i>	77
6.2.6. <i>Prolina e atividade de enzimas do seu metabolismo</i>	79
6.2.7. <i>Aminoácidos livres</i>	83
6.3. Experimento III – Modulação da expressão dos genes envolvidos no metabolismo da prolina de folhas e raízes de plantas de sorgo em condições de salinidade e influência da prolina exógena no processo	89
6.3.1. <i>Qualidade do RNA total</i>	89
6.3.2. <i>Análise de expressão diferencial via RT- qPCR</i>	89
6.3.2.1. <i>Expressão do gene p5cs1</i>	91
6.3.2.2. <i>Expressão do gene p5cs2</i>	94
6.3.2.3. <i>Expressão do gene oat</i>	96
6.3.2.4. <i>Expressão do gene prodh</i>	99
7. Conclusões	102
8. Referências	103

1. INTRODUÇÃO

As plantas, no contexto de seu ambiente, se desenvolvem reagindo às mudanças nas condições provocadas por fatores ambientais. Um grande desafio na biologia do estresse abiótico é decifrar como as plantas percebem as diferentes perturbações, como os sinais iniciais são transduzidos dentro da planta, quais são as rotas de resposta provocadas por eles e como eles são determinados (YOSHIDA *et al.*, 2014). O desenvolvimento de culturas tolerantes ao sal tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de plantas por décadas, a fim de manter a produtividade das culturas em regiões semiáridas. Apesar da disponibilidade de várias variedades tolerantes ao sal, é necessário compreender os principais processos fisiológicos, metabólicos e genéticos determinantes da tolerância ao sal (GUPTA; HUANG, 2014).

O Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma espécie vegetal bem adaptada a condições de baixa disponibilidade de água e que geralmente cresce em áreas com pouca precipitação, altas temperaturas e solos salinos (KAFI, JAFARI, MOAYEDI, 2013; AVCI, ILERI, KAYA, 2017). Esta cultura é considerada moderadamente tolerante ao sal, sendo a germinação a etapa mais tolerante aos efeitos da salinidade do que os últimos estádios de crescimento (OLIVEIRA; GOMES-FILHO; ENEAS-FILHO, 2010). Esta capacidade de aclimação é bastante útil e permite o emprego dessa espécie com rendimentos economicamente aceitáveis, principalmente quando o cultivo em condições salinas é inevitável (COELHO *et al.*, 2014).

Os desafios impostos pelos estresses abióticos sobre o crescimento e o desenvolvimento de plantas, como o sorgo, são agravados devido às mudanças constantes do clima e à deterioração do meio ambiente causada pela atividade humana, impondo restrições à produção de culturas (PEREIRA, 2016). Essas fortes modificações no clima e no solo afetam a produção agrícola principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, desafiando os pesquisadores a elaborar técnicas de manejo e melhoramento que auxiliem no aumento do

fornecimento global de alimentos e num ambiente equilibrado (FAO, 2015). Dentre as culturas exploradas no contexto atual, o sorgo é consideravelmente disseminado no Brasil e no mundo, servindo tanto para a alimentação animal, inclusive a humana, quanto para a produção de etanol (MEKI *et al.*, 2013).

Solos salinos ocorrem principalmente nas regiões áridas e semiáridas do mundo. A redução na precipitação pluviométrica nessas regiões, associada às atividades de manejo, condições de solo e a utilização de água de má qualidade, conduzem à formação de solos com alta concentração de sais (PREDOTTI *et al.*, 2015). Embora as informações sobre as áreas salinizadas no Brasil não sejam precisas e careçam de um estudo mais completo e atual, estima-se que 20 a 25% das áreas irrigadas perto de rios e riachos intermitentes estejam sujeitos à salinidade, aliados ou não a problemas de deficiências de drenagem (MOTA *et al.*, 2012). Apesar das terras irrigadas corresponderem a apenas 15% da área mundial agricultável, essas apresentam produtividade duas vezes superior àquelas da condição de sequeiro e são responsáveis por um terço da produção mundial de alimentos (TESTER; LANGRIDGE, 2010).

Segundo o Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (DNOCS), em 2014, dos 37 perímetros irrigados que são coordenados pela instituição no semiárido nordestino empregavam um total de 7.897 pequenos, médios e grandes produtores (PORTAL BRASIL, 2014). No Nordeste do Brasil os solos desses perímetros irrigados são bastante diversificados, sendo comuns, na região semiárida, solos em avançado processo de salinização e impróprios para o cultivo da maioria das culturas (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

A prolina é conhecida por estar envolvida na resposta a uma série de estresses ambientais, particularmente os estresses salino e hídrico. No entanto, ainda falta uma resolução geral sobre o papel preciso da prolina na resposta das plantas ao estresse e várias hipóteses foram propostas sobre o significado do acúmulo de prolina causado pelo estresse (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Entre os osmólitos compatíveis, ou osmoprotetores de

plantas, a prolina se destaca mediando múltiplas respostas relacionadas ao processo de aclimatação, as quais envolvem: o ajustamento osmótico, a estabilização de membranas e proteínas, a promoção da eliminação de radicais livres, os eventos de sinalização celular, a participação no equilíbrio de oxirredução e a indução na expressão de genes (BENITEZ *et al.*, 2016).

Embora o metabolismo da prolina tenha sido estudado há mais de 40 anos nas plantas, pouco se sabe sobre as vias de sinalização envolvidas em sua regulação. Por exemplo, a biossíntese de prolina é ativada e o seu catabolismo reprimido durante a desidratação, enquanto a reidratação desencadeia a regulação oposta. Porém, a forma como é feita distribuição da prolina e de seus intermediários ainda necessita de mais estudos. Na última década, o melhoramento de plantas com genes associados à biossíntese da prolina mostraram que a superexpressão desses genes conferiu maior tolerância e uma retomada no crescimento sob condições de estresse salino (WANG *et al.*, 2015). Outra estratégia que se mostra eficaz à redução dos efeitos da salinidade é a aplicação exógena de prolina. Essa estratégia tem se mostrado eficaz em diminuir os efeitos causados por diversos tipos de estresse e estudos mais completos que busquem ampliar a informação sobre a influência da prolina exógena em sistemas vegetais são necessários (HASANUZZAMAN *et al.*, 2014).

Portanto, o estudo dos efeitos da prolina exógena sobre os sistemas vegetais, particularmente aquele envolvendo o metabolismo da prolina em plantas de sorgo, espécie que será utilizada como modelo experimental, a qual é adaptada às condições de elevada temperatura e seca e que tem seu genoma sequenciado, é relevante para o entendimento da forma como as plantas podem utilizar a prolina para amenizar os efeitos da salinidade.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Problemática da salinização dos solos

As terras afetadas pela salinidade ocorrem em praticamente todas as regiões climáticas, desde os trópicos úmidos até as regiões polares. Todos os solos contêm sais, e todas as águas de irrigação, seja a partir de canais ou bombas subterrâneas, incluindo aquelas consideradas de muito boa qualidade, contêm sais dissolvidos. De fato, os sais são um componente comum e necessário do solo, e muitos sais (por exemplo, sais de nitrato, de fosfato e de potássio) são nutrientes essenciais às plantas (CARILLO *et al.*, 2011).

A salinização dos solos é um evento que precede a própria agricultura. No entanto, esta problemática começou a ser discutida a partir das necessidades humanas em relação a uma maior produção de alimentos frente a um aumento do crescimento populacional (NOURI *et al.*, 2017). O início do século XXI é marcado pela escassez global de recursos hídricos, poluição ambiental e aumento da salinização do solo e da água.

É possível classificar o aumento do teor de sais no solo de acordo com sua origem destes, podendo ser de forma primária ou secundária (PARIHAR, *et al.*, 2015). Chama-se salinidade primária ou natural a que resulta da acumulação de sais em longos períodos de tempo através de processos naturais no solo ou nas águas subterrâneas (ISMAIL; HORIE, 2017). Esta pode ser causada por: 1) intemperismo de materiais originados do solo contendo sais solúveis; neste processo, o desgaste físico e químico das rochas e minerais liberam diversos sais solúveis; e 2) por deposição de sal oceânico carregado pelo vento e pela chuva ou pela penetração da água do mar no continente atingindo o lençol freático, o que representa um importante aporte de sais nas regiões costeiras. A salinização secundária resulta de atividades humanas que alteram o equilíbrio hidrológico do solo, afetando a água aplicada e a disponibilidade de água efetivamente utilizada pelas culturas (MUNNS *et al.*, 2016). As causas mais comuns são: a) desmatamento de terras e a substituição da vegetação perene por

culturas anuais; b) sistemas de irrigação com água rica em sal ou drenagem insuficiente; e c) uso inadequado de fertilizantes e manejo impróprio do solo. Independentemente da origem, os sais disponíveis no solo têm como cátions mais comuns sódio (Na^+), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}), enquanto que os ânions mais comuns são cloreto (Cl^-), sulfato (SO_4^{2-}) e bicarbonato (HCO_3^-). Diversos estudos se baseiam na toxicidade dos íons Na^+ e Cl^- por que são indiscutivelmente os íons mais predominantes em solos salinos (PANDOLFI *et al.*, 2016).

Os solos afetados pela salinidade ocorrem em mais de 100 países e sua extensão mundial é estimada em cerca de 1 bilhão de hectares (FAO, 2015). Segundo Richards (1954) solos salinos são aqueles que têm as seguintes características: condutividade elétrica do extrato de saturação do solo excedendo 4 dS m^{-1} (aproximadamente 40 mM de NaCl); percentual de sódio trocável (PST) menor que 15% e pH inferior a 8,5. Entretanto, as plantas cultiváveis, em sua maioria, são susceptíveis à salinidade quando o extrato de saturação do solo apresenta valor até menores que $3,0 \text{ dS m}^{-1}$ independente de outros fatores associados (SUN *et al.*, 2013).

Nas regiões quentes e secas do mundo, os solos são frequentemente salinos e com baixo potencial agrícola (MACHADO; SERRALHEIRO, 2017). A partir de informação muito dispersa sobre a extensão e características dos solos afetados por sais, a salinidade e a sodicidade estão aumentando rapidamente em muitas regiões, tanto em áreas irrigadas como nas não irrigadas (QUADIR, 2014). Anualmente, os problemas de salinidade do solo estão reduzindo de 0,3 a 1,5 milhões de hectares de produção agrícola e reduzindo o potencial de produção de outros 20 a 46 milhões de hectares (FAO, 2015).

Várias medidas podem ser tomadas para conter a ameaça da salinidade, tais como: 1) lixiviação direta de sais; 2) plantio de variedades tolerantes aos sais; 3) domesticação de halófitas selvagens nativas para uso em sistemas agropastoris; 4) fitorremediação (ou biorremediação); 5) melhoria química do solo; e 6) uso de adubos orgânicos (SINGH, 2015b).

Projetos que englobem uma ou mais dessas medidas podem dar um salto em qualidade no solo recuperando áreas com grande concentração de sais.

2.2. Efeitos da salinidade nas plantas

As plantas sofrem de diversas formas os efeitos do estresse salino. A salinidade não só diminui a produção agrícola da maioria das culturas, como também afeta as propriedades físico-químicas do solo e o equilíbrio ecológico da área (GOLLDACK *et al.*, 2014). Usualmente, os impactos da salinidade incluem: baixa produtividade agrícola, baixos rendimentos econômicos e erosões do solo. A repercussão da salinidade nas plantas é resultado de interações complexas entre processos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, incluindo desde a absorção de água e nutrientes à germinação de sementes e ao estabelecimento das plantas, podendo se estender às fases vegetativa e reprodutiva (MUNNS *et al.*, 2017).

A germinação das sementes é uma fase fundamental e vital no ciclo de crescimento de uma planta, determinando o rendimento e o sucesso das outras etapas (FERREIRA; BORGUETTI, 2004). O baixo potencial osmótico do meio de cultivo reduz a embebição de água pela semente, o que causa toxicidade e altera a atividade de enzimas, como por exemplo, a RNase (GOMES-FILHO *et al.*, 2008), gera distúrbios no balanço hormonal (MIRANSARI; SMITH, 2014), reduz a utilização de reservas de sementes (MARQUES *et al.*, 2013), além de reduzir a taxa e o percentual de germinação (COELHO *et al.*, 2014).

Após a etapa de germinação, um dos efeitos iniciais do estresse salino é a redução da taxa de crescimento da planta inteira. Os sais da solução do solo podem inibir o crescimento das plantas em duas fases. Um modelo proposto por Munns (2005) destaca essas duas fases descrevendo os efeitos osmóticos e iônicos do estresse salino. Em primeiro lugar, a presença de sais no solo reduz a capacidade da planta de absorver água, o que leva a reduções na taxa de crescimento. Nesta primeira fase (ou fase osmótica), o crescimento das plantas é reduzido

por causa da osmolaridade da solução salina na rizosfera. Essa fase começa imediatamente após a concentração de sais em torno das raízes chegar a um nível limiar, tornando mais difícil a absorção de água. Uma resposta imediata a este efeito é a redução na condutância estomática, a qual atenua o fluxo de íons entre as raízes e a parte aérea. No entanto, este comportamento em longo prazo dificulta o crescimento da parte aérea, pois afeta o processo de fixação de carbono e conseqüentemente ocorre perda de biomassa (NEGRÃO; SCHMÖCKEL; TESTER, 2017). Dessa forma, o crescimento da parte aérea se torna mais sensível do que o crescimento das raízes.

Os sais presentes nas raízes em grandes quantidades são transportados, via fluxo transpiratório, para diversos órgãos da planta, causando lesões nas células e novas reduções no crescimento. Nessa segunda fase (ou fase iônica), as folhas mais velhas da planta morrem e a capacidade fotossintética vegetal é reduzida, exercendo um efeito negativo adicional sobre o crescimento (MUNNS, 2005). Essa fase corresponde ao acúmulo de íons na lâmina foliar, em particular o Na^+ , o qual se acumula via fluxo transpiratório. O acúmulo desse íon torna-se tóxico nas folhas mais velhas, que não estão mais em expansão e, portanto, aumenta o teor (ou concentração) deste íon nos tecidos. Se a taxa de mortalidade das folhas antigas for maior do que a taxa de produção das folhas novas, a capacidade fotossintética da planta deixará de fornecer o requerimento de esqueletos de carbono para as folhas jovens, reduzindo sua taxa de crescimento (ROY; NEGRÃO; TESTER, 2014). Apesar do fato de a maioria das plantas acumularem os íons Na^+ em altas concentrações em seus tecidos quando cultivadas em solos salinos, a toxicidade do Cl^- também é uma importante causa de redução do crescimento para algumas culturas (TAVAKKOLI *et al.*, 2017).

A fotossíntese é inibida quando elevadas concentrações de Na^+ e/ou Cl^- são acumuladas nos cloroplastos (ASHRAF; HARRIS, 2013). Outros fatores que reduzem as taxas fotossintéticas das plantas sob estresse salino são a desestabilização das membranas celulares a qual reduz a permeabilidade ao CO_2 , a toxicidade dos íons, o aumento na

senescência, as alterações na atividade enzimática, induzidas por alterações na estrutura citoplasmática e *feedback* negativo por atividade reduzida do dreno (GUPTA *et al.*, 2015). Além disso, muitos dos efeitos deletérios do Na^+ parecem estar relacionados à integridade estrutural e funcional das membranas dos tilacóides (KAMEL; HAMMAD, 2015).

O excesso de sais solúveis no solo concorre com a absorção e metabolismo de nutrientes minerais que são essenciais para as plantas (FLOWERS; COLMER, 2015). No entanto, as relações entre a salinidade e a nutrição mineral das culturas são muito complexas (HASEGAWA, 2013). Os distúrbios nutricionais resultantes do sal em excesso refletem na disponibilidade de nutrientes, na absorção competitiva e no transporte e distribuição desses nutrientes dentro da planta (BENITO *et al.*, 2014). As proporções apropriadas de nutrientes fornecem uma ferramenta para a resposta fisiológica de uma planta em relação ao seu crescimento e desenvolvimento (FAHAD *et al.*, 2015). O aumento da absorção de sais induz toxicidades iônicas específicas como a de Na^+ , Cl^- ou SO_4^{2-} que diminuem a absorção de nutrientes essenciais como fósforo (P), potássio (K^+), nitrogênio (N) e cálcio (Ca^{2+}) (JULKOWSKA; TESTERINK, 2015). A disponibilidade de micronutrientes nos solos salinos depende de suas solubilidades, do pH da solução do solo, do potencial redox da solução do solo e da natureza dos locais de ligação nas superfícies de partículas orgânicas e inorgânicas presentes nos solos. Além disso, a salinidade pode afetar de forma diferente as concentrações de micronutrientes nas plantas, sendo isto dependente da espécie ou cultivar e dos níveis de salinidade (ROY; NEGRÃO; TESTER, 2014).

2.3. Tolerância e aclimação 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 o 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 (DUARTE *et al.*, 2013).

Diversos artigos estabelecem que a maioria das halófitas e glicófitas conseguem tolerar à salinidade por estratégias bastante semelhantes, muitas vezes usando processos análogos (NAWAZ *et al.*, 2014; RAO *et al.*, 2016; ZAKI; YOKOI, 2016). 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 (SHIRI *et al.*, 2016).

Sendo maioria das plantas cultivadas glicófitas, à medida que as concentrações de sais aumentam, a produtividade cai drasticamente, podendo ser severamente inibidas ou até mesmo morrer em concentrações de NaCl de 100 a 200 mM (PARK *et al.*, 2016). Ao contrário, as plantas halófitas podem sobreviver à salinidade entre 300 e 400 mM ou até maior.

Os mecanismos de controle genético da tolerância das plantas à salinidade aos poucos vão sendo esclarecidos. Na verdade, existem grupos de genes controlando os mecanismos de tolerância nas diferentes espécies, que interagem fortemente com as condições ambientais (KIM *et al.*, 2015). Diferentes mecanismos adaptativos estão envolvidos na aclimação gradual à salinidade sendo que a sensibilidade aos sais de uma determinada espécie pode mudar durante sua ontogenia. Para algumas espécies, a sensibilidade aos sais pode ser maior na germinação, enquanto que para outras espécies, ela pode aumentar durante a fase reprodutiva (GUPTA; HUANG, 2014).

As plantas possuem uma gama de mecanismos para se aclimatar à salinidade e, segundo Munns e Tester (2008), é possível distinguir três tipos de resposta de tolerância: a) pela capacidade do tecido de tolerar o estresse osmótico, porém o crescimento das plantas sob estresse salino é principalmente limitado pelo efeito osmótico, independentemente de sua capacidade de exclusão de sal, o que resulta em taxas de crescimento reduzidas; assim, o

aumento da tolerância osmótica envolve um balanço na capacidade de continuar a produção e crescimento de folhas novas e maiores mantendo certa condutância estomática; b) por exclusão de Na^+ das células, em que a exclusão citosólica desse íon se dá pela atividade de proteínas transportadoras, como as NHXs (*Na^+/H^+ antiport exchanger*), presentes na membrana dos vacúolos (tonoplasto), que sequestram os íons Na^+ para o vacúolo; as HKTs (*high-affinity K^+ transporter*), que evitam o carregamento no xilema desses íons e, conseqüentemente, impedem o fluxo de íons danosos para a parte aérea e as proteínas que fazem a via de sinalização SOS (*salt overly sensitive*) na membrana plasmática a qual tem sido reconhecida como um mecanismo chave para exclusão de Na^+ e controle de homeostase de íons em âmbito celular (ROY; NEGRÃO; TESTER, 2014); e c) por tolerância tecidual, que envolve a compartimentalização de Na^+ e Cl^- dentro do vacúolo. O sequestro desses íons para o vacúolo requer medidas para contrabalançar o aumento da osmolaridade neste compartimento. Para isso, as células produzem solutos osmorreguladores (chamados de solutos compatíveis) os quais são acumulados no citosol e nas organelas para balancear a pressão osmótica dos íons nos vacúolos, especialmente nas células do mesofilo foliar (HOSSAIN; DIETZ, 2016).

Solutos compatíveis são moléculas de baixo peso molecular e que não perturbam as funções celulares, mesmo quando presentes em altas concentrações (HOSSAIN; DIETZ, 2016). Esses solutos compreendem compostos contendo nitrogênio, como aminoácidos, aminas e betaínas, bem como ácidos orgânicos, açúcares e polióis (PARK *et al.*, 2016). Os solutos compatíveis desempenham um importante papel na proteção osmótica das plantas, protegendo as enzimas da desnaturação, estabilizando as membranas celulares ou mediando o ajustamento osmótico (SLAMA *et al.*, 2015). Os solutos compatíveis são tipicamente hidrofílicos e podem substituir a água na superfície de proteínas ou membranas, atuando assim como chaperonas de baixo peso molecular (NEGRÃO; SCHMÖCKEL; TESTER,

2017). Esses solutos também funcionam para proteger as estruturas celulares através da remoção de espécies reativas de oxigênio (HAFSI *et al.*, 2017).

2.4. A prolina: propriedades e seu papel no contexto vegetal

A prolina se distingue de outros aminoácidos em vários aspectos. Dentre os aminoácidos, a característica diferencial dessa molécula está em sua conformação, em que o grupo α -amino está presente como uma amina secundária sendo, na verdade um iminoácido (LEHMANN *et al.*, 2010). Esta distinção química dá a prolina propriedades únicas às quais são altamente relevantes para a compreensão de seu papel nas plantas. Outra característica da prolina, é que, em muitas espécies de plantas, vários tipos de estresse abiótico fazem com que seus níveis se elevem bastante, o mesmo acontecendo em bactérias e fungos (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

O acúmulo de prolina decorrente dos estresses abióticos pode ser explicado, em parte, por suas propriedades químicas básicas: a prolina é um dos aminoácidos mais solúveis em água e é altamente polar, pois existe, a pH 7,0, ao mesmo tempo, em um estado químico com uma carga negativa no grupo carboxílico e uma positiva no nitrogênio do anel (LEHMANN *et al.*, 2010). A prolina compartilha esta propriedade com outros solutos compatíveis, que são acumulados por uma ampla gama de organismos para ajustar sua osmolaridade celular (BHASKARA *et al.*, 2015). Dessa forma, tanto as propriedades intrínsecas da prolina, quanto os aspectos específicos de sua síntese e de seu catabolismo, podem explicar seu destaque na biologia do estresse vegetal. Além disso, os mecanismos que regulam o metabolismo da prolina diferem bastante daquele dos outros aminoácidos. Em um estudo usando a técnica de Microarray, Less e Galili (2008) descobriram que, para muitos aminoácidos, os estresses abióticos alteram a transcrição de genes relacionados com o catabolismo, mas têm pouco efeito sobre a expressão de genes que codificam para as enzimas das vias biossintéticas.

Todavia, as vias do metabolismo da prolina e da arginina foram uma exceção, em que o estresse abiótico causou uma extensa regulação transcricional das enzimas de biossíntese.

A despeito do acúmulo de prolina ser comprovadamente verificado como uma resposta adaptativa à aclimatação durante os estresses ambientais, diferentes grupos de pesquisa têm observado elevados níveis desse aminoácido nos órgãos reprodutivos de diferentes espécies de plantas, independentemente da condição ambiental (MING *et al.*, 2017). Tais resultados sugerem que o acúmulo deste aminoácido também possa ocorrer em condições fisiológicas não estressantes para fins de desenvolvimento. Por exemplo, durante a dessecação do grão de pólen, a prolina pode funcionar como um osmoprotetor durante sua fase bicelular (ROTSCH *et al.*, 2017). Nas sementes em desenvolvimento, a prolina age sob os genes de ciclinas em nível de transcrição moderando a acumulação geral de proteínas garantindo a maturação adequada (WANG *et al.*, 2014). Muitas proteínas da parede celular que são ricas em prolina e hidroxiprolina desempenham papéis importantes no desenvolvimento da planta (KAVI KISHOR *et al.*, 2015).

Em alguns casos, a prolina pode se acumular mais de 100 vezes acima do nível do controle em plantas expostas a um baixo potencial hídrico (VERSULES E SHARMA, 2010). Entretanto, a retirada do agente estressante pode reverter completamente o processo, com a prolina diminuindo para um nível basal ao longo de alguns dias (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014). Os dados obtidos até hoje sugerem que o acúmulo de prolina ocorra como uma resposta a múltiplos estresses ambientais como os hídrico e salino (FEIJÃO *et al.*, 2013), ou aqueles causados pelo congelamento, (RUIZ *et al.*, 2002), pelo acúmulo de metais pesados (SHARMA E DIETZ, 2009), e aos devidos à interação de patógenos com as plantas (CECCHINI; MONTEOLIVA; ALVAREZ, 2011), dentre outros estímulos. Estes têm sido o principal estímulo na pesquisa do metabolismo da prolina na fisiologia de plantas sob condições estressantes. No entanto, dados recentes sugerem funções adicionais para a prolina, os quais estão fornecendo ainda mais razões para entender seu metabolismo como, por

exemplo, seu papel na senescência de folhas e pétalas (ZHANG; BECKER, 2015; ZHANG *et al.*, 2015).

Além da regulação específica de suas vias de síntese e catabolismo, a compartimentação do metabolismo da prolina entre citosol, mitocôndria e cloroplasto também é de importância crítica, porém ainda não completamente compreendida. O transporte de prolina, tanto intracelular como intercelular, possui diferenças específicas dependendo do tecido analisado e das relações do metabolismo da prolina com outras vias metabólicas importantes (ZHANG; BECKER, 2015).

A acumulação de prolina pode influenciar a tolerância aos estresses abióticos de várias maneiras. Foi demonstrado que a prolina pode funcionar como uma chaperona molecular capaz de proteger a integridade das proteínas e melhorar as atividades de diferentes enzimas (MOSTEK *et al.*, 2015). Exemplos de tais papéis incluem a prevenção da agregação de proteínas durante temperaturas extremas (FEDOTOVA; DMITRIEVA, 2016), proteção da redutase do nitrato durante o estresse osmótico e o causado por metal pesado (SHARMA *et al.*, 1998) e estabilização de ribonucleases e proteases após a exposição ao arseniato (MISHRA; DUBEY, 2006). Diversos estudos têm atribuído à prolina propriedades antioxidantes, eliminando o excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente removendo o oxigênio singlete (ANJUN *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2018). Os efeitos prejudiciais do oxigênio singlete e dos radicais hidroxil no fotossistema II (PSII) podem ser reduzidos pela prolina em membranas de tilacoides isoladas (REDDY *et al.*, 2015). O tratamento com prolina pode diminuir os níveis de EROs em fungos e leveduras, impedindo assim a morte celular programada (CHEN; DICKMAN, 2005) e pode proteger as células humanas contra o estresse oxidativo potencialmente causador de câncer (PHANG *et al.*, 2015).

2.5. Metabolismo da prolina

A rota metabólica da prolina foi primeiramente descrita em bactérias. Neste grupo, a prolina é sintetizada a partir do glutamato em três etapas: 1. O glutamato é fosforilado pela cinase do γ -glutamil, usando ATP, resultando em glutamil- γ -fosfato o qual é reduzido a glutâmico- γ -semialdeído (GSA) pela desidrogenase do glutâmico- γ -semialdeído. A ciclização reversível do GSA a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) é espontânea e seguida pela redução da P5C à prolina catalisada pela redutase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5CR), com consumo de NADPH (FICHMAN *et al.*, 2015). A biossíntese de prolina em outros reinos segue o mesmo caminho, embora existam diferenças. As atividades da cinase do γ -glutamil e da desidrogenase do glutâmico- γ -semialdeído são conservadas em bactérias (genes *ProA* e *ProB*) e leveduras (*PRO1* E *PRO2*).

Todavia, em plantas e animais, as atividades das enzimas cinase do γ -glutamil e da desidrogenase do glutâmico- γ -semialdeído são combinadas numa enzima bifuncional denominada sintetase da P5C (P5CS), a qual requer tanto ATP quanto NADPH. As enzimas cinase do γ -glutamil, em bactérias e leveduras, e a P5CS, em plantas, catalisam a etapa limitante da biossíntese de prolina e são reguladas por inibição alostérica do produto final, ou seja, a prolina (HAYAT *et al.*, 2012). Os genomas vegetais normalmente apresentam dois genes homólogos (parálogos) que codificam duas enzimas: a P5CS1, que é distribuída no citosol e nos cloroplastos, e a P5CS2, que é expressa exclusivamente no citosol. Essas duas enzimas têm padrões de expressão diferentes, funcionando de acordo com a idade da planta e estádios de vida (ZHANG; BACKER, 2015). Os padrões de expressão indicam que os parálogos da P5CS têm funções diferentes durante o desenvolvimento da planta, embora as funções específicas difiram entre as espécies de plantas (WANG *et al.*, 2015). A análise dos mutantes nocauteados de *Arabidopsis thaliana p5cs1* e *p5cs2* confirmou a função não redundante das isoformas para desenvolvimento de plantas e tolerância ao estresse (SZÉKELY *et al.*, 2008). Dados de filogenia sugerem que houve duplicações repetidas,

independentemente, dos genes da P5CS após a divergência entre monocotiledôneas e dicotiledôneas, permitindo uma especialização funcional (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2009).

A P5C produzida na etapa descrita acima é convertida em prolina pela ação da P5CR. Esta enzima possui duas isoformas, as quais foram bioquimicamente identificadas, embora atualmente não esteja claro se as duas isoformas são originárias de um ou dois genes (KAUR; ASTHIR, 2015). Nas plantas, a atividade da P5CR foi detectada no citosol e nos plastídios de várias espécies de plantas e, assim como as isoformas de P5CS, diferem em sua distribuição entre esses dois compartimentos, dependendo das condições ambientais (ARENTSON; SANYAL; BACKER, 2012).

As plantas possuem uma via alternativa de síntese de prolina, que envolve a δ -aminotransferase da ornitina (OAT), enzima que converte ornitina e α -cetoglutarato em P5C por uma reação de transaminação (FICHMAN *et al.*, 2015). A localização subcelular da OAT nas mitocôndrias provavelmente gera uma barreira para a utilização direta da P5C gerada a partir da P5CR (FUNCK *et al.*, 2008). Embora possa haver síntese de prolina via metabolismo da ornitina, a via do glutamato é considerada a principal via para a síntese de prolina nas plantas sob condições fisiológicas adequadas ou durante condições de estresse, enquanto que a via da ornitina é essencial para a reciclagem de nitrogênio da arginina (IQBAL *et al.*, 2014).

A degradação da prolina em eucariotos ocorre na mitocôndria e, portanto, é separada espacialmente da via biossintética do glutamato (KAVI-KISHOR *et al.*, 2015). O catabolismo da prolina começa com sua oxidação à P5C pela desidrogenase da prolina (ProDH), também conhecida como prolina oxidase, e que usa o FAD como cofator. A ProDH é a enzima limitante do processo de degradação. A P5C é subsequentemente convertida em glutamato pela desidrogenase da pirrolina-5-carboxilato (P5CDH), utilizando o NAD^+ como cofator. As

duas enzimas, portanto, geram NADH e FADH₂ que podem doar seus elétrons para a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (SINGH *et al.*, 2015a).

Recentemente, um ciclo chamado P5C-prolina foi descrito mostrando que a P5C produzida a partir de prolina, nas mitocôndrias, pode ser transportada para o citosol e reduzida para prolina pela P5CR citosólica (QAMAR *et al.*, 2015). Quando a atividade da P5CDH é limitada, o ciclo P5C-prolina pode transferir elétrons em excesso para a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e gerar EROs (ZHANG *et al.*, 2017). A compartimentação do metabolismo da prolina implica que um extenso transporte intracelular de metabolitos deve ocorrer entre o citosol, os cloroplastos e as mitocôndrias. Os dados fisiológicos sugerem que a entrada de prolina nas mitocôndrias é um processo ativo, sugerindo a existência de transportadores específicos de aminoácidos (ARENTSON; SANYAL; BACKER, 2012). Os transportadores de prolina de membrana plasmática, identificados em várias plantas, medeiam o transporte de prolina entre células e órgãos, entretanto, nem todos transportadores envolvidos no transporte entre as organelas são conhecidos (SCHETL *et al.*, 2014).

2.6. Regulação do metabolismo da prolina durante o estresse

Os níveis de prolina são regulados, principalmente, pela expressão das enzimas e genes da P5CS e ProDH. A expressão da P5CS é regulada na transcrição e, provavelmente, a nível pós-transcricional. No entanto, a sinalização de indução e inibição da P5CS não é completamente entendida. A indução da expressão da P5CS, conforme os dados obtidos até hoje, se dá principalmente por fatores ambientais e hormônios vegetais (AMINI; GHOBADI; YAMCHI, 2015). A regulação da transcrição e o estudo de mutantes indicam que os dois genes da P5CS em *Arabidopsis* possuem funções claramente distintas. Nessa espécie existem duas isoformas de P5CS, que desempenham papéis específicos no controle da biossíntese da prolina (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014). O gene *p5cs1* dessa enzima é expresso, principalmente na parte aérea (ZAREI; EHSANPOUR; ABBASPOUR, 2012) e sua

transcrição é fortemente induzida em condições de alta salinidade, desidratação e baixas temperaturas (BURRIT, 2012). Mutantes silenciados no gene *p5cs1* apresentaram níveis de prolina muito baixos sob estresse salino e hídrico (SZEKELY *et al.*, 2008). Em contraste com o *p5cs1*, a expressão gênica de *p5cs2* tem pouca ou nenhuma regulação na transcrição sob estresse e todas as indicações são de que ele tem apenas um papel menor na acumulação de prolina induzida pelo estresse abiótico (MATTIOLI *et al.*, 2012). O gene *p5cs2* pode ser induzido em resposta a agentes patogênicos e pode estar mais ativamente envolvido na interação planta-patógeno (FABRO *et al.*, 2004). Além disso, a P5CS2 é expressa mais abundantemente em cultura de células em suspensão (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). As propriedades enzimáticas da P5CS2 e do seu gene associado têm sido relativamente pouco estudadas.

A cinética enzimática e a regulação pós-traducional da ProDH carece ainda de mais informações. Em analogia com a enzima bacteriana, o FAD é considerado como o transportador de elétrons, porém nenhum estudo concluiu que este é de fato o carreador de elétrons nas reações catalisadas pela ProDH (HOSSAIN *et al.*, 2014). A expressão do gene *prodh* é reduzida em circunstâncias de baixo potencial hídrico, desidratação e salinidade, mas sua expressão é aumentada quando o estresse é removido ou em presença de prolina exógena (TEH *et al.*, 2016). A regulação negativa da expressão de *prodh* durante o estresse é amplamente aceita como um ponto de controle que pode promover a acumulação de prolina sob condições de estresse. No entanto, surpreendentemente, a regulação positiva do *prodh* durante o estresse foi relatada quando foram acumulados níveis elevados de prolina (KAPLAN *et al.*, 2007). As mudanças na expressão do gene *prodh* entre diferentes tecidos ainda é assunto pouco explorado na literatura.

A análise da atividade enzimática da OAT em extratos de *Arabidopsis* sob estresse salino mostrou que sua atividade dobrou nas primeiras 24 h e continuou a aumentar até 72 h após o início do estresse (VERSULES; SHARMA, 2008). Estudos que mostram uma

diminuição da acumulação de prolina na presença do inibidor de OATs, a gabaculina, apoiam a ideia de que esta tem um papel significativo na síntese de prolina, embora seja claramente secundária a síntese de prolina a partir do glutamato (STRANSKA *et al.*, 2008). Além disso, a superexpressão de OAT resulta em maior acumulação de prolina (GINGUAY *et al.*, 2017). Funck *et al.* (2008), utilizando mutantes de *Arabidopsis* propuseram que a OAT não está envolvida na acumulação de prolina induzida pelo estresse salino. Um outro estudo, também com *Arabidopsis*, mostrou que a indução da OAT por estresse salino ocorre em plântulas, porém não apresentou atividade em plantas estabelecidas (ROOSENS *et al.*, 2002). A questão sobre o papel da OAT durante os eventos de estresse ainda permanece inconclusiva. Uma provável hipótese diz que a OAT contribui para a síntese de prolina e provavelmente isso ocorre pela produção de P5C nas mitocôndrias. Neste caso, há duas possibilidades: a P5C poderia ser exportada para o citosol, para que pudesse ser convertida diretamente em prolina ou a P5C poderia ser convertida a glutamato e este transportado para ser utilizado para a síntese de prolina em outro lugar (SHARMA; VERSULES, 2010).

2.7. Fornecimento exógeno de prolina

Quando expostas a estresses abióticos, como a salinidade, as plantas experimentam inibição ou retardo do crescimento. Todavia, a aplicação de prolina tem se mostrado uma alternativa potencialmente significativa na mitigação dos efeitos danosos provocados pela salinidade. Estes efeitos benéficos têm sido observados desde o cultivo de *callus* de células (AMALI, KINGSLEY E IGNACIMUTHU, 2013) até em diversos órgãos de plantas já estabelecidas (AGGARWAL *et al.*, 2011; FREITAS, 2013; HASANUZZAMAN, ALAM E RAHMAN, 2014).

A literatura mostra três principais formas de aplicação de prolina: 1) provendo prolina diretamente na solução nutritiva; 2) aspergindo-se uma solução de prolina nas folhas, juntamente com um composto que facilite sua penetração, como o Tween 20 ou o Triton X-

100 e 3) pré-tratando-se as sementes, deixando-as incubadas em solução contendo prolina durante certo tempo a depender dos envoltórios que a semente possa apresentar. As diferentes formas de aplicação podem resultar em benefícios para as plantas, e há evidências indiretas da existência de transportadores de prolina em diferentes órgãos das plantas (SREESHAN *et al.*, 2014). A priori, quaisquer das metodologias acima descritas podem ser aplicadas em qualquer sistema vegetal não havendo na literatura limitação por qualquer das formas de tratamento. 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.

2.8. O sorgo

O sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) é uma planta monóica, com metabolismo C₄, de ciclo anual (90 a 130 dias) e pertencente à família Poaceae (MAY *et al.*, 2012). A provável origem do sorgo está na região tropical Africana onde, durante a domesticação desta espécie por séculos, foi submetida a mudanças a fim de atender as exigências e demandas do ser humano (SILVA *et al.*, 2014). A planta não foi inicialmente apontada para o desenvolvimento de culturas energéticas, todavia algumas características a tornaram uma forte candidata a ser uma das mais utilizadas para a geração de energia, sendo somente nas últimas décadas investidos recursos em pesquisas para o melhoramento de híbridos específicos para esta finalidade (CASTRO *et al.*, 2014).

A planta de sorgo se adapta a um leque de condições ambientais, principalmente sob circunstâncias de deficiências hídricas comumente desfavoráveis à maioria dos outros cereais além de ser responsivo às boas práticas agrícolas e de manejo, sendo passível de inovação tecnológica competitiva para a sua utilização e usos (DINIZ, 2010). Esta característica permite que a cultura seja apta para desenvolvimento e expansão em regiões de cultivo com distribuição irregular de chuvas e em sucessão a culturas de verão. Sendo considerado

moderadamente tolerante à salinidade, o sorgo tem se mostrado bem adaptado às regiões áridas e semiáridas (RANI *et al.*, 2012).

A produção total de sorgo no mundo supera 65 milhões de toneladas, das quais aproximadamente 30% encontram-se em países desenvolvidos (MULLET *et al.*, 2014). Atualmente, o sorgo é o quinto cereal mais produzido no mundo, ficando atrás do milho (*Zea mays* L.), do trigo (*Triticum aestivum* L.), do arroz (*Oryza sativa* L.) e da cevada (*Hordeum vulgare* L.) (USDA, 2017), sendo utilizado como alimento básico para mais de 500 milhões de pessoas distribuídas em 98 países (KOWAL, 2017). No Brasil, de acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento, existem 804,5 mil hectares plantados com sorgo, sendo o Ceará o 4º estado em produção com apenas 1 mil hectares (CONAB, 2016).

O sorgo é uma espécie com grande variabilidade genética devido aos muitos híbridos existentes e suas aptidões produtivas, sendo uma planta de elevado valor nutritivo (AVELINO *et al.*, 2011) e que pode também ser utilizada para a produção de etanol (KIM; DAY, 2011). No Brasil, o sorgo vem sendo cultivado principalmente visando à produção de grãos, para suprir a demanda das indústrias de ração animal ou como forragem para alimentação de ruminantes, sendo que, praticamente, não há consumo desse cereal na alimentação humana (QUEIROZ *et al.*, 2014).

A diversidade de variedades e cultivares de sorgo têm sido relacionada ao movimento de pessoas, à seleção disruptiva, ao isolamento geográfico, ao fluxo de genes de plantas selvagens para plantas cultivadas e reconstrução desses tipos em diferentes ambientes, bem como o desenvolvimento de genótipos tolerantes a estresses abióticos (WESTENGEN *et al.*, 2014). Os genótipos disponíveis atualmente no mercado têm alta produtividade, são resistentes a doenças e apresentam boa estabilidade de produção dada a capacidade da planta de se adaptar às mudanças climáticas, o que minimiza riscos de perda (PURCINO, 2011). Adicionalmente, esta espécie teve seu genoma sequenciado e disponibilizado, o que facilita seu estudo (PATERSON *et al.*, 2009).

Portanto, a contribuição para o entendimento dos mecanismos de resistência ao estresse salino na cultura de sorgo torna-se relevante para que sua exploração nas áreas áridas e semiáridas seja o mais eficiente possível.

3. HIPÓTESES

- Os efeitos deletérios da salinidade no crescimento e desenvolvimento das plantas de sorgo podem ser minimizados pela aspersão de prolina;
- A prolina exógena auxilia na modulação dos níveis de íons tóxicos e no ajustamento osmótico devido a solutos compatíveis;
- O aporte de prolina altera a atividade e a expressão das enzimas envolvidas no seu metabolismo e essa alteração é necessária para a efetividade dos efeitos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

O presente estudo teve por objetivo investigar as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares da aplicação foliar de prolina durante a aclimatação de plantas de sorgo às condições de salinidade.

4.2. Objetivos específicos

Utilizando plantas de sorgo aspergidas ou não com prolina e cultivadas sob condições controle ou de estresse salino, pretendeu-se:

- Determinar a melhor dose de prolina capaz de minimizar os efeitos do estresse salino no crescimento das plantas de sorgo, determinando: a área foliar, a altura e diâmetro do colmo e as massas fresca e seca de folhas e raízes;
- Analisar as alterações no teor relativo de água, nos danos de membranas, nas trocas gasosas e nos pigmentos fotossintéticos;
- Determinar as modificações nos teores de solutos inorgânicos (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}) e orgânicos (prolina, carboidratos solúveis e N-aminossolúveis) e na composição de aminoácidos livres, em folhas e raízes de plantas de sorgo.
- Analisar as atividades das enzimas relacionadas à biossíntese [sintetase da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5CS) e aminotransferase da D-ornitina (OAT)] e degradação [desidrogenase da prolina (ProDH) da prolina, em folhas e raízes;
- Investigar as alterações provocadas pela aspersão de prolina na expressão dos genes envolvidos no metabolismo da prolina em folhas e raízes;

5. MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos, foram realizados três experimentos: No Experimento I, determinou-se a concentração de prolina a ser aspergidas nas plantas de sorgo de modo a minimizar os efeitos deletérios da salinidade no crescimento das plantas. Ao estabelecer a concentração de prolina que forneceu melhor resposta à redução dos efeitos da salinidade, procederam-se a dois experimentos: No Experimento II, determinaram-se os parâmetros de crescimento, os danos de membranas, o teor relativo de água, as trocas gasosas, os teores de pigmentos fotossintéticos, de solutos inorgânicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) e orgânicos (N-aminossolúveis, carboidratos solúveis e prolina), bem como determinou-se a composição de aminoácidos livres e as alterações nas atividades de enzimas do metabolismo da prolina (sintetase da $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato, aminotransferase da δ -ornitina e desidrogenase da prolina), em folhas e raízes. No experimento III, foi avaliado o padrão de expressão dos genes envolvidos (*p5cs1*, *p5cs2*, *prodh* e *oat*), usando para isso a técnica de PCR em tempo real.

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), cultivar CSF 20, sendo as sementes adquiridas do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Os experimentos descritos a seguir foram conduzidos em casa de vegetação e os ensaios realizados nos laboratórios do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os valores médios de temperatura diurna e noturna na casa de vegetação foram, respectivamente, $31\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ e $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$, com umidade relativa do ar média de 60%.

5.1. Experimento I – Determinação da concentração de prolina a ser aspergida nas folhas das plantas de sorgo

5.1.1. Semeadura, tratamentos e coleta

As sementes 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. Em copos de plástico (200 mL), contendo vermiculita umedecida com água destilada, foram semeadas quatro sementes. As plântulas em desenvolvimento foram irrigadas diariamente com água destilada durante sete dias e, depois, transferidas para bacias plásticas contendo 10 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), diluída 1:2, onde permaneceram por três dias, sob aeração constante para aclimação à condição hidropônica. A seguir, as plantas foram transferidas para vasos de plásticos contendo 6 L da mesma solução nutritiva, sendo deixada uma planta por vaso.

As plântulas foram separadas em grupos e submetidas ao tratamento com prolina, o qual constou da aspersão foliar desse aminoácido em seis concentrações: 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mM, sendo as plantas cultivadas na presença de NaCl a 75 mM. Como controle positivo do experimento, um grupo de plantas foi aspergido com água desionizada e cultivado em solução nutritiva sem a presença de NaCl; como controle negativo, um outro grupo de plântulas teve as folhas aspergidas com água desionizada e cultivadas em presença de NaCl a 75 mM, o qual foi adicionado na solução de cultivo em duas parcelas diárias de 37,5 mM para evitar choque osmótico às plantas. Cada tratamento foi conduzido com seis repetições, sendo uma repetição constituída por uma plântula por vaso.

No tratamento com prolina, as plântulas foram pulverizadas com 10 mL da solução desse aminoácido nas concentrações descritas acima por duas vezes ao dia, durante dois dias seguidos. À solução de aspersão de prolina, foi adicionado Tween 20 a 0,1% para facilitar a penetração do soluto. Para evitar a evaporação da solução e garantir o máximo da penetração da prolina, as soluções aspergidas foram aplicadas antes das 7 h do dia (primeira aspersão) e após as 17 h (segunda aspersão). A primeira aplicação de prolina foi concomitante com a adição da primeira parcela de NaCl. A solução nutritiva foi aerada e o seu volume mantido pela adição diária de água destilada, sendo o pH mantido próximo a 6,0. Os nutrientes foram repostos pela renovação da solução nutritiva em intervalos de três dias. Após 14 dias do início

dos tratamentos (DAT), as plantas foram coletadas, separadas em suas diversas partes para realização das medidas relacionadas ao crescimento.

5.1.2. Medidas de crescimento

Para a análise do crescimento, foram determinadas a área foliar (AF), a altura e diâmetro do colmo, as massas frescas da parte aérea (MFPA) e raízes (MFR), as massas secas da parte aérea (MSPA) e raízes (MSR). A AF foi determinada com um integrador de área (modelo LI – 3100 Area Meter, Li-Cor., Inc, Lincoln, Nebraska, USA). Para obtenção da massa fresca (MF) as partes das plantas foram pesadas em balança de precisão. Em seguida, esses tecidos foram secados em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C, por 72 h, até atingir peso constante, para obtenção da massa seca (MS). A altura do colmo (AC) foi determinada com uma régua graduada, enquanto que o diâmetro do colmo (DC) foi determinado com um paquímetro digital.

5.1.3. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2×2 composto por duas condições de crescimento (ausência ou presença de NaCl 80 mM na solução nutritiva) e duas condições de pulverização (ausência ou presença de 30 mM de prolina). O experimento foi conduzido com seis repetições, cada uma representada por uma planta. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando significativo a $p \leq 0,05$, as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sisvar.

5.2. Experimento II – Alterações no crescimento, bioquímica e fisiologia de plantas de sorgo em condições de salinidade e influência da prolina exógena

5.2.1. Semeadura e tratamentos

Este experimento foi realizado nas mesmas condições de semeadura e crescimento descritas no experimento anterior, sendo a prolina utilizada apenas na concentração de 30 mM para aspersão (concentração determinada no Experimento I) e de acordo com os tratamentos a seguir: **1. controle/água:** aspersão foliar com 10 mL de água desionizada e sem adição de NaCl na solução nutritiva; **2. controle/prolina:** aspersão foliar com 10 mL de solução com prolina a 30 mM e sem adição de NaCl na solução nutritiva; **3. salino/água:** aspersão foliar com 10 mL de água desionizada e adição de NaCl a 75 mM na solução nutritiva; e **4. salino/prolina:** aspersão foliar com 10 mL de solução de prolina e adição de NaCl a 75 mM na solução nutritiva. As condições de aplicação de NaCl e de prolina foram as mesmas descritas no Experimento I. Foram realizadas duas coletas, sendo a primeira aos 7 DAT e a segunda aos 14 DAT.

5.2.2. Coleta do material vegetal e parâmetros de crescimento

As determinações de AF, MFPA, MFR, MSPA, MSR foram feitas como descritas no Experimento I. Para a determinação de solutos inorgânicos foram utilizados tecidos secos em estufa, enquanto que para as outras determinações foram utilizados material fresco recém-coletado, ou congelado ou liofilizado e armazenados a -20 ° C.

5.2.3. Determinação de danos de membrana e teor relativo de água

Para a determinação dos danos de membrana foram utilizados tecidos frescos de folhas e raízes recém-coletados, sendo os danos avaliados pelo vazamento de eletrólitos e seguindo metodologia descrita por Singh *et al.* (2007). Para isso, cerca de 10 discos de 1 cm de diâmetro das primeiras folhas completamente expandidas ou cerca de 100 mg do terço distal

de raízes foram incubados em tubos de ensaio contendo água desionizada, à temperatura ambiente (25 °C) durante 6 h. Passado esse tempo, foi medida a condutividade elétrica da solução (CE₁). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 95 °C por 30 min. Quando os tubos retornaram à temperatura ambiente a condutividade elétrica foi novamente medida (CE₂). Os dados obtidos foram empregados para calcular os danos de membrana (DM), em percentagem, empregando-se a fórmula: $DM (\%) = (CE_1) / (CE_2) \times 100$. Os valores representam a média de seis repetições.

O teor relativo de água (TRA) foi determinado como descrito por Catský (1960). Para isso, foram utilizados 10 discos, de 1 cm de diâmetro, das primeiras folhas completamente expandidas. Após pesagem para a obtenção da massa fresca (MF), os discos foram colocados em placas de Petri contendo água destilada quando então permaneceram por 6 h, sendo em seguida pesados para a obtenção da massa túrgida (MT). Posteriormente, os discos foliares foram levados a uma estufa de circulação forçada de ar a 60 °C e deixados por 72 h para a obtenção da massa seca (MS). Para a determinação do TRA, em percentagem, utilizou-se a fórmula: $TRA (\%) = [(MF - MS) / (MT - MS)] \times 100$. Os valores representam a média de seis repetições.

5.2.4. Trocas gasosas

No dia da coleta, foram realizadas as medições de trocas gasosas em folhas totalmente expandidas sob concentração de CO₂ e densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (PPFD – do inglês *Photosynthetic Photon Flux Density*) constantes, de aproximadamente 380 μmol mol⁻¹ de CO₂ e 1.200 μmol fótons m⁻² s⁻¹, respectivamente. As medições foram efetuadas entre as 9 e 11 h do dia, sendo medida a taxa de fotossíntese líquida, a condutância estomática, a taxa de transpiração e a concentração interna de CO₂ sendo, para isso, utilizado um analisador portátil de gás no infravermelho (IRGA, mod. LCI, ADC, Hoddesdon, Reino

Unido), portando uma fonte de luz artificial (ADC, Hoddesdon, Reino Unido). Os valores representam a média de seis repetições.

5.2.5. Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Wellburn (1994). A extração de clorofila e de carotenoides foi feita a partir de discos foliares de 1 cm de diâmetro (200 mg), obtidos das primeiras folhas completamente expandidas. Em tubos de ensaio, com tampa rosqueada contendo os discos, foram adicionados 2 mL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) para extração dos pigmentos. Os tubos de ensaio foram devidamente tampados e revestidos com papel alumínio, sendo deixados por 24 h à temperatura ambiente. Após esse tempo, os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C, por 45 min, para solubilização dos pigmentos. Após o retorno à temperatura ambiente, foram feitas, na solução de extração, leituras de absorvância nos comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm. Os valores de absorvância obtidos foram utilizados para estimar os teores de clorofila *a*, *b* e *total* e de carotenoides *totais*, todos sendo expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ MF. Os valores representam a média de seis repetições.

5.2.6. Solutos inorgânicos: sódio, potássio, cálcio e cloreto

Os extratos contendo os íons Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- foram preparados a partir da homogeneização, em tubos de ensaio, de 10 mg do material seco em estufa de folhas e raízes com 5 mL de água desionizada. A mistura foi deixada sob agitação constante por 1 h, a 40 °C, em banho-maria, com agitação a cada 15 min. 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, sendo o precipitado descartado.

Os teores dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Malavolta *et al.* (1989), utilizando-se o fotômetro de chama (Micronal, modelo B462), sendo feita uma leitura para cada extrato (repetição). Para a determinação dos teores

de Cl^- , a 3,0 mL de extrato, convenientemente diluído, foram adicionados 0,5 mL da solução formada pela mistura 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 de 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 resultados de cloreto estimados utilizando-se uma curva padrão com NaCl (Gaines *et al.*, 1984). Para determinação dos teores de cloreto, cada extrato (repetição) foi dosado em triplicata. Os teores dos íons inorgânicos foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS. Os valores representam a média de seis repetições.

5.2.7. Solutos orgânicos

5.2.7.1. N-aminossolúvel e carboidratos solúveis

Os extratos para determinação de N-aminossolúveis e carboidratos solúveis foram preparados a partir do pó liofilizado de folhas e raízes das plantas de sorgo. Trinta miligramas dos tecidos foram homogeneizados com 5 mL de etanol a 80% (v/v). O homogenato foi mantido a 75°C em banho-maria, durante 1 h, com agitações a cada 15 min. Transcorrido esse tempo, a amostra foi centrifugada a 3.000 x g por 10 min a 4°C, sendo 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 coletados foram reunidos e seu volume completado para 25 mL com etanol a 80% (v/v), sendo, em seguida, armazenados a - 25°C até sua posterior utilização.

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 μL do extrato convenientemente diluído, 250 μL de tampão citrato de sódio a 0,2 M, pH 5,0, 500 μL de KCN a 0,2 mM, em metilcelosolve a 100%, e 100 μL de ninhidrina a 5%, também em metilcelosolve a 100%. Após agitação, os tubos foram fechados e transferidos

para banho-maria a 100 °C, durante 15 min. Decorrido esse tempo, a reação foi encerrada pelo resfriamento dos tubos em banho de gelo. Em seguida, foram adicionados aos tubos 650 µL 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 µL 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. Os valores foram expressos em µmol g⁻¹ MS e representaram medidas de 6 repetições, sendo cada extrato dosado em triplicata.

Os teores de carboidratos solúveis foram determinados de acordo com o método descrito por Dubois *et al.* (1956). Em tubos de ensaio, adicionaram-se 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 fortemente 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 foram estimados através de uma curva padrão com concentrações conhecidas de D (+) glicose anidra. Os resultados foram expressos em µmol g⁻¹ MS e representam a média de seis repetições (extrato), cada um dosado em triplicatas.

5.2.7.2. *Prolina livre*

O extrato para determinação dos teores de prolina, um iminoácido, foi preparado macerando-se, em almofariz, 250 mg do pó liofilizado de folhas e raízes com 1,5 mL de ácido sulfossalicílico a 3% (p/v), por 5 min. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 3.000 x g por 20 min. O sobrenadante (extrato) foi mantido a - 25°C até sua posterior utilização.

Os teores de prolina foram determinados de acordo com o método descrito por Bates *et al.* (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 em tolueno) retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur. A quantificação dos teores de prolina foi feita pelas leituras de absorvância em 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 e foram expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ MS. Os valores representam a média de seis repetições (extrato), cada um dosado em triplicata.

5.2.7.3. Aminoácidos livres: *asparagina, aspártico, glutâmico, glutamina e serina*

A extração dos aminoácidos livres Asn, Asp, Glu, Gln e Ser foi feita de acordo com a metodologia proposta por Bialeski e Turner (1966), sendo todos os procedimentos realizados a 4 °C. Inicialmente, foram macerados 50 mg de tecidos congelados de folhas e raízes com nitrogênio líquido. Ao macerado, foi adicionado 1,0 mL da solução extratora contendo metanol, clorofórmio e água na proporção 12:5:3 (v/v/v), sendo a mistura homogeneizada com auxílio de almofariz e pistilo. O homogenato foi centrifugado a 4.000 x g, durante 10 min. O sobrenadante foi coletado em tubo de ensaio com tampa rosqueável, previamente resfriado. O precipitado da etapa anterior foi ressuscitado com mais 1,0 mL da solução extratora, sendo seguido de nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. Após reunir os sobrenadantes, acrescentaram-se, em cada tubo, 0,5 mL de clorofórmio e 0,75 mL de água milli-Q. A mistura foi agitada e deixada em repouso durante 24 h, a 4 °C, para a separação das fases. A fase superior (aquosa) de cada tubo foi coletada com auxílio de uma pipeta Pasteur e

transferida para microtubo de eppendorf. Os microtubos, contendo os extratos das várias amostras, foram vedados com filmes plásticos, nos quais foram efetuados furos com uma agulha de injeção, sendo, então, acondicionados em banho-maria a 40 °C, por cerca de 24 h, para a evaporação de eventuais resíduos de metanol e clorofórmio. Transcorrido esse tempo, as amostras contendo os aminoácidos foram filtradas em filtro Millipore® em polivinilideno (PVDF), com poro de 0,22 µm, e armazenadas em freezer até posterior utilização.

5.2.7.3.1. Derivatização dos aminoácidos

Antes de serem quantificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), os aminoácidos foram derivatizados. Para isso, foi utilizada a solução de OPA-borato, obtida pela mistura das soluções de O-ftaldeído (OPA) (0,025 g de OPA dissolvido em 0,5 mL de metanol grau HPLC) e de borato (2,4 g em 100 mL de água milli-Q, sendo o pH ajustado para 9,8). A solução de OPA foi misturada com 3,25 mL da solução de borato e, então, a mistura foi filtrada em filtro Millipore® em PVDF com poro de 0,22 µm. A cada 2,5 mL da solução OPA-borato preparada foram adicionados 10 µL de β-mercaptoetanol, sendo este reagente adicionado apenas no dia da análise.

Uma curva-padrão foi feita pela derivatização dos aminoácidos a partir da mistura de 100 µL de uma mistura dos padrões (Asp, Asn, Glu, Gln e Ser) com concentrações conhecidas adicionados em um vial e 300 µL do reagente OPA-borato. Os cromatogramas gerados foram utilizados como referencia para identificação e quantificação dos aminoácidos livres.

As amostras foram derivatizadas misturando 100 µL da amostra ou do padrão em um vial com 300 µL do reagente OPA-borato. A mistura foi agitada e permaneceu durante 2 min em repouso para o desenvolvimento da reação de derivatização. Após esse tempo, a mistura foi imediatamente inserida no auto-injetor do HPLC. A derivatização dos aminoácidos utilizados na elaboração da curva-padrão foi feita da mesma maneira como acima descrito.

5.2.7.3.2. *Quantificação dos aminoácidos*

Os aminoácidos foram separados por HPLC (modelo DGU-20A5R, Shimadzu, EUA), utilizando-se uma coluna C-18 de fase reversa (ODS HYPERSIL, EUA), configurando as condições de cromatografia com proporções crescentes da fase móvel B em relação a fase móvel A durante 72 min. As fases móveis foram compostas: Fase móvel A – solução contendo acetato de sódio a 50 mM, fosfato de sódio dibásico a 50 mM, 20 mL de tetraidrofurano e 20 mL de metanol (grau HPLC) em um volume final de 1000 mL completado com água milli-Q, sendo o pH ajustado para pH 7,25. A solução foi filtrada em membrana, poro 0,45 µm, com sistema Millipore® e sonicada por 20 min para retirada de gases da solução. Tampão B – solução contendo 650 mL de metanol num volume final de 1000 mL completado com água milli-Q. A solução foi filtrada e sonicada nas mesmas condições que a solução anterior.

O detector do cromatógrafo para leitura de absorvância a 240 nm foi o modelo SPD-20A, Shimadzu, Japão. O auto-injetor do aparelho foi programado para injetar 20 µL da solução derivatizada a um fluxo constante de 0,8 mL/min. Os aminoácidos livres foram identificados com base na curva padrão, através do tempo de retenção de cada aminoácido na coluna, sendo a quantificação feita pela integração da área dos picos de cada aminoácido. Os resultados foram expressos em µg g⁻¹ MF. Os valores representam a média de três repetições (extrato).

5.2.8. *Enzimas do metabolismo da prolina*

Para preparação dos extratos para determinação das enzimas do metabolismo da prolina, foram utilizados tecidos congelados de folhas e raízes. A extração foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Wang *et al.* (2011). Os extratos foram preparados a partir da homogeneização, em nitrogênio líquido, de 3 g do material congelado com 6 mL de uma solução tampão contendo: fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,4; ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA) a 1 mM; β -mercaptoetanol a 10 mM; polivinilpolipirrolidona (PVPP) a 1% (p/v); $MgCl_2$ 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 enzimáticas.

5.2.8.1. 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, formada por 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 μ L 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 atividade da P5CS foi expressa em unidades de atividade (U) por miligrama de proteína ($U\ mg^{-1}$ proteína), sendo uma U definida como sendo o aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto. Os valores correspondem à média de seis repetições, sendo cada extrato (repetição) dosado em triplicata.

5.2.8.2. Aminotransferase da δ -ornitina

Atividade da aminotransferase da δ -ornitina (OAT) foi medida utilizando-se o método de Kim *et al.* (1994). A reação se processou em um meio contendo Tris-HCl a 100 mM, pH 8,0, L-ornitina a 35 mM, α -cetoglutarato a 5 mM e piridoxal fosfato a 0,05 mM. A reação iniciou-se com a adição de 500 μ L do extrato enzimático num volume final de 2 mL. A mistura de reação foi mantida a 37 °C por 30 min. A reação foi interrompida com a adição de 0,3 mL de ácido perclórico a 3 N e 0,2 mL de ninhidrina a 2%. As leituras de absorbância foram medidas a 510 nm. Uma curva padrão foi produzida a partir da mistura do extrato enzimático com concentrações conhecidas de D/L Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato. A atividade da OAT foi expressa em unidade de atividade (U) por miligrama de proteína ($U\ mg^{-1}$ de

proteína), sendo uma U de atividade definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μmol de P5C por hora, a 50 °C. Os valores correspondem à média de seis repetições, sendo cada extrato (repetição) dosado em triplicata.

5.2.8.3. *Desidrogenase da prolina*

A atividade da desidrogenase da prolina (ProDH) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Sakuraba *et al.* (2001). A mistura de reação, para um volume final de 1 mL, continha tampão Tris-HCl a 200 mM, pH 8,0, 2,6-dicloroindofenol (DCIP) a 0,1 mM e 100 μL do extrato bruto. A reação se iniciou com a adição de 200 μL de L-prolina a 100 mM num volume final de 1 mL, sendo a mistura incubada em banho-maria a 50 °C, durante 3 min. A atividade da ProDH foi estimada pela diminuição da absorbância em 600 nm, causada pela redução do DCIP. Os resultados foram expressos em unidades de atividade (U) por miligrama de proteína (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. Os valores correspondem à média de seis repetições, sendo cada extrato (repetição) dosado em triplicata.

5.2.9 *Dosagem de proteínas*

Nos extratos utilizados para determinação das atividades enzimáticas foram feitas dosagens de proteína pelo método descrito por Bradford (1976). A 100 μL do extrato convenientemente diluído, foi adicionado 1 mL da solução contendo o reagente Comassie Brilliant Blue G-250 (Sigma Chemical Company). A solução de comassie 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). Os valores correspondem à média de seis repetições, sendo cada extrato (repetição) dosado em triplicata.

5.2.10. Delineamento experimental e estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×2 , sendo dois níveis de prolina (0 e 30 mM) e dois níveis de salinidade (0 e 75 mM de NaCl), com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando significativo a $p \leq 0,05$, as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sisvar.

5.3. Experimento III – Modulação da expressão dos genes envolvidos no metabolismo da prolina em folhas e raízes de plantas de sorgo sob condições de salinidade e influência da prolina exógena no processo

5.3.1. Condições de crescimento

As condições de semeadura foram às mesmas descritas nos experimentos anteriores até o ponto de aclimação das plântulas na solução hidropônica. A partir deste ponto, as plântulas foram distribuídas em bacias de 10 L e foram aplicados os mesmos tratamentos acima descritos. Para acompanhar a dinâmica de expressão dos genes envolvidos no metabolismo da prolina, foram coletados tecidos de folhas e raízes de plantas de sorgo nos tempos de 0, 0,5, 1, 2, 5, 7 e 14 dias após a imposição dos tratamentos. Foi coletado um *pool* de folhas e raízes correspondente a cada tratamento. Imediatamente após as coletas, os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer a -80°C até o momento da extração.

5.3.2. Identificação *in silico* dos genes envolvidos no metabolismo da prolina

Para identificação dos genes *p5cs1*, *p5cs2*, *prodh* e *oat* relativos às enzimas do metabolismo da prolina estudadas no Experimento II (P5CS, ProDH e OAT) foram realizadas buscas no banco de dados do *National Center of Biotechnology Center* (NCBI, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), onde se pode encontrar depositado as sequências do genoma de sorgo. Identificadas as regiões dos cromossomos nas quais os genes de interesse estavam localizados e as respectivas sequências genômicas, seguiu-se a etapa de anotação, a qual consistiu na detecção da região promotora, da região transcrita (composta por regiões não traduzidas 5'UTR e 3'UTR e região codante). Após a anotação de cada gene, deduziu-se a sequência de DNA complementar (cDNA), a qual foi traduzida em uma sequência de aminoácidos usando a ferramenta *Expert Protein Analysis System* (ExpASy, disponível em <https://www.expasy.org/>).

5.3.3. Desenho dos primers específicos

O desenho dos *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados nas reações de PCR em tempo real (RT-qPCR) foi feito usando o programa Perl Primer V1.1.20 (Marshall. 2011). Esses iniciadores foram desenhados a partir da junção éxon-éxon visando minimizar a amplificação de DNA genômico. Os oligonucleotídeos desenhados na tabela 1 tiveram uma variação entre 19 e 22 pares de bases (pb), com temperatura de anelamento entre 57,5 e 65 °C e tamanho do fragmento amplificado entre 81 e 206 pb. Na tabela 1, constam os *primers* dos genes usados como normalizadores, isto é, genes que apresentaram expressão estável frente às diferentes condições experimentais, além dos iniciadores para os genes-alvo, os quais estão envolvidos com o metabolismo da prolina.

Tabela 1. Genes-alvo e constitutivos de folhas e raízes de plantas de sorgo utilizados nas análises de expressão por qRT-PCR

Gene	Sequência do primer	Amplicon (pb)	Temp. de anelamento (°C)	Número de acesso	Produto gênico
<i>p5cs1</i>	Fwd 5' ATTACACAAGGTCATAACTGGG 3'	168	65	GQ377719.2	Sintetase da Δ -1-pyrrolina-5-carboxilato 1
	Rev 5' GTTGTTGCTTTGATTGGGAG 3'				
<i>p5cs2</i>	Fwd 5' TTGTGAGCAGGTGAAGGAG 3'	206	65	GQ377720.2	Sintetase da Δ -1-pyrrolina-5-carboxilato 2
	Rev 5' GCATATCGTAAAGAGCCATGAG 3'				
<i>Prodh</i>	Fwd 5' GCCCGTGGAGCAGATCATC 3'	112	65	XM_002467483.2	Desidrogenase da prolina
	Rev 5' CCTCCTCACCAACTCCTTCCG 3'				
<i>Oat</i>	Fwd 5' GATTCTAGGCAAAGCACTCGG 3'	108	57,5	XM_002464129.2	Aminotransferase da ornitina
	Rev 5' CCGAATGTACTTCCATGTTCCC 3'				
<i>EF1β2</i>	Fwd 5' TGAGGCTGAGTGGAGTTACT 3'	134	65	XM_002463134.1	Fator de alongação- β 2
	Rev 5' AAAAAGGTCAACATCATCGTCG 3'				
<i>Fbox</i>	Fwd 5' ATGGCATTAAAGTACGCTCGTC 3'	181	59,8	XM_002450634.1	proteína F-box
	Rev 5' CTGTCACACGATCTGATGGTCC 3'				
<i>GTPB</i>	Fwd 5' TGAGTTAGCATTGTCTGGAGCATC 3'	81	57,5	XM_002441511.1	Proteína de ligação ao GTP
	Rev 5' GCCGACGAGTCCATCAATTTC 3'				
<i>SAND</i>	Fwd 5' TCAGAGCTGGCAAACATCAG 3'	121	57,5	XM_002459139.1	Proteína da família SAND
	Rev 5' CAACAACCTGACCATACATGAGC 3'				
<i>UK</i>	Fwd 5' TGGGTGGCAAGAAAGTTACAGT 3'	165	65	XM_002452867.1	Quinase do uridilato
	Rev 5' CGATCATGTTCCGTTCTCAG 3'				

5.3.4. Análise da expressão gênica via RT-qPCR

5.3.4.1. Extração do RNA total

O RNA total foi extraído utilizando para isso o “RNeasy plant mini Kit” (Quiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. Durante a extração, o RNA total foi tratado com *DNase* (Quiagen) para eliminar contaminações com DNA genômico.

Às amostras foram adicionados 710 μ L do tampão RLT e 10 μ L de β -mercaptoetanol. As etapas a seguir ocorreram à temperatura ambiente (25 °C). Após homogeneização em vortex, a mistura obtida foi pipetada para a primeira coluna do kit (QIAshredder spin column – cor lilás, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e centrifugada a 12000 x g por 2 min. O sobrenadante foi coletado em outro tubo eppendorf de 1,5 mL, descartando-se o precipitado

residual. Ao sobrenadante da etapa anterior, adicionaram-se 500 μ L de etanol. A mistura foi transferida para uma segunda coluna do kit (RNeasy mini spin column – cor rosa, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e submetida à centrifugação a 10000 x g por 20 s, sendo descartado o sobrenadante. À coluna foram adicionados 350 μ L do tampão RW1 e seguiu-se nova centrifugação a 10000 x g por 20 s. Foram adicionados 80 μ L do centrifugado da etapa anterior na região central da coluna, aguardando-se um período de 15 min. Passado o tempo, foi realizada uma segunda lavagem usando tampão RW1, seguida de nova centrifugação nas mesmas condições. Após essa etapa, o tubo coletor da coluna rosa foi descartado e trocado por um novo tubo. Na sequência, foram adicionados 500 μ L do tampão RPE, sendo a coluna centrifugada a 10000 x g por 2 min, sendo essa etapa repetida outra vez. A coluna foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL para eluição do RNA. A eluição foi feita adicionando-se 40 μ L de água livre de RNase no centro da coluna, seguindo-se de centrifugação da coluna a 10000 x g por 1 min. O RNA eluído foi armazenado a - 80 °C até sua utilização.

5.3.4.2. Avaliação da qualidade do RNA total

Para avaliar a qualidade das amostras de RNA total, primeiramente foram realizadas leituras de absorbância em 260 nm (A_{260}), 280 nm (A_{280}) e 230 nm (A_{230}), as quais são utilizadas, respectivamente, para quantificação de RNA, proteína e polissacarídeos (COUTO *et al.*, 2015), sendo tais leituras realizadas no espectrofotômetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific). Para estimar a pureza do RNA total, determinou-se a razão A_{260}/A_{280} para avaliar contaminações por proteínas (valores ideais situam-se entre 1,8 e 2,0), bem como a razão A_{260}/A_{230} para avaliar contaminações por polissacarídeos (valores ideais situam-se acima de 2,0) (PAGE, 2010). A integridade do RNA total foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5 %.

5.3.4.3. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Amostras de RNA total com alto grau de pureza e integridade foram utilizadas para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando o Kit da IMpromII™ Transcriptase Reverse (Promega, Estados Unidos), de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação consistiu de aproximadamente 1 µg de RNA total, oligodT₂₄, MgCl₂ a 25 mM, dNTPs a 10 mM, tampão de reação 5X, água livre de RNases (Quiagen) e a enzima transcriptase reversa. A reação de síntese da fita complementar foi conduzida a 42 °C, durante 1 hora, seguida de um passo de desnaturação enzimática a 75 °C por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a - 80 °C para os ensaios posteriores de qPCR. Os volumes para cada reação são descritos na tabela 2.

Tabela 2. Volumes dos reagentes aplicados para cada reação de transcrição reversa

Soluções	Volumes
RNA total	Calculado para 1 µg de RNA
Tampão 5x	4 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µL
dNTPs (10 mM)	1,0 µL
Oligo-dT ₂₄ (20 pmol mL ⁻¹)	3,0 µL
H ₂ O livre de RNases	Calculado para o volume final
Transcriptase Reversa	1 µL
Total	20 µL

5.3.4.4. PCR em tempo real (RT - qPCR)

Para as reações de qPCR de cada amostra foram utilizados 4 µL de solução contendo 100 ng do cDNA, 1 µL de solução contendo 300 ng de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*, tabela 1) e 10 µL de GoTaq qPCR Master Mix (Promega), sendo o volume completado com água ultrapura (Milli-Q) autoclavada e livre de nucleases num volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em placas com 96 poços sendo realizadas em triplicata. As reações de amplificação foram realizadas através de 40 ciclos térmicos de 15 s a 95 °C,

seguido por um período de 15 s a uma temperatura de anelamento específica para cada iniciador (tabela 1) e, por fim, 20 s a 60 °C. Também foi realizada uma curva de dissociação (melting) que consistiu em uma incubação de 15 s a 95 °C, seguido por 15 s a 60 °C e uma subida a 95 °C.

O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em um termociclador RealPlex 4S (Eppendorf®) por meio da detecção dos níveis de fluorescência. Os valores correspondem à média da leitura de três repetições.

5.4. Análise dos dados de expressão gênica

As análises dos dados foram realizadas pelo software Realplex. Os níveis de expressão gênica foram determinados utilizando a média dos valores C_t (*Cycle threshold*). Os valores brutos de C_t foram importados para o programa qbase^{plus} (versão 2.4) e convertidos em dados de expressão relativa através do método do fator de normalização (HELLEMANS *et al.*, 2007).

5.5. Delineamento experimental e estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×2 , sendo dois níveis de prolina (0 e 30 mM) e dois níveis de salinidade (0 e 75 mM de NaCl), com três repetições. Cada repetição correspondeu à união dos tecidos de 10 plantas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando significativo a $p \leq 0,05$, as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Sisvar.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Experimento I – Determinação da dose crítica de prolina

No presente trabalho, foi possível determinar a dose crítica de prolina com melhor resposta em reduzir os efeitos deletérios da salinidade no crescimento das plantas. Como esperado, a salinidade imposta à cultivar CSF 20 de sorgo reduziu drasticamente o crescimento das plantas em termos de matérias fresca e seca da parte aérea e das raízes (Tabela 3).

Tabela 3. Massas fresca e seca da parte aérea e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na presença de NaCl a 75 mM e aspergidas com diversas doses de prolina, após 14 dias da aplicação dos tratamentos. Cont⁺ – controle positivo (plantas não tratadas com prolina e cultivadas em ausência de salinidade) e Cont⁻ – controle negativo (plantas não tratadas com prolina e cultivadas em presença de NaCl a 75 mM). Dentro de cada variável, diferenças significativas são indicadas por letras maiúsculas diferentes, utilizando-se o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam as médias \pm o erro padrão.

Prolina	Massa fresca	Massa fresca	Massa seca	Massa seca
	(g planta ⁻¹)	(g planta ⁻¹)	(g planta ⁻¹)	(g planta ⁻¹)
	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes
Cont ⁺	14,14 \pm 0,75 ^A	4,12 \pm 0,36 ^A	1,896 \pm 0,068 ^A	0,307 \pm 0,033 ^A
Cont ⁻	4,76 \pm 0,03 ^E	1,04 \pm 0,07 ^F	0,742 \pm 0,033 ^F	0,035 \pm 0,008 ^E
5 mM	5,25 \pm 0,02 ^D	1,23 \pm 0,02 ^E	0,792 \pm 0,009 ^E	0,082 \pm 0,004 ^D
10 mM	5,34 \pm 0,25 ^C	1,32 \pm 0,02 ^D	0,869 \pm 0,008 ^D	0,115 \pm 0,015 ^C
20 mM	5,54 \pm 0,03 ^C	1,53 \pm 0,08 ^C	0,951 \pm 0,035 ^C	0,118 \pm 0,011 ^C
30 mM	6,10 \pm 0,29 ^B	1,84 \pm 0,12 ^B	1,057 \pm 0,029 ^B	0,143 \pm 0,006 ^B
40 mM	5,52 \pm 0,11 ^C	1,49 \pm 0,02 ^C	0,909 \pm 0,006 ^C	0,113 \pm 0,010 ^C
50 mM	4,81 \pm 0,12 ^E	1,11 \pm 0,05 ^F	0,752 \pm 0,009 ^F	0,045 \pm 0,014 ^E

Comparando o controle positivo com o controle negativo a redução causada pela salinidade foi 66% na MFPA e 75% na MFR (Tabela 3). Em termos de massa seca, esses percentuais de redução foram de 61% na parte aérea e 89% nas raízes. Observou-se que o tratamento com prolina desde a dose de 5 mM apresentou um efeito positivo no crescimento das plantas de sorgo, o qual se tornou máximo quando as plantas foram aspergidas com prolina a 30 mM. Nesta dose, a redução causada pela salinidade no crescimento foi de 57% na MFPA, 55% na MFR, 44% na MSPA e 53% na MSR. A dose de 40 mM também reduziu significativamente os efeitos da salinidade, porém sem a mesma eficiência da dose de 30 mM.

Ao se analisar essas variáveis no tratamento com prolina a 50 mM, observou-se que o tratamento não foi eficiente em reduzir os danos da salinidade.

As implicações decorrentes da salinidade e da aspersão das doses de prolina na área foliar, altura e diâmetro do colmo são mostradas na tabela 4. Na presença apenas de NaCl, houve redução de 65% na AF. A aspersão de prolina a 5 mM nas folhas das plantas de sorgo não surtiu efeito na AF. No entanto, uma menor redução na AF (56%, em média) causada pela salinidade foi observada nas doses de 10 e 20 mM. Como observado nas medidas de massas fresca e seca, novamente, a aspersão de prolina na concentração de 30 mM foi a mais eficaz em minorar os efeitos da salinidade. Nesta concentração a redução na AF foi de apenas 38% porém, a partir dessa dose, o desempenho da ação da prolina exógena na recuperação da AF foi menor e se tornou nulo na dose de 50 mM.

Tabela 4. Área foliar, diâmetro e altura do colmo de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na presença de NaCl a 75 mM e aspergidas com diversas doses de prolina após 14 dias da aplicação dos tratamentos. Cont⁺ – controle positivo (plantas não tratadas com prolina e cultivadas em ausência de salinidade) e Cont⁻ – controle negativo (plantas não tratadas com prolina e cultivadas em presença de NaCl a 75 mM). Dentro de cada variável, diferenças significativas são indicadas por letras maiúsculas diferentes, utilizando-se o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os valores representam as médias \pm o erro padrão.

Prolina	Área foliar (cm ² planta ⁻¹)	Diâmetro do colmo (mm)	Altura do colmo (cm)
Cont ⁺	224,9 \pm 41,5 ^A	20,90 \pm 0,14 ^A	35,02 \pm 1,56 ^A
Cont ⁻	71,1 \pm 8,4 ^D	17,74 \pm 0,28 ^D	15,06 \pm 0,31 ^C
5 mM	85,9 \pm 13,8 ^{CD}	18,23 \pm 0,17 ^C	15,64 \pm 0,25 ^C
10 mM	92,6 \pm 14,2 ^C	18,31 \pm 0,14 ^C	17,52 \pm 0,68 ^B
20 mM	105,4 \pm 17,6 ^C	18,77 \pm 0,16 ^C	17,76 \pm 0,27 ^B
30 mM	139,7 \pm 9,4 ^B	18,84 \pm 0,26 ^B	17,84 \pm 0,46 ^B
40 mM	109,9 \pm 11,5 ^C	17,76 \pm 0,14 ^D	17,25 \pm 0,29 ^C
50 mM	83,0 \pm 8,8 ^D	17,75 \pm 0,16 ^D	15,65 \pm 0,32 ^C

De acordo com os dados apresentados na tabela 4, a redução no diâmetro do colmo provocada pela salinidade foi de 20%. A aspersão foliar de prolina teve efeito positivo nas concentrações de 20 e 30 mM onde houve uma redução no diâmetro do colmo, em média, de apenas 15%. Por outro lado, os tratamentos a 40 e 50 mM não promoveram qualquer recuperação no diâmetro do colmo (Tabela 4). Em relação à altura do colmo, observou-se uma redução de 57% em seu valor pelo estresse salino e os tratamentos com prolina nas doses

de 10, 20 e 30 mM apresentaram efeito positivo nessa variável. Nesses tratamentos, a redução média na altura do colmo foi de apenas 49%. Já as doses de 40 e 50 mM não tiveram êxito em retomar o crescimento do colmo em altura.

Os dados aqui obtidos mostram que a aplicação de prolina por aspersão foliar mitiga os efeitos da salinidade nas variáveis de crescimento, sendo a melhor resposta obtida quando a prolina foi empregada na concentração de 30 mM. Aqui duas ponderações podem ser feitas: a primeira, o efeito positivo da prolina no crescimento até a dose de 30 mM e a segunda, o efeito positivo, porém menos pronunciado da prolina na concentração de 40 mM o que sugere que, nessa concentração, a prolina está em excesso. De fato, na dose de 40 mM puderam ser observadas algumas manchas cloróticas e na dose de 50 mM houve uma extensão maior dessas manchas (resultados não apresentados).

É importante destacar que a literatura, em sua grande maioria, aborda os efeitos benéficos do tratamento com prolina em plantas a diversos estresses; no entanto, surge a questão: quais seriam as doses aplicadas ideais para o melhor crescimento e desenvolvimento das plantas? Trabalhos abordando a temática de um efeito dose-dependente de prolina correlacionando-os com melhoramento das condições estressantes são escassos. Na análise *in vitro* do ápice da parte aérea de plantas de arroz (*Oryza sativa*) submetidas a 150 mM de NaCl, Teh *et al.* (2015) verificaram que a suplementação do meio de crescimento com prolina a 5 mM aumentou o tamanho e a biomassa das plantas, porém nas doses de 10, 15 e 20 mM não houve diferenças quando comparadas ao tratamento salino. Todavia, Hare *et al.* (2002) observaram que a aplicação de prolina em plantas de *Arabidopsis* numa dose entre 5 e 20 mM causava um efeito clorótico semelhante ao aqui relatado, apresentando perda de clorofila, diminuição da integridade de membrana nos tilacóides e danos nas cristas mitocondriais. Estas alterações repercutem diretamente na produção de energia e de esqueletos de carbono, o que culmina em perda de biomassa e produtividade. Além disso, a sensibilidade das plantas às concentrações de prolina varia de acordo com o estágio de desenvolvimento. Por exemplo,

Chen *et al.* (2011), também com plantas de *Arabidopsis*, verificaram que, aplicando-se doses entre 0–100 mM de prolina, o percentual de germinação não era afetado; porém, a partir da dose de 20 mM, o percentual de sobrevivência foi reduzido drasticamente ficando próximo a zero com prolina a 50 mM.

Diante dos resultados aqui expostos, decidiu-se optar pelo uso de prolina a 30 mM como solução de trabalho para ser aspergidas nas plantas de sorgo, como meio de minorar os efeitos negativos da salinidade no crescimento das plantas.

6.2. Experimento II – Alterações no crescimento, bioquímica e fisiologia de plantas de sorgo em condições de salinidade e influência da prolina exógena no processo

6.2.1. Crescimento, danos de membrana e teor relativo de água

Para confirmação da influência positiva da prolina exógena sobre as plantas de sorgo durante a salinidade, as variáveis de massas frescas e secas e de área foliar foram determinadas. De maneira geral, o crescimento das plantas de sorgo em condição controle (ausência de NaCl) não foi afetado quando estas foram aspergidas com solução de prolina a 30 mM. A salinidade reduziu drasticamente o crescimento das plantas, tanto da parte aérea quanto das raízes. A prolina aplicada, no entanto, foi capaz de reverter parcialmente a redução nas massas fresca e seca causadas pela salinidade, pronunciadamente a da parte aérea. Aos 7 DAT, enquanto no tratamento salino/água a redução na MFPA foi de 66%, em relação ao controle, no tratamento salino/prolina essa redução foi de apenas 55% (Figura 1A). Já aos 14 DAT, as reduções na MFPA nos tratamentos salinos foram de 70% na ausência e 52% na presença de prolina. Quanto aos resultados da MSPA (Figura 1C), nota-se um efeito positivo da prolina exógena nas plantas sob estresse salino, sendo observado um aumento em massa de 28%, aos 7 DAT e de 40%, aos 14 DAT, em relação àqueles do tratamento salino. Ainda aos 14 dias, a redução no valor da MSPA do tratamento salino/água foi de 68% da média dos controles, enquanto que com relação ao tratamento salino/prolina este valor foi de 56%.

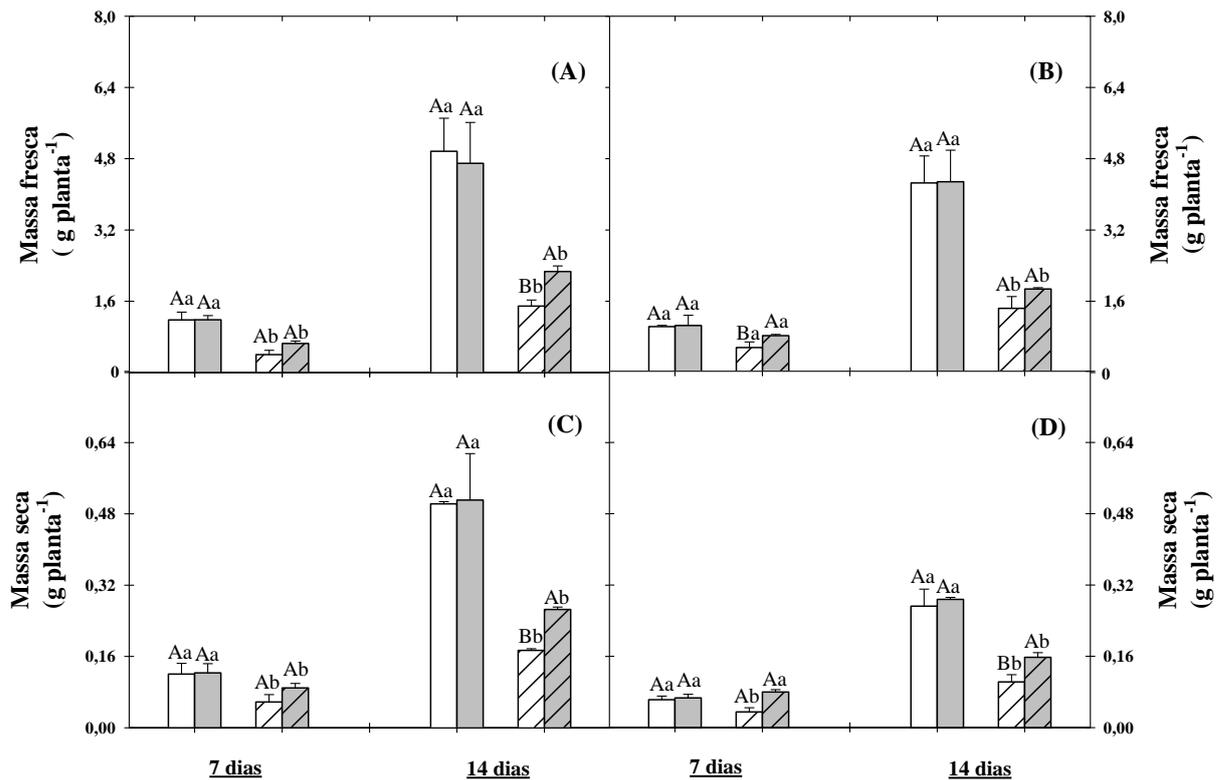


Figura 1. Massas frescas da parte aérea (A) e raízes (B) e massas secas da parte aérea (C) e das raízes (D) de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) ou na presença (▨) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) ou na presença de sal (▩), após 7 e 14 dias do início 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 DAT, a MFR não foi afetada pela salinidade ou pela aspersão de prolina (Figura 1B). Já aos 14 DAT, as raízes tiveram sua massa fresca reduzida em 66% pela salinidade sendo que, quando aspergidas com prolina, esse percentual foi de apenas 56%. Quanto à MSR das plantas, aos 7 DAT, foi observado que o tratamento salino/prolina apresentou um valor igual ao dos controles, enquanto que aos 14 DAT a perda de MSR, em relação ao controle, foi menor nas plantas aspergidas com prolina (43%) já que naquelas que não receberam o tratamento a redução foi de 65% (Figura 1D).

Apesar do genótipo CSF 20 de sorgo não responder ao tratamento com prolina em condições controle, Abdallah e El-Bassiouny (2016) relataram aumento no crescimento de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) devido à aspersão de várias concentrações de prolina

mesmo nos controles. Essa resposta foi observada também na orquídea *Cattleya walkeriana* (BORTOLOTTI *et al.*, 2016) e em berinjela (*Solanum melongena*) (SINGH *et al.*, 2015b).

Os efeitos da prolina exógena sobre o crescimento das plantas de sorgo em condições salinas foram confirmados nesse segundo experimento. Vários estudos mostram que a prolina exógena confere às plantas melhor crescimento, como observado em cevada (AGAMI, 2014) e *Onobrychis viciaefolia* (WU *et al.*, 2017). Entretanto, Nounjan e Theerakulpisut (2012), trabalhando com dois genótipos de arroz (um tolerante e outro sensível) submetidos à salinidade com NaCl a 200 mM, não observaram recuperação nas massas fresca ou seca das plantas dos dois genótipos suplementadas com prolina a 10 mM, apesar de haver melhora na defesa antioxidativa e na redução de H₂O₂. A salinidade afetou a AF nos dois tempos estudados, resultado coerente com a redução da MFPA e MSPA. A prolina exógena foi hábil em recuperar parcialmente a redução em área foliar causada pela salinidade, tanto aos 7 quanto aos 14 DAT. Aos 7 DAT, a redução em AF foi de 69% no tratamento salino/água, enquanto no tratamento salino/prolina essa redução foi de apenas 53%. Já aos 14 DAT, enquanto no tratamento salino/água a AF foi reduzida em 70%, em relação ao controle/água, no tratamento salino/prolina essa redução foi de apenas 56%.

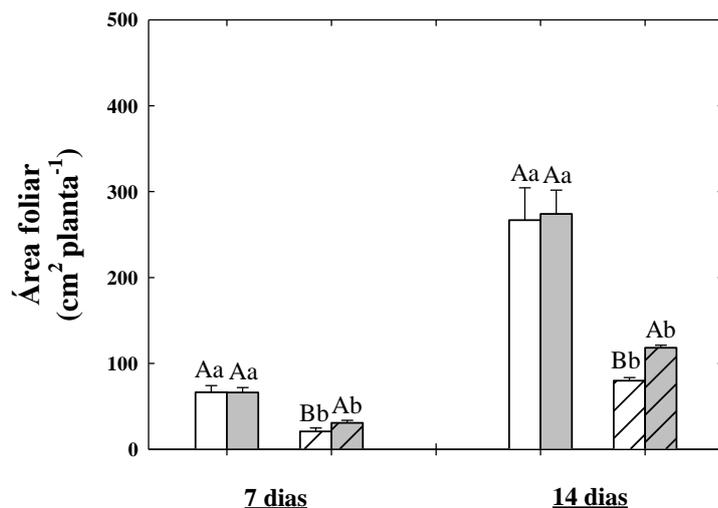


Figura 2. Área foliar de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) ou na presença (■) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) ou na presença de sal (▨) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão. Em um mesmo 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 ($p \leq 0,05$).

Quanto aos danos de membrana e TRA, não houve qualquer alteração mediada pela aspersão de prolina nas plantas na ausência de NaCl (Figura 3). Nas folhas, aos 7 DAT, os danos de membrana foram mais pronunciados nos tratamentos salinos independente da aplicação exógena de prolina sendo o dano médio causado pelo sal de 50%. Entretanto, houve uma redução de 8% nessa variável aos 14 DAT nas plantas suplementadas com prolina. Nas raízes, a prolina exógena não exerceu efeito nas plantas na presença ou na ausência de sal (Figura 3B). Os danos de membrana ocasionados pela salinidade aumentam em 150% aos 7 DAT e 155% aos 14 DAT, em relação aos respectivos controles.

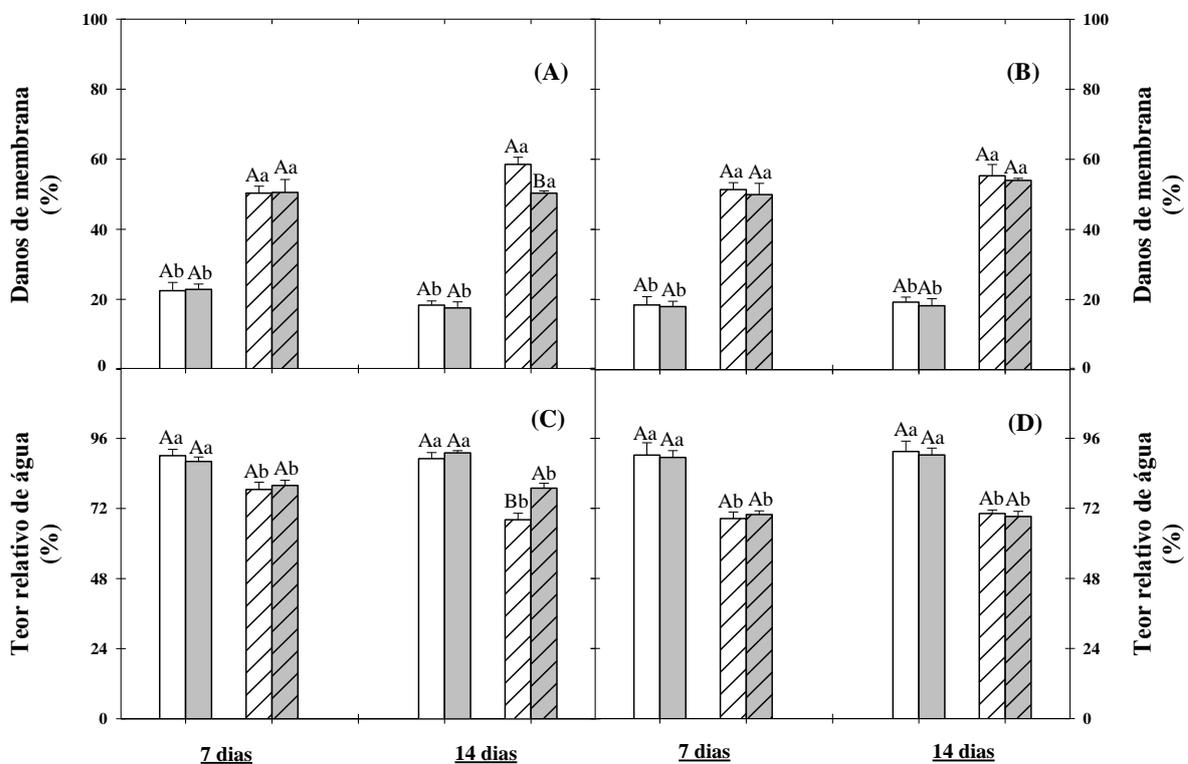


Figura 3. Danos de membrana e teor relativo de água em folhas (A e C, respectivamente) e raízes (B e D, respectivamente) de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) ou na presença (▣) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) ou na presença de sal (▣), após 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 ($p \leq 0,05$).

Assim como os danos de membrana, o TRA das folhas das plantas controle não foi afetado pela prolina aos 7 DAT (Figura 3C). Porém, aos 14 DAT observou-se um efeito positivo do tratamento com prolina sobre o TRA. O valor dessa variável das plantas do

tratamento salino/prolina foi 16% maior que aquele do tratamento salino/água. Em adição, enquanto no tratamento salino/prolina o TRA foi reduzido de 21%, no tratamento salino/água essa redução foi maior, de 32%. Nas raízes, no entanto, a prolina exógena não causou qualquer alteração no TRA (Figura 3D), porém seu valor foi reduzido pela salinidade em cerca de 11% nos dois tempos de coleta analisados.

A manutenção da expansão foliar é um requisito importante para a sobrevivência das plantas em solos com excesso de sais. Para que a planta possa ampliar sua AF é importante à manutenção da turgidez da célula. Por sua vez, a turgidez depende da integridade da membrana plasmática a qual deve manter um equilíbrio dos eletrólitos no citosol. O aumento da concentração salina no meio radicular pode levar à uma diminuição do potencial hídrico das folhas e, portanto, pode afetar muitos processos da planta (BELKHEIRI; MULAS, 2013). Os efeitos osmóticos do sal nas plantas são resultado da redução do potencial hídrico do solo devido ao aumento da concentração de soluto na zona radicular (YADAV *et al.*, 2011). Em potenciais muito baixos, esta condição interfere na capacidade das plantas para extrair água do solo e manter o turgor. A redução do conteúdo hídrico tem sido considerada como uma das maiores causas do aumento da permeabilidade da membrana celular de plantas crescendo sob estresse salino (FAROOQ; AZAM, 2006).

Como se observou, a salinidade reduziu a área foliar (Figura 2), podendo ser um reflexo direto da redução do TRA (Figura 3C e D) e de um maior vazamento de eletrólitos (danos de membrana), tanto nas folhas quanto nas raízes (Figura 3A e B). Contudo, o aporte de prolina minimizou os efeitos da salinidade, sendo verificado um acréscimo na AF (Figura 2), acompanhado de aumento no TRA e redução nos danos às membranas, sendo isso observado apenas nas folhas aos 14 DAT (Figura 3A e C). Isso mostra que a prolina exógena desempenha um papel ativo no processo de retomada do crescimento vegetal mediante uma regulação operante a qual pode ser de maneira direta ou indireta.

A aspersão de prolina a 20 mM foi eficaz no resgate do crescimento de plantas de mostarda (*Brassica juncea*) por meio do aumento dos parâmetros de AF, TRA e na redução dos danos de membrana (WANI *et al.* 2016). O ganho em área das folhas mediada pela prolina se dá por sua ação no controle da expansão e divisão celular e da morte celular programada (BANU *et al.* 2009). Quanto ao conteúdo de água, a suplementação com prolina melhorou o TRA em folhas e raízes de azeitona (BEN AHMED *et al.*, 2011), pepino (HUANG *et al.*, 2009) e ervilha (SHAHID *et al.*, 2014). Além disso, os distúrbios na estabilidade de membranas provocadas pela salinidade também foram amenizados em feijão (AGGARWAL *et al.* 2011), cevada (AGAMI, 2014) e esparceta (WU *et al.*, 2017).

6.2.2. Trocas Gasosas

A taxa fotossintética foi bastante reduzida nos tratamentos salinos e a aplicação de prolina não afetou essa variável nas plantas de sorgo crescendo em ausência de salinidade (Figura 4A). A redução média na taxa fotossintética dos tratamentos salinos, aos 7 DAT, foi de 34% em relação aos controles. Da mesma forma, aos 14 DAT, a salinidade reduziu o valor da taxa fotossintética, porém esta redução foi mais pronunciada no tratamento salino/água que no tratamento salino/prolina. De fato, a prolina exógena quase reverteu completamente o efeito do sal na fotossíntese, sendo observada uma redução de apenas 13% contra uma redução de 43% quando as plantas foram submetidas ao estresse salino sem a aspersão foliar com prolina. O tratamento salino/prolina apresentou taxa fotossintética 55% maior em relação àquela do tratamento salino/água.

Na figura 4B observam-se os dados da taxa de condutância estomática. Na coleta aos 7 DAT, houve redução da condutância motivada apenas pela salinidade. Esta redução nos tratamentos salinos foi, em média, de 66%. Entretanto, aos 14 DAT, a prolina exógena foi eficiente em reverter por completo essa redução na taxa de condutância estomática provocada pela salinidade. Corroborando com os dados de condutância estomática, no segundo tempo de

coleta, a taxa de transpiração no tratamento salino/prolina ficou próxima ao valor do controle (Figura 4C). Sob salinidade, a aplicação de prolina nas folhas resultou em redução de apenas 15% na transpiração em relação ao controle, enquanto que no tratamento salino sem prolina a redução foi de 40% em relação ao controle. No primeiro tempo de coleta, a taxa de transpiração decresceu 37% nos tratamentos salinos não havendo diferença significativa entre o tratamento salino/água e o salino/prolina. Com relação à concentração interna de CO₂, a única diferença significativa foi aquela causada pela salinidade aos 7 DAT, quando o tratamento salino/água foi 27% menor que o controle/água (Figura 4D). Não houve qualquer diferença significativa na concentração interna de CO₂ provocada pela salinidade ou pela prolina aplicada aos 14 DAT.

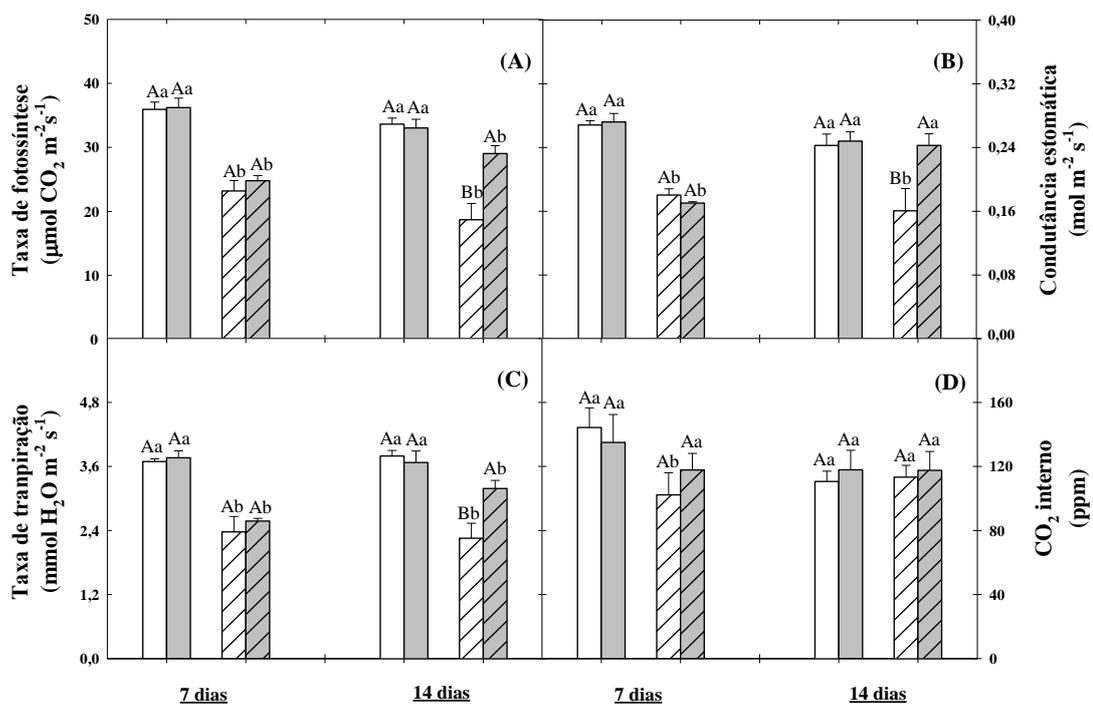


Figura 4. Taxa fotossintética (A), condutância estomática (B), taxa de transpiração (C) e concentração interna de CO₂ (D) de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) ou na presença (▤) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) ou na presença de sal (▨), após 7 e 14 dias do início 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 ($P \leq 0,05$).

Embora o crescimento da planta seja controlado por uma multiplicidade de processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, a fotossíntese é um fenômeno chave, que contribui

substancialmente para o crescimento e desenvolvimento das plantas (ASHRAF; HARRIS, 2013). Os efeitos na fotossíntese podem ser diretos, como a diminuição da disponibilidade de CO₂ causada pelas limitações de sua difusão através dos estômatos e mesófilo ou às alterações no metabolismo fotossintético, como mudanças na atividade da Rubisco, ou mesmo podem surgir como efeitos secundários, causados pelo estresse oxidativo (KALAJI *et al.*, 2011). Estes últimos estão principalmente presentes em várias condições de estresse e podem afetar seriamente o aparato fotossintético, principalmente o fotossistema II (PSII), resultando em fotoinibição devido a um desequilíbrio nas vias de sinalização fotossintética redox e à inibição do sistema de reparo do PSII (CHAVES *et al.*, 2009).

Apesar de a salinidade reduzir a taxa fotossintética, tanto aos 7 DAT quanto aos 14 DAT após a imposição dos tratamentos, observa-se que, aos 14 DAT, a aplicação de prolina foi eficiente em reverter quase que por completo essa redução na taxa fotossintética, o que foi relacionado com o aumento na condutância estomática e na taxa de transpiração. Entretanto, não foi observado aumento na concentração interna de CO₂. Isso pode ser indicativo de que o efeito positivo da prolina exógena possa estar relacionado com uma captação mais eficiente do CO₂ nesta cultivar de sorgo.

6.2.3. Pigmentos fotossintéticos

Em nenhum dos tempos de coleta analisados, os teores de clorofila *a* foram alterados pela salinidade e nem tampouco pelo tratamento com prolina (Figura 5A). Os teores de clorofila *b*, aos 7 DAT, também não foram alterados pelos tratamentos impostos, porém, aos 14 DAT, eles foram afetados pela salinidade (Figura 5B). A redução no teor da clorofila *b* no tratamento salino/água foi de 59% em relação à média dos controles, enquanto no tratamento salino em que a prolina foi aspergida (salino/prolina) essa redução foi de apenas 41%. Em função dessa menor redução no teor de clorofila *b*, o teor desse pigmento no tratamento salino/prolina foi 30% maior do que aquele do tratamento salino/água. Aos 7 DAT, não foi observada qualquer alteração nos teores de clorofilas *totais* (Figura 5C). No entanto, aos 14

dias, o teor de clorofila *total* foi reduzido pela presença de NaCl no meio de crescimento (tratamento salino/água), sendo notado um decréscimo de 31% em relação ao tratamento controle/água. Por outro lado, no tratamento salino/prolina essa redução foi de apenas 20%, relativamente ao tratamento controle/prolina. Os teores de carotenoides não foram afetados pela prolina exógena, apenas pela salinidade (Figura 5D). As reduções médias produzidas pelo NaCl foram de 23%, aos 7 DAT e 26%, aos 14 DAT após o início dos tratamentos.

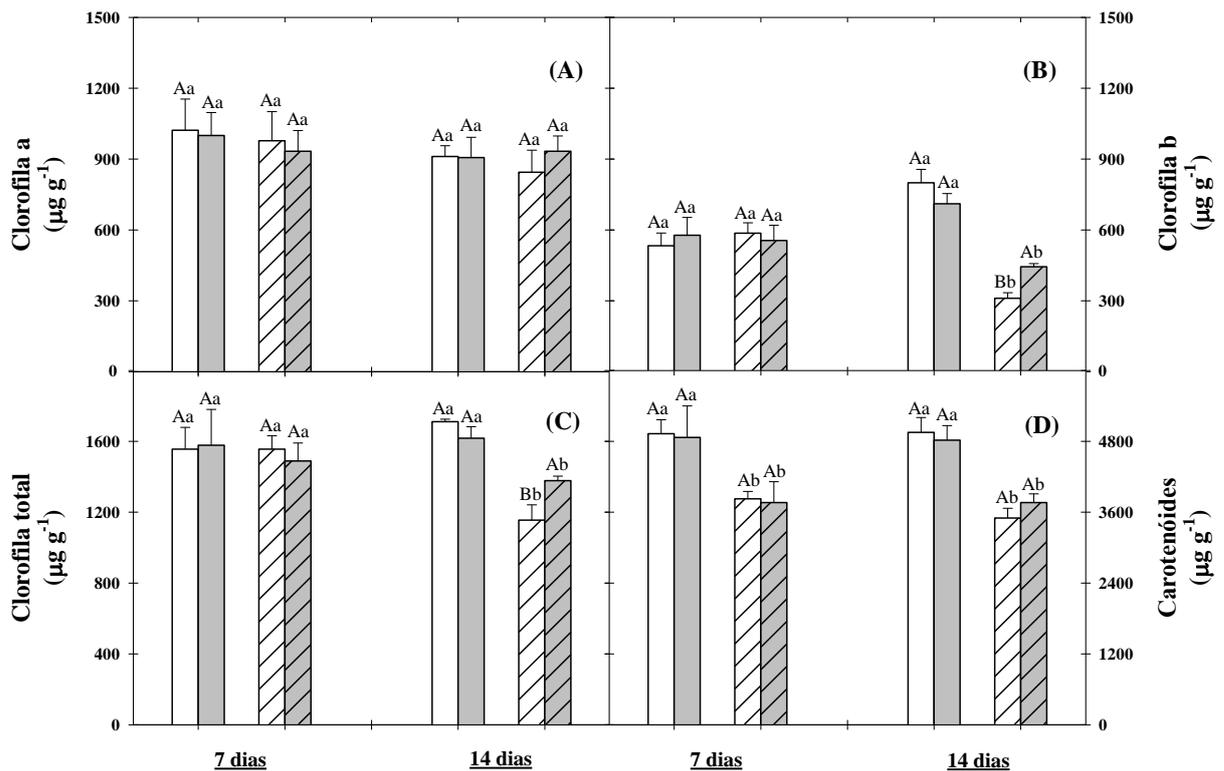


Figura 5. Teores de clorofila *a* (A), *b* (B), *total* (C) e carotenóides (D) em plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) ou na presença (▣) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) ou na presença de sal (▣), após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. 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 ($P \leq 0,05$).

Sob condições de estresse salino, a concentração elevada de íons tóxicos nos tecidos pode resultar num aumento no estresse oxidativo o qual causa deterioração na estrutura dos cloroplastos e uma perda da clorofila associada (ASHRAF; HARIS, 2013). Como observado, aos 14 DAT, o tratamento de aspersão foliar das plantas de sorgo com prolina elevou os teores de clorofila *b* e da clorofila *total* quando sob condições de salinidade (Figuras 5B e C). A prolina pode agir tanto pelo estímulo da biossíntese de clorofila quanto por inibir sua

degradação (RADY *et al.*, 2016). Este aumento poderia ser atribuído à eliminação mais eficiente de ROS que pode degradar a clorofila (DAWOOD *et al.*, 2014). Segundo Abdelhamid *et al.* (2016), o efeito da prolina exógena sobre os teores de clorofila também podem ser devido à estabilização das reações fotosintéticas. Além disso, Rasheed *et al.* (2014) argumentam que a prolina é capaz de aumentar a produção de ácido aminolevulinico, molécula precursora da síntese das clorofilas. Assim sendo, a aspersão de prolina auxiliaria na recuperação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos e na melhora da capacidade fotossintética, através do alívio dos efeitos deletérios induzidos pela salinidade de modo a permitir uma retomada do crescimento. A aplicação foliar de prolina a 15 mM em plântulas de oliveira foi eficiente em minorar os efeitos deletérios da salinidade (NaCl a 100 mM) retomando o crescimento e apresentando aumentos na taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração além do aumento no conteúdo total de clorofila (ALINIAEIFARD *et al.* 2016).

6.2.4. Solutos inorgânicos

Sob condições controle (ausência de NaCl), tanto aos 7 DAT quanto aos 14 DAT, os teores de K^+ não foram alterados pelo tratamento com prolina, em ambos os tecidos analisados (Figura 6A e B). Contudo, a salinidade reduziu fortemente os teores de K^+ nas duas coletas, principalmente nas raízes. No tratamento salino/água, a redução nos teores de K^+ nas folhas foram, em média, de 48% e 61% aos 7 e 14 DAT, respectivamente. No entanto, as plantas sob condições de salinidade quando aspergidas com prolina tiveram reduções menores nos teores de K^+ , as quais foram, em média, 35%, aos 7 DAT e 47%, aos 14 DAT (Figura 6A). Assim como nas folhas, os teores de K^+ nas raízes foram reduzidos em razão do excesso de sais (Figura 6B). Nesses órgãos, as plantas do tratamento salino/água tiveram os teores de K^+ reduzidos, em média, em 71% e 87% aos 7 e 14 DAT, respectivamente (Figura 6B). Também, de forma semelhante ao que aconteceu nas folhas, o tratamento salino/prolina

causou uma menor redução no teor radicular de K^+ , sendo observados decréscimos, em média, de 34% e 64% em relação aos controles, respectivamente, aos 7 e 14 DAT.

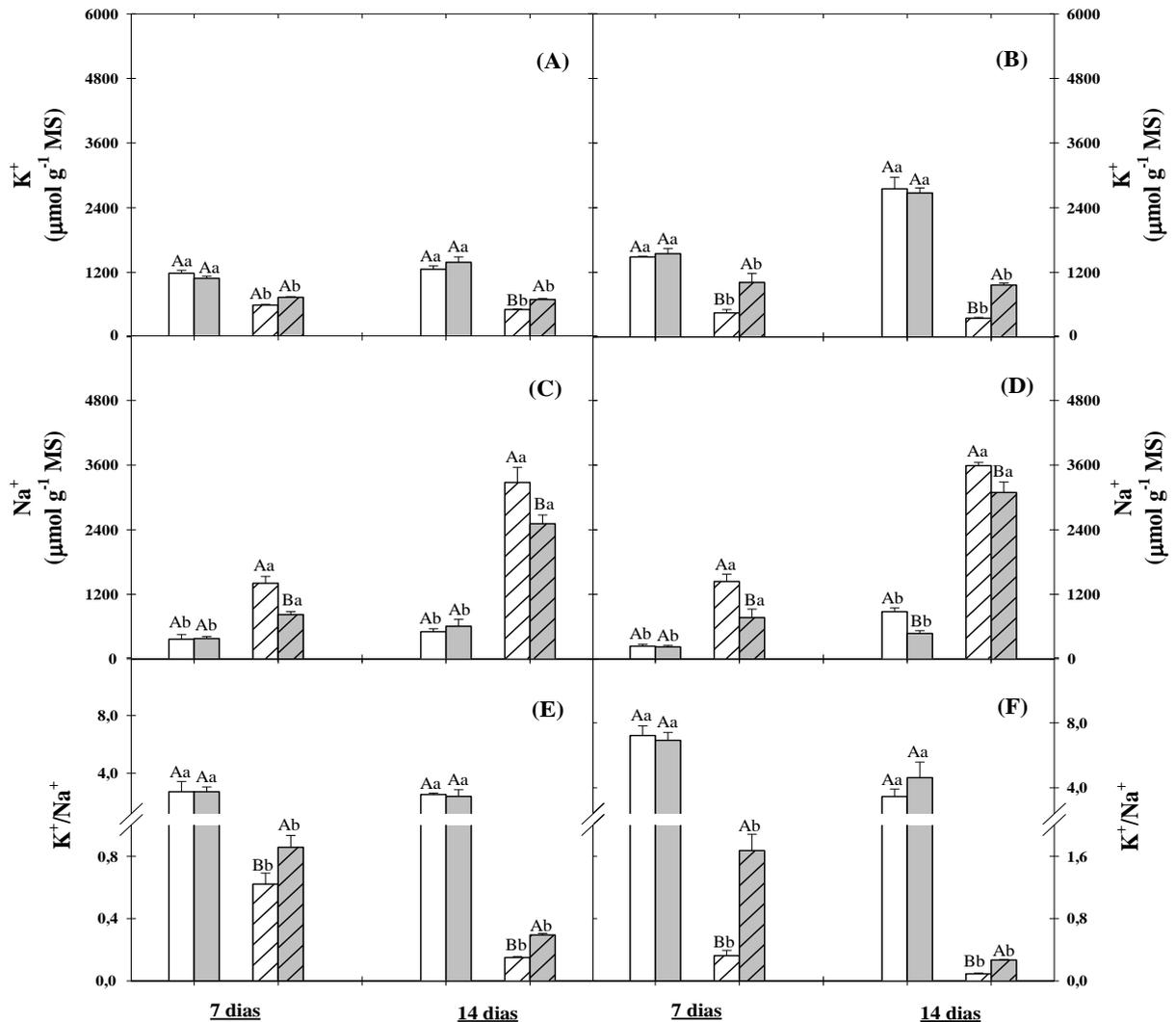


Figura 6. Teores de potássio (A e B), sódio (C e D) e relação K^+/Na^+ (E e F) em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (\square) ou na presença (\blacksquare) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (\square) ou na presença de sal (\blacksquare), após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média \pm 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 ($P \leq 0,05$).

Quanto aos teores de Na^+ , nas folhas, estes foram alterados apenas nos tratamentos salinos (Figura 6C). Em relação aos correspondentes controle/água, os teores de Na^+ foliar no tratamento salino/água foram 1,8 e 4,9 vezes maiores, respectivamente, aos 7 e 14 DAT. Todavia, a prolina exógena atenuou esse aumento nos teores de Na^+ nas folhas, os quais foram maiores em apenas 1,2 vezes, aos 7 DAT e em 3,2 vezes, aos 14 DAT. Nas raízes, aos

7 DAT em ausência de salinidade não houve modificação nos teores de Na^+ ocasionados pela aspersão de prolina (Figura 7D); porém sob condições salinas as plantas tratadas com prolina apresentaram teores radiculares desse íon 47% menores que aquelas do tratamento salino/água. Por outro lado, aos 14 DAT em ausência de salinidade a prolina (tratamento controle/prolina) promoveu um expressivo decréscimo de 46% no teor de Na^+ radicular, em relação ao controle/água (Figura 6D). Além disso, embora a salinidade tenha aumentado os teores de Na^+ radiculares, esse aumento foi menor nas plantas aspergidas com prolina exógena. Sob condições salinas, a prolina exógena também promoveu uma redução nos teores de sódio, sendo observado no tratamento salino/prolina um teor desse íon 22% menor que aquele do tratamento salino/água (Figura 6D).

Como consequência dos resultados mostrados na figura 6A-D, a relação entre os íons K^+ e Na^+ , sob condições controle e em ambos os tempos de coleta ou órgãos estudados, não foi alterada pela aplicação de prolina (Figura 6E, F). Contudo, sob condições salinas e independentemente do órgão ou tempo de coleta essa relação foi reduzida. Porém, a redução na relação K^+/Na^+ foi significativamente menor nas plantas aspergidas com prolina. Nas folhas do tratamento salino/prolina, aos 7 DAT, a relação K^+/Na^+ foi 38% maior que aquela do tratamento salino/água (Figura 6E), enquanto que, aos 14 DAT, apesar dela ter sido menor que aos 7 DAT, seu valor foi quase o dobro (97%) daquela do tratamento salino/água (Figura 6E). Nas raízes, aos 7 DAT, a relação K^+/Na^+ no tratamento salino/prolina foi igual a 5,2 vezes maior no aquela do tratamento salino/água (Figura 6F), enquanto que aos 14 DAT, assim como nas folhas, houve redução nessa relação nos tratamentos salinos, porém, o tratamento salino/prolina apresentou relação K^+/Na^+ igual a 3,2 vezes aquela do tratamento salino/água.

Sob condições salinas, as plantas de sorgo apresentaram elevados aumentos nos teores de Na^+ , tanto nas folhas quanto nas raízes, enquanto os teores de K^+ em seus tecidos foram diminuídos, fazendo com que a relação K^+/Na^+ fosse fortemente reduzida em ambos os

tecidos estudados. A maioria das espécies submetidas à salinidade frequentemente experimenta redução nos teores de K^+ e isto acontece em virtude das semelhanças nas propriedades físico-químicas entre os íons K^+ e Na^+ , em que este último compete com o K^+ nos vários sítios de ligação do transportador (WANG *et al.*, 2013; MIRANDA *et al.*, 2016). Os resultados mostram que a aspersão de prolina foi efetiva em elevar os teores de K^+ e, ao mesmo tempo, reduzir os teores de Na^+ nos dois órgãos analisados e principalmente aos 14 DAT. A capacidade de uma planta para limitar o transporte de Na^+ para a parte aérea é importante para manter uma alta taxa de crescimento e para proteger os processos metabólicos dos efeitos tóxicos dos íons Na^+ (MIRANDA *et al.*, 2017). Além disso, o tratamento com prolina indica que este iminoácido poderia desempenhar um papel na modificação das proporções de K^+/Na^+ sob o estresse salino, o que se reflete em danos reduzidos na membrana e maior teor relativo de água (Figura 3). O menor acúmulo de Na^+ promovido pela aplicação de prolina pode estar associada a exclusão desse íon nas raízes e, conseqüentemente, ter reduzido a concentração nas folhas (Figura 6C e D). O aumento da relação K^+/Na^+ pode ter sido um dos componentes envolvidos também na recuperação das variáveis de trocas gasosas, pois o K^+ está envolvido na regulação estomática (SHABALA; POTTOSIN, 2014). Resultados semelhantes aos aqui encontrados, relacionados à influência da prolina exógena sob estresse salino nos teores de K^+ e Na^+ também foram encontrados em espécies, como arroz (NOUNJAN; THEERAKULPISUT, 2012), berinjela (SHAHBAZ *et al.*, 2013) e feijão (DAWOOD *et al.*, 2014).

Nos dois tempos de coleta, sob condições controle, a prolina exógena não alterou os teores de Ca^{2+} , tanto nas folhas quanto nas raízes (Figura 7A, B). Por outro lado, independentemente do tratamento com prolina, a salinidade diminuiu os teores de Ca^{2+} nos dois tempos de coleta analisados e em ambos os tecidos analisados. Nas folhas, aos 14 DAT, o tratamento salino/prolina teve uma menor redução no teor de Ca^{2+} que o tratamento salino/água (Figura 7A). Em relação aos respectivos controles, enquanto no tratamento

salino/água o teor de Ca^{2+} foi reduzido em 64%, no tratamento salino/prolina esse decréscimo foi de apenas 43%. Nas raízes, de forma similar ao que ocorreu nas folhas, somente aos 14 DAT houve diferença significativa entre os tratamentos salino/água e salino/prolina (Figura 7B). Em relação aos respectivos controles, a redução no teor de Ca^{2+} no tratamento salino/água foi de 77%, enquanto no tratamento salino/prolina essa redução foi de apenas 64%.

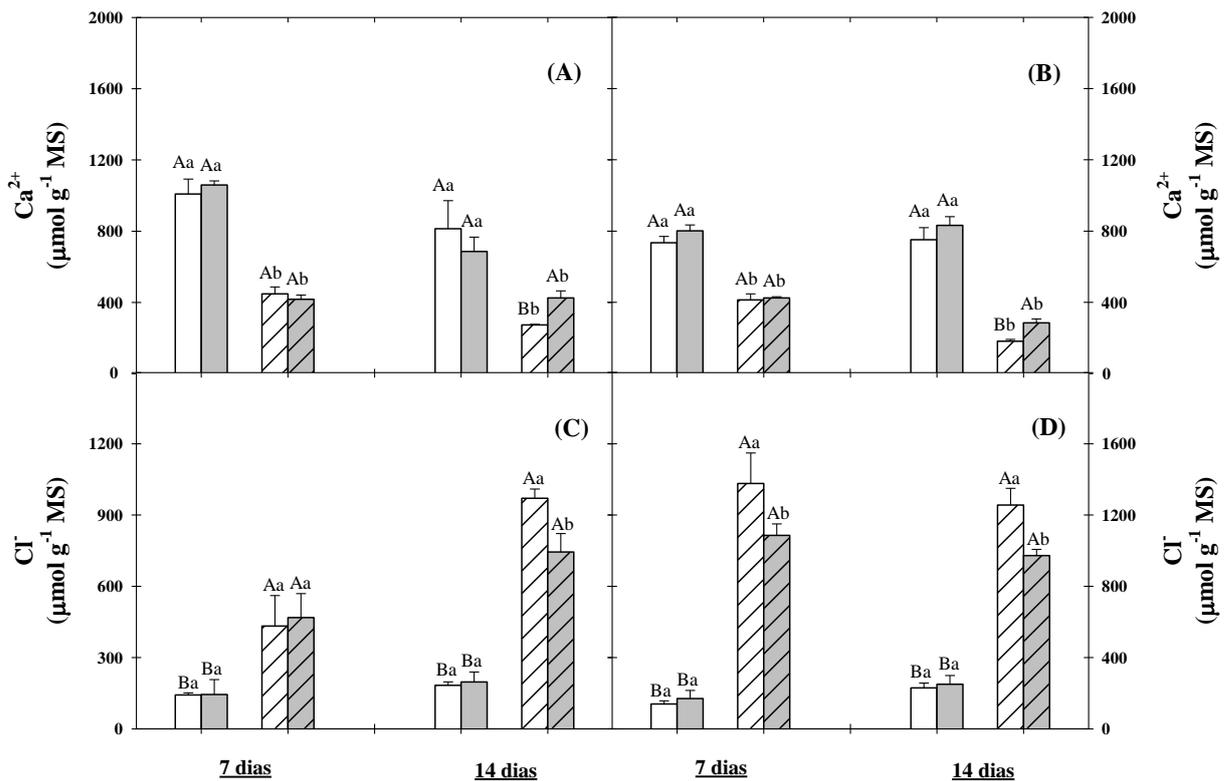


Figura 7. Teores de cálcio (A e B) e cloreto (C e D) em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (\square) ou na presença (\blacksquare) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (\square) ou na presença de sal (\blacksquare), após 7 e 14 dias da 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 ($P \leq 0,05$).

Quanto aos teores de Cl^- , tanto nas folhas quanto nas raízes, houve acúmulo desse íon nos tratamentos salinos nos dois tempos de coleta analisados (Figura 7C e D). Nas folhas, aos 7 DAT, os teores de Cl^- foram influenciados apenas pela salinidade, com um aumento médio em relação ao controle de 70% (Figura 7C). No entanto, aos 14 DAT, as plantas do tratamento salino/prolina apresentaram teores de Cl^- 2,9 vezes maiores que o controle, enquanto no tratamento salino/água, esse aumento foi maior, de 4,1 vezes. Nas raízes, os teores de Cl^- nos

tratamentos salinos foram afetados pelo tratamento com prolina nos dois tempos de coleta analisados (Figura 7D). Aos 7 DAT, comparado à média dos controles, o tratamento salino/água apresentou teor de Cl^- 6,9 vezes maior, ao passo que no tratamento salino/prolina esse aumento foi de apenas 5,0 vezes. Já aos 14 DAT, o acúmulo de Cl^- radicular no tratamento salino/água foi 6,2 vezes maior que o controle, enquanto no tratamento salino/prolina o acúmulo foi de apenas 5,0 vezes em relação à média dos controles.

O Ca^{2+} é conhecido como um mensageiro secundário em inúmeras vias de sinalização de plantas, transmitindo uma vasta gama de estímulos ambientais e de desenvolvimento para respostas fisiológicas adequadas (STEPHAN; SCHROEDER, 2014). O efluxo de K^+ induzido pelo Na^+ , através da despolarização da membrana, provoca uma diminuição maciça na concentração de K^+ citosólica e um aumento na concentração de Ca^{2+} citosólica, o que, por sua vez, leva à expressão de diversos genes, incluindo os envolvidos com canais iônicos, receptores, sinalizadores ou genes implicados na produção de solutos compatíveis (como glicina-betaína e prolina) (KUDLA *et al.*, 2010). De acordo com Kader e Lindberg (2017), sob estresse salino, a pressão osmótica da solução do solo reduz a capacidade das plantas para absorver água e sais minerais de Ca^{2+} .

A redução tecidual de Ca^{2+} aqui observada (Figura 7A) pode ter prejudicado a rigidez estrutural da parede celular, reduzindo o crescimento (Figuras 1; 2); afetado a estabilidade das membranas e aumentando o vazamento de eletrólitos (danos de membrana) (Figura 3A e B) e alterado a condutância estomática, e daí influenciando negativamente as variáveis fotossintéticas, que são efeitos característicos das plantas sob salinidade (Figura 4). Essa diminuição nos teores de Ca^{2+} foi parcialmente revertida pela aspersão foliar de prolina, o que pode ter contribuído para a minimização dos efeitos da salinidade nas plantas de sorgo, como destacado por Flowers *et al.* 2014 em plantas halófitas. Slama *et al.* (2014) observaram que plantas de *A. thaliana*, quando expostas a 50 mM de NaCl reduziram os teores de Ca^{2+} , e que a suplementação com 10 mM de prolina aumentou o teor desse cátion, sendo isto considerado

como um dos componentes do aumento da tolerância ao estresse salino. Entretanto, em melão (*Cucumis melo* L.), apesar do tratamento com prolina ter aumentado os teores de Ca^{2+} nas folhas, Kaya *et al.* (2006) perceberam que houve redução nas raízes.

Embora o cloreto seja o ânion predominante nos solos salinos, sua importância nos mecanismos de tolerância é menos entendida que as relacionadas com o íon sódio (TEAKLE E TYERMAN, 2010). O cloreto é um micronutriente essencial, que regula as atividades de algumas enzimas citosólica, é um cofator na fotossíntese, na estabilização do potencial de membrana e está envolvido na regulação do turgor e do pH (TAVAKKOLI *et al.*, 2017). Entretanto, altos teores de Cl^- estão relacionados à sintomas de clorose foliar, degradação de clorofila e diminuição nas taxas de fotossíntese e de crescimento (SLABU *et al.*, 2009).

Tendo em vista que, sob salinidade, o tratamento com prolina proporcionou menores aumentos nos teores desse íon tanto nas folhas como nas raízes (Figura 7C), é possível supor que a prolina exógena possa estar influenciando no transporte de Cl^- para a parte aérea e/ou na exclusão desse ânion pelas raízes, daí minorando os efeitos da salinidade no crescimento das plantas (Figuras 1; 2). Em azeitona (AHMED *et al.*, 2011) e milho (HASAN *et al.*, 2015) houve reduções nos teores de Cl^- mediadas pela aspersão de prolina, dando apoio aos resultados aqui encontrados. Todavia, Huang *et al.* (2009), estudando plantas de pepino sob condições de salinidade, verificaram que a adição de prolina a 10 mM na solução nutritiva causou mais acúmulo de Cl^- do que na ausência desse aminoácido. No caso da planta acumuladora de sais *Cakile marítima*, esta teve seus teores de Cl^- aumentados pela aspersão com prolina a 25 mM, sob salinidade com NaCl a 400 mM (MESSEDI *et al.*, 2016). Mesmo assim, os autores concluíram que *C. marítima* teve os efeitos da salinidade mitigados pela prolina exógena pela ação de outros mecanismos independentes da concentração de Cl^- .

6.2.5. Solutos orgânicos

Os teores de N-aminossolúveis e carboidratos solúveis não foram alterados pela prolina exógena nos controles em qualquer tempo de coleta ou órgão analisado (Figura 8A, B). A salinidade promoveu um aumento nos teores de N-aminossolúveis em folhas e raízes, porém isso só ocorreu aos 14 DAT. Nas folhas, o acréscimo nos teores de N-aminossolúveis no tratamento salino/água foi de 26%, em relação à média dos controles, enquanto no tratamento salino/prolina observou-se um acúmulo de 59% (Figura 8A). Da mesma forma que nas folhas, nas raízes, os teores de N-aminossolúveis foram aumentados pela salinidade, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos salino/água e salino/prolina (Figura 8B).

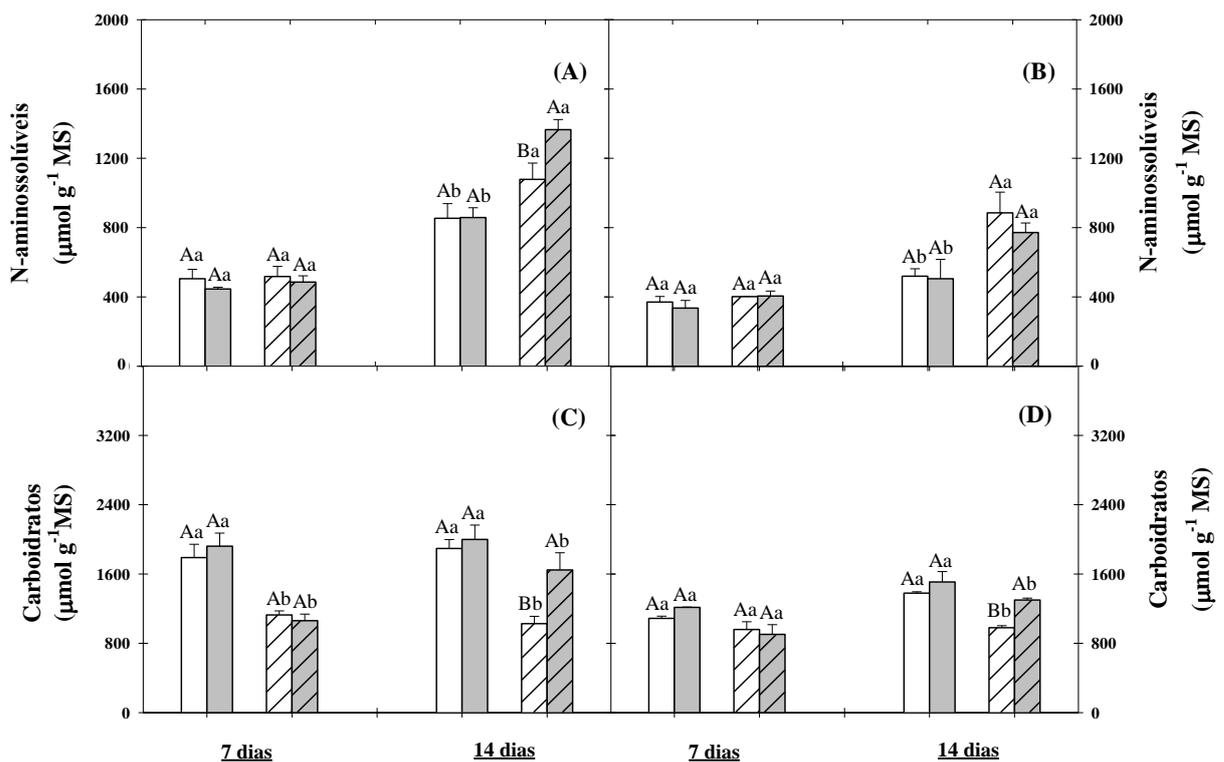


Figura 8. Teores de N-aminossolúveis (A e B) e carboidratos solúveis (C e D) em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) ou na presença (▨) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) ou na presença de sal (▩), após 7 e 14 dias da aplicação 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 ($P \leq 0,05$).

Sob condições controle, os teores de carboidratos solúveis não foram afetados pelo tratamento com prolina em nenhum dos tempos ou órgãos estudados (Figura 8C, D). Nas folhas, os teores de carboidratos solúveis foram fortemente reduzidos pela salinidade, tanto aos 7 quanto aos 14 DAT (Figura 8C). No 7º dia, a redução foi da ordem de 41%, em relação à média dos controles, e independeu do tratamento com prolina. No entanto, aos 14 DAT, enquanto no tratamento salino/água a redução foi de 47%, no tratamento salino/prolina ela foi menor, apenas 15%. Nas raízes, aos 7 DAT, não houve alteração nos teores de carboidratos solúveis pelos tratamentos, porém aos 14 DAT, de maneira semelhante ao que ocorreu nas folhas, os mesmos também foram parcialmente recuperados no tratamento salino/prolina (Figura 8D). Neste caso, a redução nos teores de carboidratos solúveis foi de 32% no tratamento salino/água e de apenas 9% no tratamento salino/prolina.

Uma gama de compostos nitrogenados e vários açúcares solúveis chamados solutos compatíveis são sintetizados em resposta ao estresse salino e ajudam a estabilizar as membranas celulares e a manter o turgor celular (CABELLO *et al.*, 2014). A resposta das plantas à salinidade com relação aos teores de açúcares solúveis é variável, podendo ocorrer acúmulo ou redução de seus níveis dependendo da espécie, cultivar ou genótipo (AHMED *et al.*, 2013). Neste trabalho, a redução nos teores de carboidratos solúveis pela salinidade, especialmente nas folhas, relacionou-se com a redução nos parâmetros fotossintéticos (Figura 4), ao passo que a melhora nestes parâmetros causada pela prolina exógena provavelmente motivou a elevação nos níveis de carboidratos (Figura 8C). Os açúcares solúveis podem, em altas concentrações, desintoxicar diretamente as EROs nos cloroplastos e vacúolos ou indiretamente estimular os sistemas de defesa antioxidativos (BOLOURI-MOGHADDAM *et al.*, 2010), o que pode ter contribuído para mitigar os efeitos da salinidade no crescimento das plantas aqui estudadas. Os teores de carboidratos solúveis foram aumentados em plantas de feijão sob salinidade a $6,25 \text{ dS.m}^{-1}$ quando suplantadas com 25 mM de prolina em relação as plantas submetidas somente ao NaCl (DAWOOD *et al.*, 2014). Os efeitos da prolina exógena

aqui observados, com relação aos teores de carboidratos solúveis, foram também encontrados em plantas de *A. thaliana* (MOUSTAKAS *et al.*, 2011), canola (JONYTIENÈ *et al.*, 2012), ervilha (SHAHID *et al.*, 2014) e na palmeira *Phoenix dactylifera* (ZOUARI *et al.*, 2016).

6.2.6. Prolina e atividade de enzimas do seu metabolismo

Nas folhas, nos dois tempos de coleta e em ausência de salinidade, os teores de prolina foram aumentados em função do tratamento com esse iminoácido (Figura 9A). Em relação ao tratamento controle/água, o tratamento controle/prolina causou aumento de 349% nos teores de prolina das folhas, aos 7 DAT e de 104%, aos 14 dias de estresse. Por outro lado, em condições apenas salinas (tratamento salino/água), os teores desse iminoácido foram aumentados em 281%, aos 7 DAT e em 627%, aos 14 DAT, em relação ao controle/água. O tratamento com prolina, nas plantas sob salinidade, somente causou efeito significativo aos 7 dias de estresse (Figura 9A). Nesse caso, os teores de prolina no tratamento salino/prolina foram 138% maiores que aquele do tratamento salino/água. Já nas raízes, independentemente do tempo de coleta, os teores de prolina somente foram alterados pela salinidade, sendo observados aumentos de 96% e de 329%, respectivamente, aos 7 e 14 DAT em relação ao tratamento controle/água (Figura 9B).

A atividade da P5CS nas plantas crescendo em ausência de salinidade não foi afetada pelo tratamento com prolina, independentemente do órgão ou do tempo de coleta estudados (Figura 9C, D). Nas folhas, aos 7 DAT, a atividade da P5CS foi fortemente aumentada no tratamento salino/prolina, sendo observado um aumento de 105% em relação ao controle/água (Figura 9C). No entanto, ainda aos 7 DAT, a atividade da P5CS nas plantas sob salinidade, porém tratadas com prolina diminuiu, ficando no mesmo nível do controle. Aos 14 DAT, a atividade da P5CS foi alterada apenas em função do tratamento salino, o qual foi, em média, 107% maior que os controles (Figura 9C). Nas raízes, nos dois tempos de coleta, a atividade

da P5CS foi afetada igualmente pela salinidade, com um aumento médio de 111% em relação aos controles (Figura 9D), não sendo, todavia, afetada pelo tratamento com prolina.

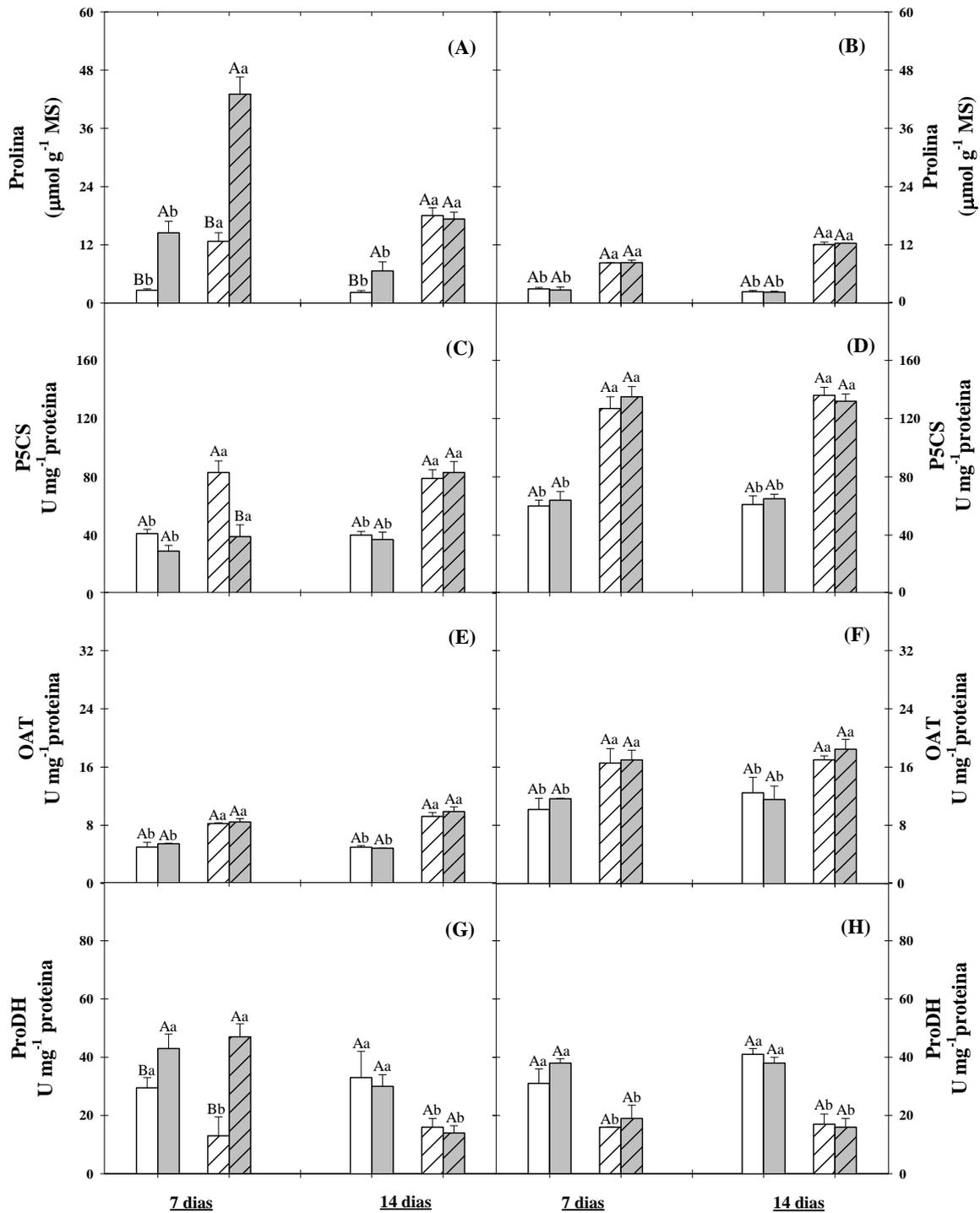


Figura 9. Teores de prolina (A e B) e atividades enzimáticas da Δ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS, C e D), aminotransferase da ornitina (OAT, E e F) e desitrogenase da prolina (ProDH, G e H) em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (\square) ou na presença (▨) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (\square) ou 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 ($P \leq 0,05$).

A atividade da OAT, nas folhas e raízes e nos dois tempos de coleta estudados, foi afetada apenas pela salinidade, a qual, em média, causou um aumento de cerca de 60%, aos 7 DAT, e de 92%, aos 14 DAT, em relação aos controles (Figura 9E e F).

Nas folhas, aos 7 DAT, a aspersão de prolina aumentou a atividade da ProDH tanto na presença como na ausência de salinidade (Figura 9G). Nas plantas tratadas apenas com NaCl (salino/água), ainda aos 7 DAT, a atividade foliar da ProDH foi reduzida em 56% em relação ao controle/água. Todavia, no tratamento salino/prolina a atividade da ProDH foi maior em relação àquela do tratamento salino/água e seu valor não diferiu daquele do tratamento controle/prolina. Aos 14 DAT, ainda nas folhas, a atividade da ProDH não foi influenciada pelo tratamento com prolina, mas foi significativamente reduzida pela salinidade (redução de 52%). Resultados semelhantes a estes últimos foram observados nas raízes, em que a atividade da ProDH foi influenciada apenas pela salinidade, nos dois tempos de coleta, causando uma redução, em média, de 51% em relação aos controles (Figura 9H).

Como observado, aos 7 DAT, as plantas tratadas com prolina mostraram um aumento notável no teor de prolina foliar, especialmente aquelas do tratamento salino/prolina; porém, aos 14 DAT esses teores nesse mesmo tratamento foram drasticamente reduzidos (Figura 9A, B). Levando-se em conta que a prolina foi empregada numa concentração muito elevada (30 mM), os resultados sugerem que a prolina estava em excesso e precisava ser eliminada, uma vez que altos teores desse iminoácido são tóxicos para a planta (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010), independentemente da salinidade. É possível, portanto, que essa forte redução nos teores de prolina no tratamento salino/prolina aos 14 DAT tenha ocorrido porque esse iminoácido tenha sido utilizado para minorar os efeitos causados pela salinidade. Nesse sentido, sabe-se que a prolina pode funcionar como esqueleto de carbono para a síntese de outras moléculas osmoticamente ativas ou outros compostos nitrogenados. Essa ideia é corroborada pelo aumento nos teores de N-aminossolúveis encontrados nas folhas aos 14 dias de estresse salino (Figura 8A).

A dinâmica dos teores de prolina nos tecidos foliares foi regulada pelas enzimas de síntese e degradação. Nas folhas das plantas do tratamento salino/água, aos 7 DAT, houve um aumento nos teores de prolina (Figura 9A), e a resposta adaptativa da elevação dos teores desse iminoácido foi um incremento na atividade da enzima de síntese, a P5CS (Figura 9C) e uma redução na atividade da enzima de degradação, a ProDH (Figura 9G). Por outro lado, o grande aumento nos teores de prolina, aos 7 DAT, no tratamento salino/prolina (Figura 9A) foi acompanhado de uma grande redução na atividade da P5CS e forte aumento na atividade da ProDH, em relação ao tratamento salino/água (Figura 9C, G). Dessa forma, o balanço das atividades das enzimas P5CS e ProDH, nas folhas das plantas suplementadas, com prolina, possivelmente, contribuiu para que não houvesse um conteúdo excessivo desse iminoácido no 14º dia de estresse.

A prolina exógena teve efeitos similares na atividade da P5CS de *Saussurea amara* (WANG *et al.* 2011), *Eurya emarginata* (ZHENG *et al.*, 2015) e *Solanum melogena* (SINGH *et al.*, 2015), sendo uma situação bem documentada em diversas espécies economicamente importantes. De acordo com Miller *et al.* (2009), em condições de salinidade, a atividade aumentada da ProDH pode estar relacionada com o conhecido ciclo prolina/P5C, sendo isso um mecanismo para transferir poder redutor do NAD(P)H para as mitocôndrias, de modo a manter o *pool* de NAD(P)⁺ nessas organelas. Ademais, a P5C formada nesse ciclo pode ser utilizada para formação de aminoácidos, tais como o glutamato e a arginina, cujo catabolismo tem a P5C como intermediário (LIANG *et al.*, 2013).

No presente estudo, a OAT não teve sua atividade alterada em função da aplicação de prolina, sinalizando que nesse período do desenvolvimento da planta de sorgo sua atividade não é decisiva para o conteúdo de prolina. Todavia, estudos sobre a OAT têm mostrado que a salinidade tem o poder de ativar seu metabolismo a nível enzimático e molecular (BAGDI *et al.*, 2015).

6.2.7. *Aminoácidos livres*

Nas folhas, sob condições controle (ausência de NaCl), tanto aos 7 como aos 14 DAT, os teores de glutamato não foram alterados pelo tratamento de aspersão foliar com prolina (Figura 10A). No entanto, aos 7 DAT sob condições de estresse salino, esses teores de glutamato foram reduzidos, sendo tais reduções de 27% e de 55%, respectivamente, nos tratamentos salino/prolina e salino/água, em relação aos respectivos controles. Por outro lado, aos 14 dias sob condições de estresse, os teores desse aminoácido nas folhas foram reduzidos em 38% no tratamento salino/água, e aumentados em 37% no tratamento salino/prolina (Figura 10A). Nas raízes, aos 7 dias sob condições controle, os teores de glutamato não foram influenciados pelo tratamento com prolina, mas aumentaram em função da salinidade, em média, 84% em relação à média dos controles (Figura 10B). Aos 14 DAT, ainda nas raízes, o tratamento com prolina foi efetivo em aumentar os teores de glutamato, tanto em condições controle como de estresse salino. Neste caso, como resultado foi observado um aumento de 36% no tratamento controle/prolina e de 21% no tratamento salino/prolina, em relação aos respectivos controles (Figura 10B). Ressalte-se, no entanto, que o tratamento apenas de estresse (salino/água) não causou qualquer alteração nos teores de glutamato nas raízes.

Nas folhas, os teores de glutamina não foram influenciados pelo tratamento com prolina nas condições controle (ausência de NaCl) (Figura 10C). No entanto, em condições de estresse, o tratamento com prolina aumentou os teores de glutamina em 40%, aos 7 DAT e em 52% aos 14 DAT, em relação aos respectivos controles. Em condições controle, o tratamento apenas com prolina (controle/prolina) aumentou os teores radiculares de glutamina, sendo tais aumentos de 58%, aos 7 DAT e 24%, aos 14 DAT em relação aos respectivos tratamentos controle/água (Figura 10D). Por outro lado, nos dois tempos de coleta, os teores de glutamina nas raízes foram reduzidos drasticamente pela salinidade (Figura 10D). Embora aos 7 dias sob condições salinas, os teores de glutamina não tenham sido alterados pelo tratamento com prolina, aos 14 DAT esses teores foram aumentados em 49%.

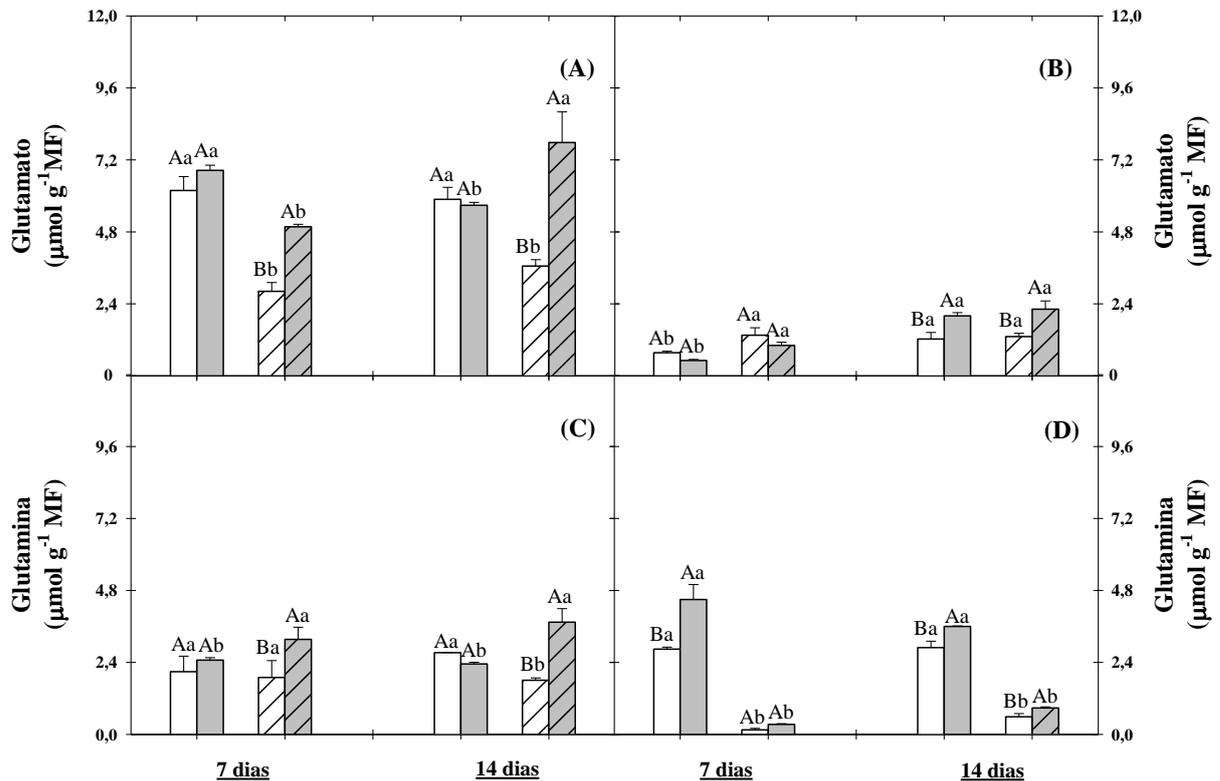


Figura 10. Teores de glutamato (A e B) e glutamina (C e D) em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (\square) ou na presença (\blacksquare) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (\square) ou na presença de sal (\boxtimes), após 7 e 14 dias 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 ($P \leq 0,05$).

O amônio derivado da redução do nitrato, bem como o proveniente de outras vias metabólicas, incluindo aquele absorvido pelas raízes ou produzido pela fotorrespiração e catabolismo dos aminoácidos, é convertido primeiramente em glutamina pela ação da glutamina sintetase e, em seguida, em glutamato pela glutamato sintase (TEIXEIRA; FIDALGO, 2009). A assimilação da amônia em glutamina e glutamato é vital para o crescimento da planta, pois estes dois aminoácidos servem como precursores para a síntese de outros aminoácidos, bem como para quase todos os compostos nitrogenados da célula (SÉVIN *et al.*, 2016). Nas folhas, aos 7 DAT, os aumentos observados nos teores de glutamato e glutamina no tratamento salino/prolina, em relação ao tratamento salino/água, se relacionaram com o aumento em atividade da ProDH (Figura 9G). Portanto, é possível que esse aumento em atividade dessa enzima de degradação da prolina tenha elevado a concentração de P5C, o qual é precursor de glutamato e glutamina (OKUMOTO *et al.*, 2016).

Dessa maneira, as plantas poderiam aumentar a quantidade de osmólitos não tóxicos como a prolina (QAMAR *et al.*, 2015). Além disso, esses aminoácidos poderiam ser utilizados no balanço de nitrogênio uma vez que a salinidade pode afetar enzimas de assimilação e dissimilação de N (DEINLEIN *et al.*, 2014).

Nas folhas, aos 7 dias sob condições controle, os teores de asparagina não foram alterados pelo tratamento de aspersão com prolina (Figura 11A), porém, sob condições salinas e em ausência da aplicação foliar de prolina, o teor desse aminoácido foi levemente reduzido. No entanto, sob condições de estresse salino em que a prolina foi aspergida nas plantas, houve um grande aumento nos teores desse iminoácido, o qual foi 2,7 vezes maior que o do tratamento salino/água. Nessas mesmas condições, porém aos 14 DAT, o estresse salino também causou um forte aumento no teor de asparagina, que independeu do tratamento com prolina, sendo os valores, em média, 4,5 vezes maiores que os dos respectivos controles (Figura 11A). Nas raízes, aos 7 DAT, os teores de asparagina, sob condições controle, não foram alterados pelo tratamento com prolina (Figura 11B). Todavia, sob condições de salinidade, os teores de asparagina nas raízes foram fortemente reduzidos, principalmente no tratamento salino/prolina (redução de 85%, em relação ao respectivo controle). Nesses mesmos órgãos, porém aos 14 DAT, os teores desse aminoácido não foram afetados pela salinidade ou pelo tratamento com prolina. Embora não tenha havido uma comparação estatística, os teores de asparagina nas raízes aos 14 DAT foram bastante inferiores àqueles no 7º dia (Figura 11B).

Aos 7 DAT, sob condições controle, os teores de aspartato nas folhas não foram influenciados pelo tratamento com prolina; porém, foram fortemente influenciados pela salinidade, sendo observado, em média, um aumento de 7,3 vezes no tratamento salino/água e de 9,0 vezes no tratamento salino/prolina, em relação aos respectivos controles (Figura 11C). Ainda nesses órgãos, aos 14 dias sob condições controle, os teores de aspartato não foram afetados pelo tratamento com prolina, porém sob condições salinas eles foram afetados tanto

pela salinidade como pelo tratamento com prolina; em relação aos respectivos controles, os tratamentos salino/água e salino/prolina aumentaram os teores de aspartato em 4,2 vezes e 5,9 vezes os teores de aspartato (Figura 11C).

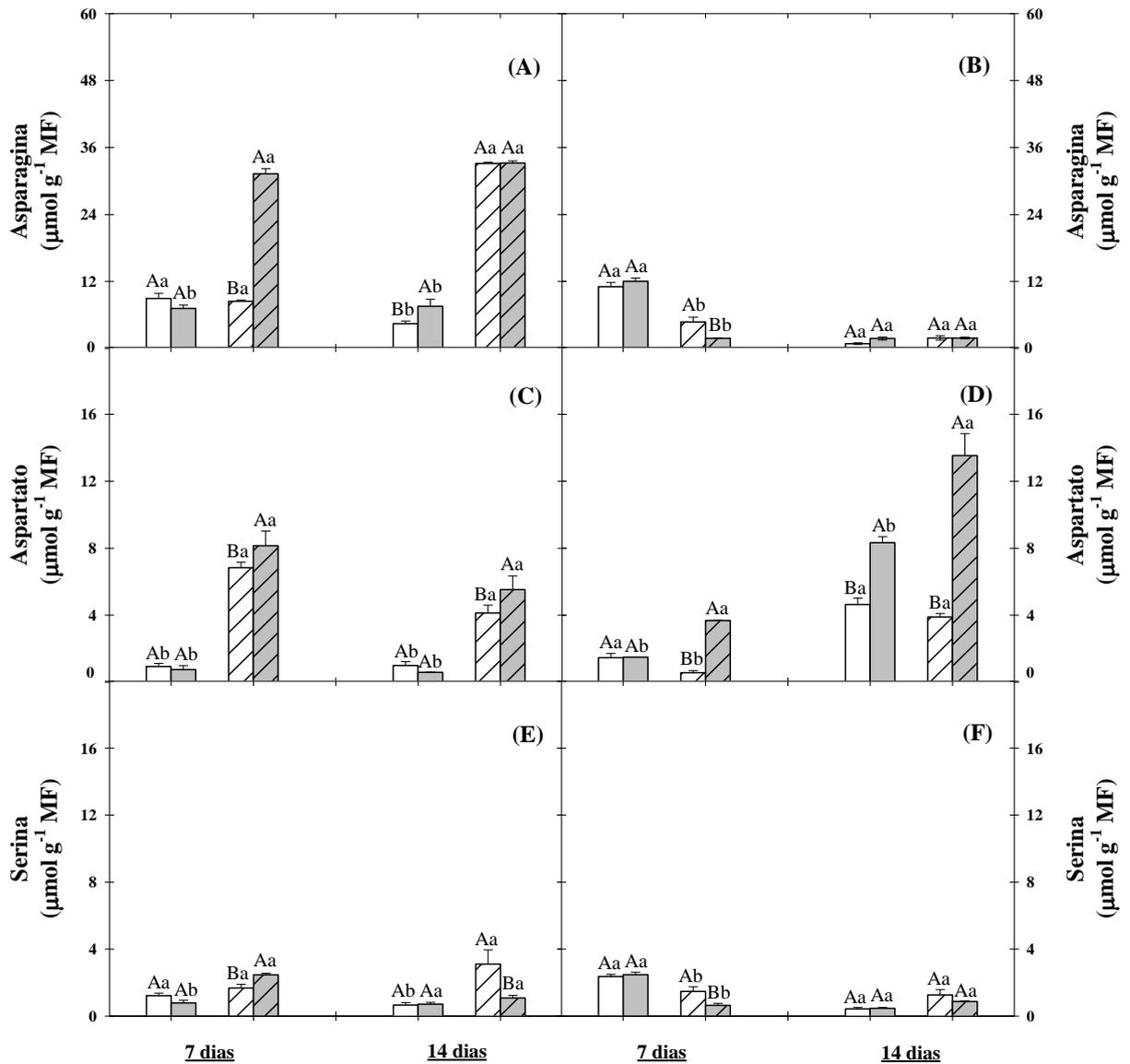


Figura 11. Teores de asparagina (A e B), aspartato (C e D) e serina (E e F) em folhas e raízes de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) ou na presença (▣) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) ou na presença de sal (▣), após 7 e 14 dias da aplicação 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 ($P \leq 0,05$).

Nas raízes, aos 7 dias sob condições controle, o teor de aspartato não foi afetado pelo tratamento com prolina; porém, sob condições salinas, o teor desse aminoácido foi alterado, sendo reduzido em 62% no tratamento salino/água e aumentado em 146% no tratamento

salino/prolina, em relação aos respectivos controles (Figura 11D). Aos 14 DAT, no entanto, os teores de aspartato nas raízes foram fortemente influenciados pela prolina, tanto em condições controle como de estresse salino; em condições controle, o teor de aspartato no tratamento prolina/água foi 80% maior que aquele do tratamento controle/água, enquanto que no tratamento salino/prolina esse teor foi 63% maior que aquele do tratamento prolina/água, embora não tenha havido diferença significativa entre os tratamentos salino/água e controle/água (Figura 11D).

Nas folhas, em ausência de NaCl, os teores de serina não foram influenciados pelo tratamento de aspersão com prolina, tanto aos 7 quanto aos 14 DAT (Figura 11E). No entanto, os teores desse aminoácido nas folhas foram aumentados pela salinidade, porém apenas quando associada com o tratamento com prolina, no 7º dia, ou isoladamente, no 14º dia. Em relação aos respectivos controles, o aumento no teor de serina no tratamento salino/prolina foi 247% e no tratamento salino/água foi de 356%, respectivamente, aos 7 e 14 DAT (Figura 9E). Da mesma forma que nas folhas, nas raízes, os teores de serina, sob condições controle (ausência de NaCl), não foram alterados pelo tratamento com prolina (Figura 11F). Por outro lado, aos 7 dias sob condições de estresse salino (tratamento salino/água), observou-se que o teor de serina foi reduzido em 39%, em relação ao controle, enquanto no tratamento salino/prolina o teor desse aminoácido foi 75% menor. Já, aos 14 DAT, os teores de serina nas raízes, não foram alterados por nenhum dos tratamentos aplicados (Figura 11F).

No xilema, a asparagina é o principal aminoácido transportador de N das raízes para as folhas e das folhas para as sementes e as raízes em desenvolvimento pelo floema, tendo em vista que sua molécula tem uma alta relação nitrogênio/carbono (LEA *et al.*, 2007). Além disso, a asparagina desempenha um papel primordial na reciclagem, armazenamento e transporte de nitrogênio durante o desenvolvimento e germinação das sementes, bem como em órgãos vegetativos e senescentes (GAUFICHON *et al.*, 2010). A asparagina é frequentemente induzida em resposta ao estresse salino (PARVAIZ; SATYAWATI, 2008) e

foi, dentre os aminoácidos livres analisados, o que apresentou, em média, maiores teores nos tecidos de folhas e raízes (Figuras 10; 11), o que está de acordo com o fato de ser o principal transportador de N. No entanto, seu papel sobre condições salinas dependeu do tempo de coleta, pois enquanto no 7º dia, nas folhas, seus teores não foram alterados pela salinidade (tratamento salino/água), no 14º dia esses teores foram fortemente aumentados (Figura 10A). Da mesma forma, a resposta das plantas sob estresse salino ao tratamento de aspersão das folhas com prolina dependeu da época de coleta; no 7º dia, o tratamento salino/prolina provocou forte aumento nos teores de asparagina, enquanto no 14º não houve diferença entre os tratamentos salino/prolina e salino/água. Diferentemente ao encontrado no presente trabalho, plantas de *Arabidopsis* reduziram os teores de asparagina e aspartato mediante a aplicação exógena de 45 mM de prolina (CHEN *et al.*, 2011).

O controle dos níveis de aspartato é particularmente importante para o seu papel tanto na biossíntese de aminoácidos essenciais como a lisina, a treonina, a metionina e a isoleucina quanto na interconversão com outros aminoácidos como o glutamato, a glutamina e a asparagina (JANDER; JOSHI, 2010). A interconversão entre esses aminoácidos, em condições de estresse, funciona na geração de energia fornecendo substratos para o ciclo do ácido cítrico (GALILI, 2011). No presente estudo, os teores de aspartato nas folhas foram acumulados nos tratamentos salinos, principalmente quando aspergidas com prolina. O acúmulo do aspartato nesses tecidos pode ser devido exatamente pela interconversão entre esses aminoácidos garantindo um maior aporte energético. Já nas raízes, houve um grande aumento desse aminoácido no tratamento salino/prolina. Nesse caso, o aspartato nas raízes poderia tanto funcionar na geração de energia quanto estar sendo armazenado funcionando como uma reserva de metabolito nitrogenado nesses órgãos uma vez que, em condições de salinidade, há uma restrição da assimilação de N. Segundo Wu *et al.* (2013), o aumento de açúcares (Figura 8) e de energia são fatores importantes para o crescimento de folhas e raízes durante o estresse salino.

6.3. Experimento III – Modulação da expressão dos genes envolvidos no metabolismo da prolina de folhas e raízes de plantas de sorgo em condições de salinidade e influência da prolina exógena no processo

6.3.1. Qualidade do RNA total

Para acompanhar a dinâmica da expressão dos genes envolvidos no metabolismo da prolina, foi extraído o RNA total dos tecidos de folhas e raízes das plantas de sorgo. Os dados de quantificação e integridade dos RNAs demonstraram que as amostras tinham excelente qualidade, com concentrações variando entre 150,4 e 966,2 ng/ μ L e relações de absorvâncias A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} com valores em torno de 2 e acima de 2, respectivamente. Adicionalmente, os perfis eletroforéticos dos RNAs em géis de agarose a 1,5% demonstraram que os RNAs estavam íntegros, visto que as bandas de RNA ribossomal referentes às subunidades 18S e 28S foram bem visualizadas, sem sinais de degradação de RNA (Figura 12).

6.3.2. Análise de expressão diferencial via RT- qPCR

Os genes *p5cs1*, *p5cs2*, *oat* e *prodh*, envolvidos no metabolismo da prolina, foram investigados com relação aos seus perfis de expressão em folhas e raízes de plantas de sorgo frente aos diversos tratamentos. Para as análises desses genes por RT- qPCR, foram utilizados como controles internos os genes *EF1 β 2*, *Fbox*, *GTPB*, *SAND* e *UK* (Tabela 1). Esses genes mostraram estabilidade de expressão neste estudo e em estudos prévios realizados por Hu *et al.* (2009).

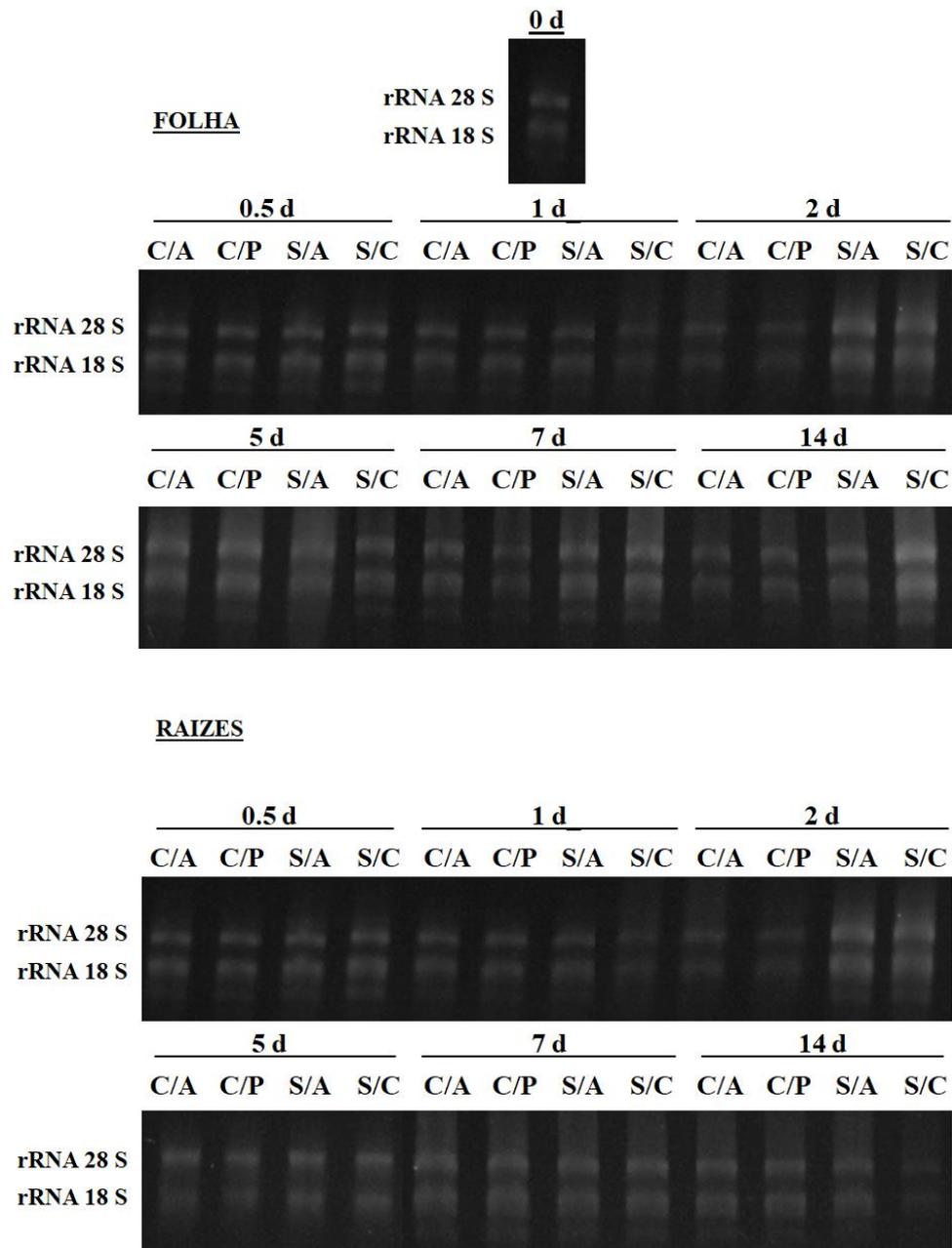


Figura 12. Análise da integridade do RNA total, em gel de agarose (1,5 %), evidenciando as bandas de RNA ribossomal 18S e 28S. As amostras foram extraídas de folhas e raízes de plantas de sorgo com 0, 0,5, 1, 2, 5, 7 e 14 dias do início dos tratamentos, ou seja, plantas cultivadas em solução nutritiva na ausência (controle água, C/A) ou na presença (controle sal, S/A) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (controle prolina, C/P) ou na presença de sal (salino prolina, S/P).

A análise de expressão por RT-qPCR revelou que todos os genes do metabolismo da prolina foram expressos em todos os tratamentos/tecidos, no entanto, esses genes apresentaram diferentes perfis de expressão de acordo com o tecido e/ou tratamentos impostos.

6.3.2.1. Expressão do gene *p5cs1*

O estudo sobre a expressão relativa do gene *p5cs1*, nas folhas das plantas de sorgo do tratamento controle/água, mostrou que ao longo do tempo sua expressão se manteve constante ou sofreu pouca alteração (Figura 13A). Contudo, neste mesmo órgão, a expressão relativa desse gene, no tratamento salino/água, se manteve praticamente constante até o 1º dia, porém, a partir do 2º dia, seu nível aumentou progressivamente, atingindo no 14º dia um alto nível de expressão, que foi 7,7 vezes maior que aquele observado no tratamento controle/água. Já no tratamento salino acrescido com prolina, essa tendência de crescimento não se confirmou, porém, no 14º dia de exposição aos tratamentos, esse gene teve sua expressão relativa fortemente elevada, sendo 45% maior que aquela do tratamento salino/água e cerca de 17 vezes aquele do tratamento prolina/água.

As raízes apresentaram um padrão de expressão relativa do gene *p5cs1* diferente daquele apresentado nas folhas (Figura 13B). Primeiramente, nos dois controles (controle/água e controle/prolina) houve um aumento progressivo na expressão desse gene do 2º até o 7º dia; contudo, no 14º dia, sua expressão foi reduzida mais pronunciadamente no tratamento com prolina (Figura 13B). Além disso, observou-se que no 5º e no 14º dia a expressão do gene *p5cs1* foi menor no controle/prolina que no controle/água. Ainda nas raízes, esse gene nas plantas do tratamento salino/água, apresentou incrementos em sua expressão a partir do 0,5º dia, alcançando seu maior nível de expressão no 7º dia do início dos tratamentos; porém aos 14 DAT esse gene diminuiu sua expressão em cerca de 40%. Em relação aos respectivos controle/água, nos dias 7 e 14 do início dos tratamentos, a expressão relativa do gene *p5cs1* no tratamento salino/água foi, em média, cerca de 60% maior (Figura 13B). Ainda nas raízes, as plantas sob salinidade e tratadas com prolina (salino/prolina), apresentaram expressão desse gene com pequenas variações ao longo do tempo de estresse, porém, a partir do 2º dia, sua expressão foi sempre inferior àquela do tratamento salino/água;

no 7º dia, a expressão relativa desse gene no tratamento salino/prolina foi apenas 12% daquela do tratamento salino/água.

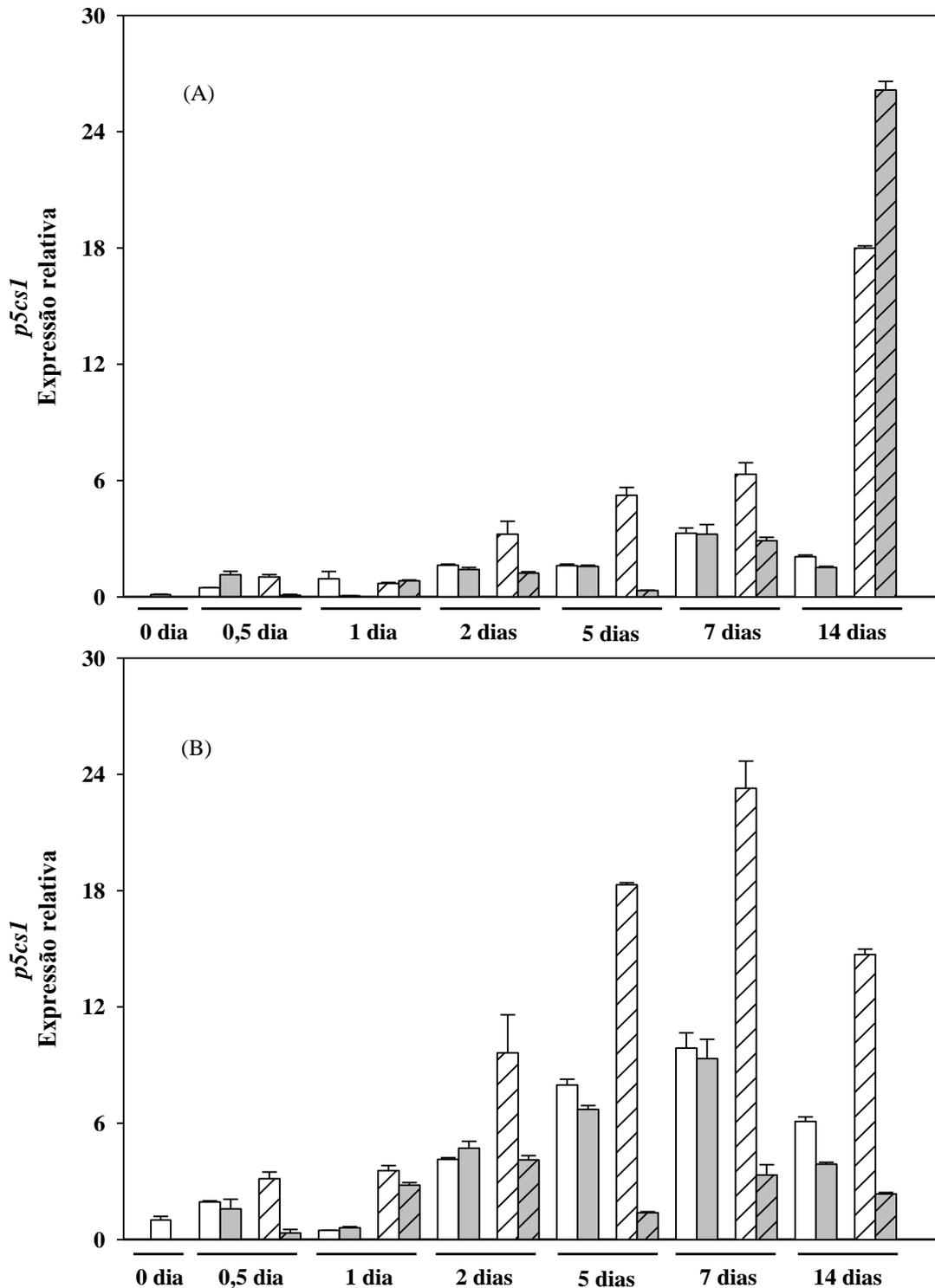


Figura 13. Expressão relativa do gene *p5cs1* em folhas (A) e raízes (B) de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) ou na presença (▨) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) ou na presença de sal (▩) nos tempos de coleta propostos. As barras representam 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 ($P \leq 0,05$).

O gene *p5cs1*, responsável pela síntese da isoenzima de síntese da prolina, a P5CS1, de acordo com Gharsallah *et al.* (2016) é expresso com maior intensidade nos tecidos da parte aérea, sendo fortemente induzido sob condições de alta salinidade, desidratação ou de estresse de frio. No entanto, no presente estudo, a expressão desse gene ao longo do tempo foi fortemente aumentada pela salinidade, tanto nas folhas como nas raízes, porém, os picos de expressão ocorreram em momentos diferentes. A partir do 2º dia de estresse, esse gene teve sua expressão aumentada em relação ao controle/água em ambos os tecidos (Figura 13). Esses aumentos em expressão do gene *p5cs1* pela salinidade foram concordantes com os aumentos em atividade da P5CS também causados pela salinidade, tanto nas folhas quanto nas raízes e nos dois tempos de coleta (Figura 9C, D). Em *Arabidopsis*, estudos com mutantes silenciados no gene *p5cs1* demonstraram que tais mutantes se tornaram hipersensíveis aos sais, ao estresse osmótico e à deficiência hídrica (SZÉKELY *et al.*, 2008), fato que demonstra a importância desse gene na tolerância a estresses abióticos.

Nas folhas, aos 7 DAT, a redução observada na expressão do gene *p5cs1* no tratamento salino/prolina, em relação ao tratamento salino (Figura 13A), está de acordo com a redução em atividade da P5CS (Figura 9C). Já aos 14 DAT, no mesmo tratamento e tecido, a superexpressão do *p5cs1* correlacionou-se com a recuperação em atividade da P5CS, embora isso não tenha se refletido diretamente no conteúdo de prolina (Figura 9A,C). Provavelmente, o ocorrido nas folhas aos 14 DAT seja reflexo da necessidade da planta, que ainda se encontra sob salinidade, em continuar a produção de prolina a qual fora reduzida entre a primeira e a segunda coleta. Diferentemente do encontrado no presente trabalho, Nounjan *et al.* (2012) perceberam que a prolina exógena regulou positivamente a expressão da P5CS nas folhas da cultivar KDML105 de arroz.

É interessante destacar que, embora nas raízes os teores de prolina e de atividade da P5CS não tenham sido alterados pelo tratamento com prolina exógena, independentemente da condição de cultivo, presença ou ausência de salinidade (Figura 9B, D), a expressão do gene

p5cs1 foi afetada por esse tratamento (Figura 13). Isso implica que, mesmo que a expressão tenha sido reduzida, o quantitativo enzimático de P5CS tenha sido suficiente para manter a resposta fisiológica (produção de prolina). É importante destacar que os processos de transcrição e de síntese de proteínas são energeticamente dispendiosos (HUANG *et al.*, 2015) e reduções no custo metabólico durante o estresse salino são indispensáveis para a manutenção da planta (SRIVASTAVA *et al.*, 2015) sendo que, de alguma forma, o tratamento com prolina tenha afetado essa redução na expressão do gene. A causa da redução da expressão da *p5cs1* motivada pelo tratamento com prolina nas condições acima descritas podem ser ainda mais complexas, porém nossos resultados são insuficientes para explicar o fenômeno por completo.

6.3.2.2. Expressão do gene *p5cs2*

Nas folhas, diferentemente do gene *p5cs1*, cuja expressão aumentou com o tempo após início dos tratamentos, o gene *p5cs2*, correspondente à isoenzima P5CS2, teve sua expressão diminuída (Figura 14A). Nesses mesmos órgãos, as maiores expressões desse gene ocorreram aos 0,5 e 1 dia, sendo isto observado nos tratamentos controle/água e salino/água. Já no tratamento com prolina, a expressão do *p5cs2* foi sempre baixa ao longo do período de estudo, apresentando, porém, maiores níveis aos 2 e 5 DAT. Além disso, independentemente do tratamento, aos 7 e 14 DAT os níveis de expressão relativa desse gene foram extremamente baixos, praticamente igual a unidade (Figura 14A). Ressalte-se que o tratamento com prolina, independentemente do tratamento, causou, de modo geral, redução nos níveis de expressão desse gene.

Nas raízes, da mesma forma que nas folhas, os níveis de expressão do gene *p5cs2* foram decrescentes com o tempo de experimentação, e aos 7 e 14 DAT, sua expressão relativa foi praticamente igual a zero (Figura 14B). De modo geral, os níveis de expressão desse gene

foram mais baixas que as observadas nas folhas e praticamente não houve diferenças entre os tratamentos empregados.

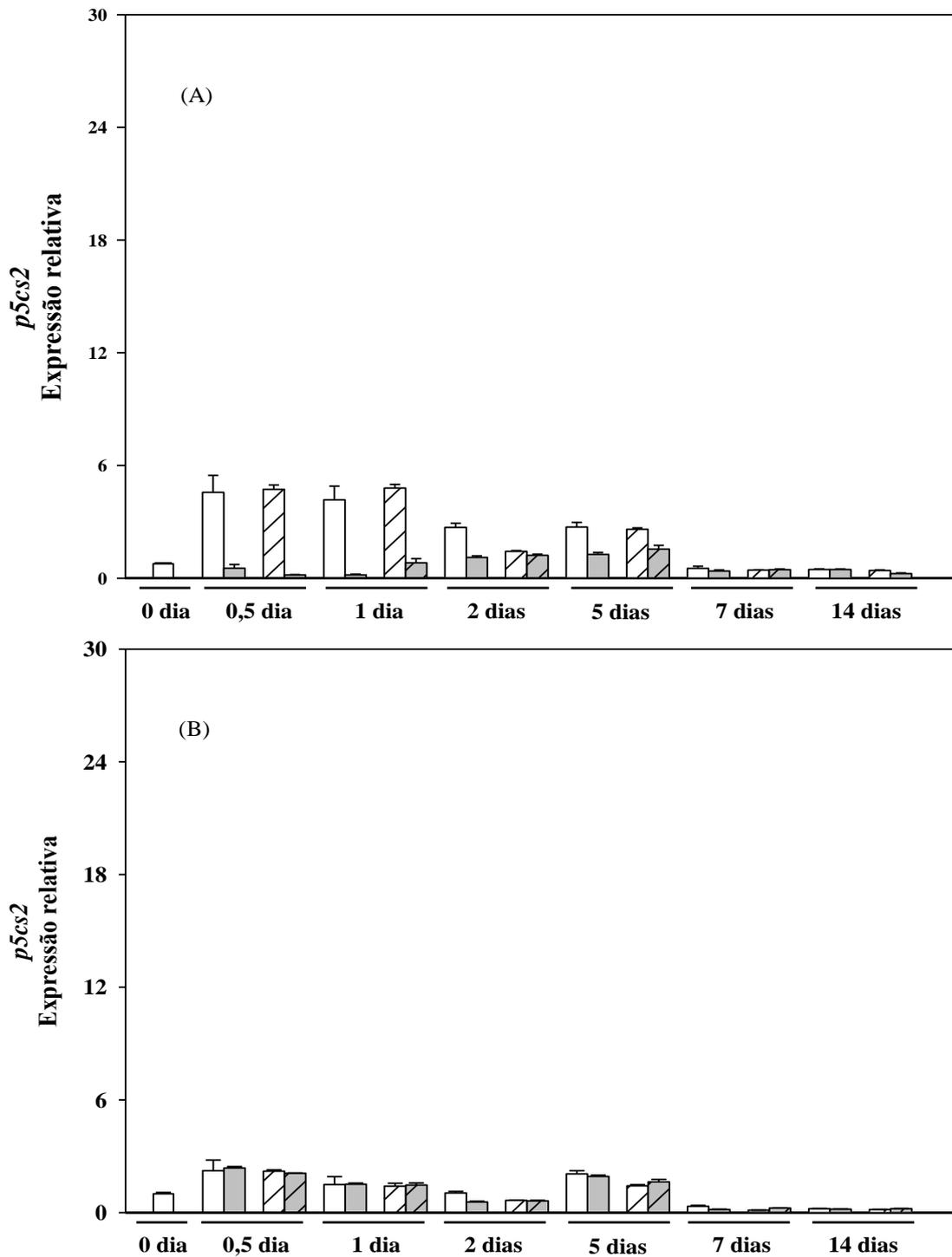


Figura 14. Expressão relativa do gene *p5cs2* em folhas (A) e raízes (B) de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) ou na presença (▨) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) ou na presença de sal (▩) nos tempos de coleta propostos. As barras representam 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 ($P \leq 0,05$).

Diferentemente do observado por Benitez *et al.* (2016), em plantas de arroz, o gene *p5cs2* de folhas e raízes de plantas de sorgo não teve sua expressão aumentada pela salinidade (Figura 14). Esses autores também observaram que, enquanto no genótipo tolerante ao estresse salino houve aumento na expressão dos genes *p5cs1* e *p5cs2*, no genótipo sensível isso ocorreu apenas no gene *p5cs2*. Esses resultados também foram diferentes dos observados aqui, pois a salinidade induziu fortemente a expressão do gene *p5cs1*, tanto nas folhas quanto nas raízes (Figura 13). De acordo com Li *et al.* (2017), ao contrário do gene *p5cs1*, o *p5cs2* parece ser expresso apenas em condições específicas que, no entanto, podem conferir tolerância. Esses autores observaram que a colonização de *Medicago truncatula* pelo fungo endofítico, *Piriformospora indica*, promove tolerância à salinidade e isso se dá pela superexpressão do *p5cs2*, o qual induz a síntese de prolina na planta (LI *et al.*, 2017).

6.3.2.3. Expressão do gene *oat*

Nas folhas, o gene *oat*, responsável pela síntese da OAT, principal enzima da biossíntese de prolina pela chamada via da ornitina, foi expresso logo no início (0,5 DAT) em todos os tratamentos (Figura 15A). O maior nível de expressão desse gene ocorreu no tratamento salino/água, seguido do tratamento controle/água e nesses tratamentos houve uma tendência de queda, porém, com algumas flutuações na expressão desse gene em função do tempo de exposição aos tratamentos. Além disso, o tratamento de aspersão das folhas com prolina inibiu fortemente a expressão do gene *oat*, tendo isso ocorrido principalmente no tratamento prolina/salino até o 2º dia (Figura 15A). Do 5º dia em diante, a expressão relativa desse gene foi praticamente a mesma em todos os tratamentos e com valores extremamente baixos (em torno de 1).

Nas raízes, em média, o gene *oat* foi expresso com mais intensidade que nas folhas e, de modo geral, o tratamento com prolina pouco alterou os níveis de expressão desse gene, tanto no controle/água como no controle/salino (Figura 15B). Nos dias 1 e 7, a expressão

desse gene foi aumentada pela salinidade, enquanto nos dias 5 e 7 essa expressão foi reduzida pela salinidade, isso tudo independentemente do tratamento com prolina.

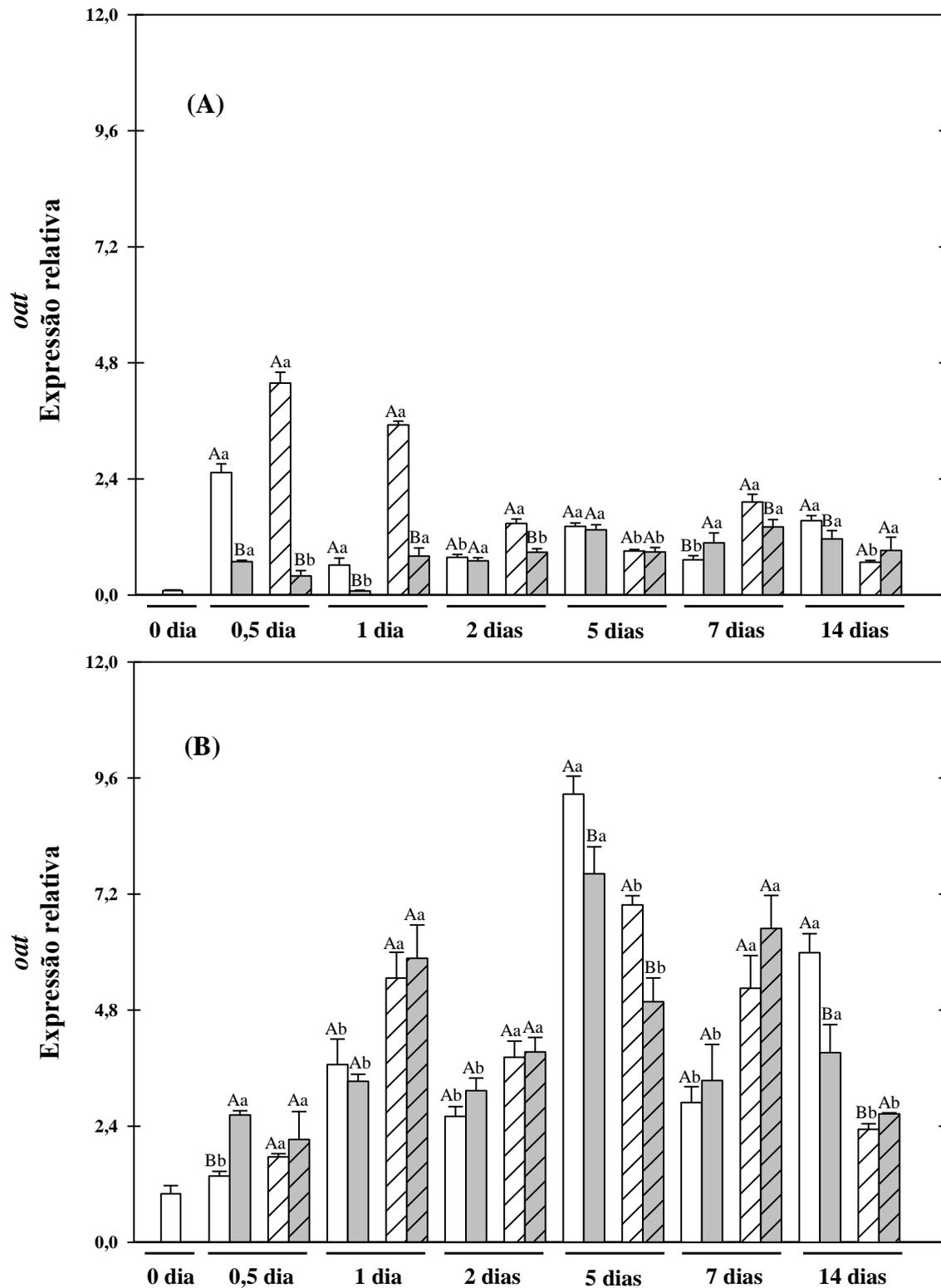


Figura 15. Expressão relativa do gene *oat* em folhas (A) e raízes (B) de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▣) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▣) nos tempos de coleta propostos. As barras representam a média ± 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 ($P \leq 0,05$).

Segundo Nada *et al.* (2010), a expressão do gene *oat* e, consequente aumento nos níveis da enzima OAT, podem contribuir para a tolerância das plantas *Vicia villosa* a estresses abióticos, pois esse gene está diretamente envolvido no metabolismo da prolina, do glutamato e da arginina (NADA *et al.*, 2010). Muito embora a expressão do gene *oat* tenha sido historicamente relacionado com o acúmulo de prolina em plantas sob estresses diversos seu papel é um assunto a ser debatido (GINGUAY *et al.*, 2017). Por exemplo, no estudo de plantas de alcachofra de Jerusalem (*Heliantus tuberosus* L.), em que os níveis de transcritos foliares e raízes de HtOAT foram reduzidos em condições de estresse salino, não houve requerimento na expressão desse gene para a biossíntese de prolina (HUANG *et al.*, 2013).

A expressão do gene *oat* nas folhas das plantas de sorgo do tratamento salino/prolina, logo no início (0,5 e 1 dia) dos tratamentos (Figura 15A), sugere que este gene seja importante nessa fase do desenvolvimento, sendo posteriormente substituído pelo gene *p5cs1*, o qual tem sua expressão elevada a partir do 2º dia (Figura 13A). Portanto, a expressão do gene *oat* e de seu produto gênico pode desempenhar outros papéis além da biossíntese da prolina. Estudos com mutantes *oat* de *A. thaliana* indicam um papel para a OAT na síntese de glutamato ao invés de na síntese de prolina e os autores enfatizam sua importância na reciclagem de nitrogênio (FUNCK *et al.*, 2008). Por outro lado, os aumentos na expressão do gene *oat* no tratamento salino/água (Figura 15A) se relacionaram, pelo menos em parte, com os aumentos em atividade da OAT nas folhas (Figura 9E), bem como com os elevados teores de prolina nas folhas das plantas de sorgo sob condições de salinidade (Figura 9A). As reduções observadas na expressão do gene *oat*, nas folhas das plantas de sorgo do tratamento salino/prolina, desde o início dos tratamentos (Figura 15A), pode ser um reflexo da concentração demasiadamente alta de prolina exógena utilizada na aspersão das folhas e que resultou em um elevado teor de prolina no 7º dia (Figura 9A). No entanto, a diminuição na expressão desse gene não resultou em diminuição na atividade da OAT no 7º dia, nas folhas das plantas de sorgo do tratamento salino/prolina (Figura 9E). Nas raízes, a maior expressão

do gene *oat* nas plantas de sorgo sob salinidade, isoladamente ou associada com o tratamento com prolina, possivelmente contribuiu, pelo menos em parte, para uma maior atividade da enzima OAT nessas condições (Figura 9F), bem como para os maiores teores de prolina também nessas condições (Figura 9B). Ademais, as poucas diferenças na expressão desse gene nos tratamentos salino/água e salino/prolina foram concordantes com o fato da atividade da OAT não ser diferente nesses dois tratamentos (Figura 9F), bem como os teores de prolina serem iguais em ambos os tratamentos (Figura 9B).

6.3.2.4. Expressão do gene *prodh*

Nas folhas, o gene da *prodh*, responsável pela síntese da enzima de degradação da prolina, a ProDH, foi expresso em todos os tratamentos, principalmente nos tratamentos controle/prolina e salino/prolina, desde o início do período experimental, sendo os maiores níveis expressão alcançados aos 2 DAT (Figura 16A). A partir desse dia, os níveis de expressão desse gene foram progressivamente diminuindo, atingindo, aos 14 DAT, o menor nível de expressão relativa e valores de expressão relativa em torno de 1. É interessante destacar, que os mais altos níveis de expressão do gene *prodh* se relacionaram aos mais altos níveis da enzima ProDH nas folhas de plantas de sorgo dos tratamentos controle/prolina e salino/prolina (Figura 9G), porém isso não foi suficiente para que os teores de prolina nesses tratamentos fossem menores que seus respectivos controles (Figura 9A). É possível que o aumento na expressão do gene *prodh* nas plantas tratadas com prolina, que, resalte-se, foi empregada em uma concentração muito elevada (30 mM) seja uma possível resposta contra uma eventual toxicidade provocada por esse iminoácido. Nanjo et al. (2003), estudando plantas de *Arabidopsis* mutantes para o gene *prodh*, concluíram que, para essa espécie existe uma correlação dose-dependente entre a expressão de *prodh* e o provimento de prolina. Também em *Arabidopsis*, a expressão dos dois genes *prodh* foi induzida pela salinidade e pelo

aporte de prolina, sendo que a expressão do gene *prodh1* foi reprimida pelo estresse osmótico (FUNCK *et al.*, 2010).

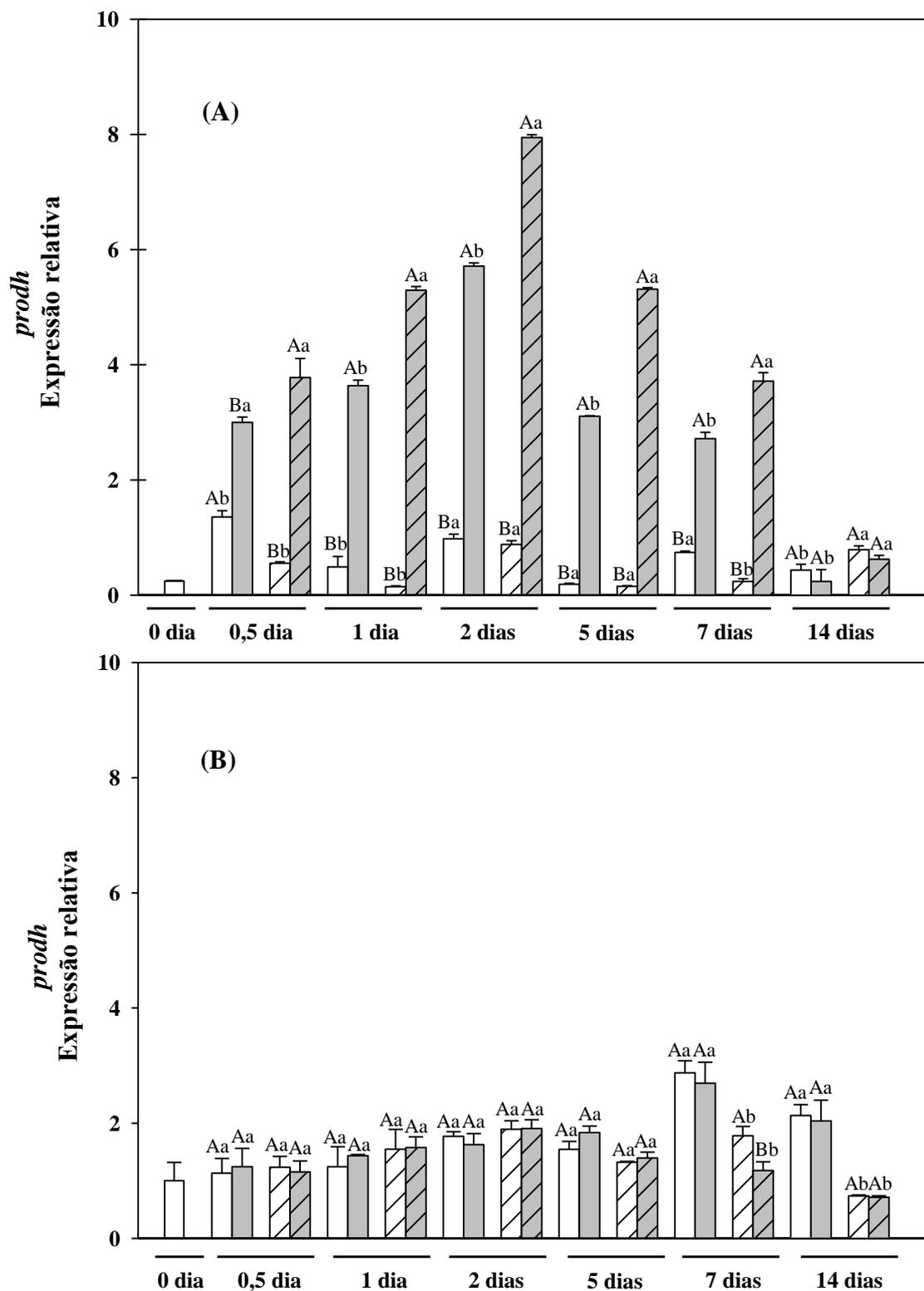


Figura 16. Expressão relativa do gene *prodh* em folhas (A) e raízes (B) de plantas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (■) de NaCl a 75 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▨) nos tempos de coleta propostos. As barras representam a média \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 ($P \leq 0,05$).

Nas folhas aos 14 DAT, a redução na expressão dos transcritos do gene *prodh* (Figura 16A) foi condizente com a redução na atividade da ProDH em condições de salinidade, independentemente do tratamento com prolina; porém, em ausência de salinidade, os níveis de atividade foram da mesma ordem de grandeza que aqueles do 7º dia (Figura 9G). Essa redução na atividade da ProDH, juntamente com o aumento nas atividades das duas enzimas de síntese, OAT e P5CS (Figuras 9C, E), contribuiu para que os níveis de prolina no tratamento salino no 14º dia fossem maiores nos tratamentos salino/água e salino/prolina que aqueles dos respectivos controles (Figura 9A).

Em média, nas raízes, os níveis de expressão relativa do gene *prodh* foram menores que aqueles nas folhas e praticamente a expressão desse gene não foi influenciada pelo tratamento com prolina (Figura 16B). Ainda nesses tecidos, esse gene foi expresso desde o início do período experimental em todos os tratamentos e com valores de expressão relativamente iguais entre os tratamentos, pelo menos até o 2º dia (Figura 16B). Do 5º dia em diante, a expressão relativa desse gene foi menor nos tratamentos salino/água e salino/prolina, os quais não diferiram entre si, e atingiram no 14º dia um valor de expressão 60% menor que aqueles dos controles, que por também por sua vez não diferiram entre si. Esses mais baixos níveis de expressão do gene *prodh* foram concordantes com os mais baixos níveis da enzima ProDH nas raízes, sob condições salinas, tanto aos 7 quanto aos 14 DAT (Figura 9H). Esses baixos níveis dessa enzima catabólica da prolina, juntamente com os altos níveis das enzimas de síntese P5CS e OAT (Figura 9D, F), sob condições salinas, foram responsáveis pelos maiores teores de prolina nas raízes de plantas de sorgo nessas mesmas condições, tanto aos 7 quanto aos 14 DAT (Figura 9B).

7. CONCLUSOES

- Os efeitos deletérios da salinidade no crescimento e desenvolvimento das plantas foram minimizados pela aspersão foliar de prolina, principalmente, quando na concentração de 30 mM;
- Os tecidos foliares foram, em relação aos das raízes, os que mais que tiveram os efeitos deletérios da salinidade minimizados pela aspersão de prolina, o que ocorreu, principalmente, aos 14 DAT;
- Os efeitos benéficos da aspersão de prolina nas plantas de sorgo se relacionaram com parâmetros de trocas de gasosas mais favoráveis e maior eficiência nas homeostases iônica e hídrica e aumentos nos conteúdos de compostos orgânicos nitrogenados e de clorofila total;
- Os resultados também demonstraram que a prolina exógena altera a atividade das enzimas P5CS e ProDH e que essa alteração, em grande parte, se relacionou com as alterações na expressão dos genes *p5cs1* e *prodh*.

8. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, M. M.; EL-BASSIOUNY, H. M. S. Impact of exogenous proline or tyrosine on growth , some biochemical aspects and yield components of quinoa plant grown in sandy soil. **International Journal of PharmTech Research**, v. 9, n. 7, p. 12–23, 2016.

AGAMI, R. A. Applications of ascorbic acid or proline increase resistance to salt stress in barley seedlings. **Biologia Plantarum**, v. 58, n. 2, p. 341–347, 2014.

AGGARWAL, M.; SHARMA, S.; KAUR, N.; *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.

AHAMED, M. I.; DAI, H.; ZHENG, W.; *et al.* Plant Physiology and Biochemistry Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 63, p. 49–60, 2013.

ALI, Q.; ASHRAF, M., ATHAR, H. Exogenously Applied Proline At Different Growth Stages Enhances Growth Of Two Maize Cultivars Grown Under Water Deficit Conditions. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 4, p. 1133–1144, 2007.

ALINIAEIFARD, S.; HAJILOU, J.; TABATABAEI, S. J. Photosynthetic and Growth Responses of Olive to Proline and Salicylic Acid under Salinity Condition. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 44, n. May, p. 579–585, 2016.

AMALI, P.; KINGSLEY, S. J.; IGNACIMUTHU, S. Effect of exogenous proline on in vitro regeneration of *Sorghum bicolor* (L. Moench) under induced salt stress. **International Journal of Agricultural Technology**, v. 9, n. 6, p. 1423–1435, 2013.

AMINI, S.; GHOBADI, C.; YAMCHI, A. Proline accumulation and osmotic stress: an overview of P5CS gene in plants. **Journal of Plant Molecular Breeding**, v. 3, n. 2, p. 44–55 2015.

ANJUM, N. A.; AREF, I. M.; DUARTE, A. C.; *et al.* Glutathione and proline can coordinately make plants withstand the joint attack of metal (loid) and salinity stresses. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. November, p. 2010–2013, 2014.

ANWAR HOSSAIN, M.; HOQUE, M. A.; BURRITT, D. J.; FUJITA, M. **Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms**. 2014.

ARENTSON, B. W.; SANYAL, N.; BECKER, D. F. Substrate channeling in proline metabolism, **Frontiers in Bioscience**, n. 8, p. 375–388, 2013.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments : An overview, **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p. 163–190, 2013.

AVCI, S.; ILERI, O.; KAYA, M. D. Determination of Genotypic Variation among Sorghum Cultivars for Seed Vigor , Salt and Drought Stresses. **Journal of Agricultural Sciences**, v. 23, n. 2017, p. 335–343, 2016.

AVELINO, P. M.; NEUMAN, J.; NEIVA, M.; ARAUJO, V. L.; ALEXANDRINO, E. Composição bromatológica de silagens de híbridos de sorgo cultivados em diferentes densidades de plantas, **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 208–215, 2011.

BAGDI, D. L.; SHAW, B. P.; SAHU, B. B.; PUROHIT, G. K.; INFO, P. Real time PCR expression analysis of gene encoding p5cs enzyme and proline metabolism under NaCl salinity in rice. **Journal of Experimental Biology**, v. 36, n. July, p. 955–961, 2015.

BANU, A. N.; HOQUE, A.; WATANABE-SUGIMOTO, M.; *et al.* Proline and Glycinebetaine Ameliorated NaCl Stress via Scavenging of Hydrogen Peroxide and Methylglyoxal but Not Superoxide or Nitric Oxide in Tobacco Cultured Cells Proline and Glycinebetaine Ameliorated NaCl Stress via Scavenging. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, p. 2043–2049, 2009.

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.

BELKHEIRI, O.; MULAS, M. The effects of salt stress on growth , water relations and ion accumulation in two halophyte Atriplex species. **Environmental and Experimental Botany**, v. 86, p. 17–28, 2013.

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

BENITEZ, L. C., VIGHI, I. L., AULER, P. A., DO AMARAL, M. N., MORAES, G. P., DOS SANTOS RODRIGUES, G., ... BRAGA, E. J. B. Correlation of proline content and gene expression involved in the metabolism of this amino acid under abiotic stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 11, p. 1–12, 2016.

BENITO, B.; HARO, R.; AMTMANN, A.; CUIN, T. A.; Dreyer, I. The twins K⁺ and Na⁺ in plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 9, p. 723–731, 2014.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 293, p. 278–293, 1966.

BOLOURI-MOGHADDAM, M. R.; ROY, K. LE; XIANG, L.; ROLLAND, F. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. **The FEBS Journal**, v. 277, p. 2022–2037, 2010.

BORTOLOTTI, A.; OLIVEIRA, C.; CAZETTA, J. O. EFFECTS OF EXOGENOUS PROLINE AND A NATURAL VENTILATION SYSTEM ON THE IN VITRO GROWTH OF ORCHIDS. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 3, p. 619–626, 2016.

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.

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

CABELLO, J. V; LODEYRO, A. F.; ZURBRIGGEN, M. D. ScienceDirect Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 62–70, 2014.

CASTRO, F. M. R. **Potencial agrônômico e energético de genótipos de sorgo biomassa**. Universidade Federal de Lavras, dissertação de mestrado, 84 p., 2014.

CATSKÝ, J. Determination of water deficits in disc cut out from leaf blades. **Biologia Plantarum**, v. 2, p. 929 – 938, 1960.

CARILLO, P.; ANNUNZIATA, M. G.; PONTECORVO, G.; FUGGI, A.; WOODROW, P. Salinity Stress and Salt Tolerance, **Abiotic Stress In Plants – Mechanisms and Adaptations**, 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/abioticstress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/salinity-stress-and-salt-tolerance>>. Acessado em 08/09/2017.

CECCHINI, M.; MONTEOLIVA, M. I.; ALVAREZ, E. Proline Dehydrogenase Contributes to Pathogen Defense. **Plant Physiology**, v. 155, n. April, p. 1947–1959, 2011.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress : regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, p. 551–560, 2009.

CHEN, C.; DICKMAN, M. B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. **PNAS**, v. 102, n. 9, 2005.

CHEN, J.; ZHANG, Y.; WANG, C.; LU, W. Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signaling. **Amino Acids**, v. 40, p. 1473–1484, 2011.

COELHO, D. S.; SIMÕES, W. L.; MENDES, A. M. S.; DANTAS, B. F.; RODRIGUES, J. A. S.; SOUZA, M. A. De. Germinação e crescimento inicial de variedades de sorgo forrageiro submetidas ao estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 18, n.1, p.25–30, 2014.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Perspectivas para a Agropecuária safra 2015/2016**. Brasília: CONAB, v. 3, p. 119-128, 2016a. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_09_24_11_44_50_perspectivas_agropecuaria_2015-16_-_produtos_verao.pdf>. Acesso em: 17/08/2017.

DAWOOD, M. G.; TAIE, H. A. A.; NASSAR, R. M. A.; ABDELHAMID, M. T.; SCHMIDHALTER, U. South African Journal of Botany The changes induced in the physiological , biochemical and anatomical characteristics of *Vicia faba* by the exogenous application of proline under seawater stress. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 54–63, 2014.

DEINLEIN, U.; STEPHAN, A. B.; HORIE, T.; *et al.* Plant salt-tolerance mechanisms. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 6, p. 371–379, 2014.

DEMİRALAY, M.; ALTUNTAŞ, C.; SEZGİN, A.; TERZİ, R.; KADIOĞLU, A. Application of proline to root medium is more effective for amelioration of photosynthetic damages as compared to foliar spraying or seed soaking in maize seedlings under short-term drought. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, p. 649–660, 2017.

DINIZ, G. **Produção de Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Aspectos gerais**. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Dissertação de Mestrado, 2010.

DUARTE, B.; SANTOS, D.; MARQUES, J. C.; CAÇADOR, I. Ecophysiological adaptations of two halophytes to salt stress: Photosynthesis, PS II photochemistry and anti-oxidant feedback - Implications for resilience in climate change. **Plant Physiology and Biochemistry: PPB/Société Française de Physiologie Végétale**, v. 67, p. 178–88, 2013.

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.

FABRO, G.; KOVACS, I.; PAVET, V.; SZABADOS, L.; ALVAREZ, M.E. Proline accumulation and *AtP5CS2* gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in Arabidopsis. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 17, p. 343–350, 2004.

FAHAD, S.; HUSSAIN, S.; MATLOOB, A.; *et al.* Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 2, p. 391–404, 2015.

FAROOQ, S.; AZAM, F. The use of cell membrane stability (CMS) technique to screen for salt tolerant wheat varieties. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 629–637, 2006.

FEDOTOVA, M. V.; DMITRIEVA, O. A. Proline hydration at low temperatures: its role in the protection of cell from freeze - induced stress. **Amino Acids**, v. 48, n. 7, p. 1685–1694, 2016. Springer Vienna.

FEIJÃO, A. R.; MARQUES, E. C.; CÉSAR, J.; *et al.* Nitrato modula os teores de cloreto e compostos nitrogenados em plantas de milho submetidas à salinidade. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 3, p. 10–19, 2013.

FERREIRA, A. G.; BORGUETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Ed. Artmed, 1ª edição, 324p., 2004.

FICHMAN, Y.; GERDES, S. Y.; KOV, H *et al.* Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. **Biological Reviews**, v. 1069, p. 1065–1099, 2015.

FLOWERS, T. J.; MUNNS, R.; COLMER, T. D. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. **Annals of Botany**, n. November, 13p., 2017.

FLOWERS, T. J.; COLMER, T. D. Plant salt tolerance: Adaptations in halophytes. **Annals of Botany**, v. 115, n. 3, p. 327–331, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Global soil status, processes and trends. Status of the World's Soil Resources, 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-bc595e.pdf>> Acessado em: 22/08/17.

FREITAS, P. A. F. **Aplicação foliar de prolina como meio de minorar os efeitos do estresse salino em plantas de milho**, 2013. UFC.

FUNCK, D.; STADELHOFER, B.; KOCH, W. Ornithine-d-aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. **BMC Plant Biology** v. 8, n. 40, p.1-14, 2008.

FUNCK, D.; ECKARD, S.; MÜLLER, G. Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in Arabidopsis. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 13p., 2010.

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.

GHARSALLAH, C.; FAKHFAKH, H.; GRUBB, D.; GORSANE, F. Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. **AoB Plants**, v. 8, p. 1–21, 2016.

GAUFICHON, L.; REISDORF-CREN, M.; ROTHSTEIN, S. J.; CHARDON, F.; SUZUKI, A. Plant Science Biological functions of asparagine synthetase in plants. **Plant Science**, v. 179, p. 141–153, 2010.

GINGUAY, A.; CYNOBER, L.; CURIS, E. *et al.* Ornithine Aminotransferase, an Important Glutamate-Metabolizing Enzyme at the Crossroads of Multiple Metabolic Pathways, **Biology**, v. 6, n. 18, 38p., 2017.

GOLLDACK, D.; LI, C.; MOHAN, H.; PROBST, N. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–10, 2014.

GOMES-FILHO, E.; MACHADO LIMA, C.R.F.; COSTA, J.H.; SILVA, AC, da GUIA, M.S.L.; LACERDA, C.F., PRISCO, J.T. Cowpea ribonuclease: properties and effect of NaCl-salinity on its activation during seed germination and seedling establishment. **Plant Cell Reports** v.27, p.147–157, 2008.

GUPTA, B., HUANG, B. Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. **International Journal of Genomics**, v. 2014, p. 1–18, 2014.

HANSON, A. D.; GREGORY, J. F. Folate Biosynthesis, Turnover, and Transport in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, p. 105–125, 2011.

HARE, P. D.; CRES, W. A.; van STADEN, J. Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in Arabidopsis leaves, **South Africa Journal of Botany**, v. 68, p. 393–396, 2002.

HASAN, M. I.; KIBRIA, M. G.; JAHIRUDDIN, M.; MURATA, Y.; HOQUE, M. Improvement of Salt Tolerance in Maize by Exogenous Application of Proline. **Journal of Environmental Science and Natural Resources**, v. 8, n. 1, p. 13–18, 2015.

HASANUZZAMAN, M.; ALAM, M. M.; RAHMAN, A.; *et al.* Exogenous proline and glycine betaine mediated upregulation of antioxidant defense and glyoxalase systems provides better protection against salt-induced oxidative stress in two rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

HASEGAWA, P. M. Sodium (Na⁺) homeostasis and salt tolerance of plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 92, p. 19–31, 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. California. Agr. Exp. STA. Cir, 347p., 1950.

HU, C.A.; BART WILLIAMS, D.; ZHAORIGETU, S.; KHALIL, S.; WAN, G.; VALLE, D. Functional genomics and SNP analysis of human genes encoding proline metabolic enzymes. **Amino Acids**, v. 35, p. 655–664, 2008.

HU, R.; FAN, C.; LI, H. *et al.* Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 10:93, 2009.

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.

HUANG, Z.; ZHAO, L.; CHEN, D.; *et al.* Salt Stress Encourages Proline Accumulation by Regulating Proline Biosynthesis and Degradation in Jerusalem Artichoke Plantlets. **PLOS one**, v. 8, n. 4, 11p., 2013.

HAYAT, S.; HAYAT, Q.; ALYEMENI, M. N.; *et al.* Role of proline under changing environments A review. **Food Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 1456–1466, 2012.

IQBAL, N.; UMAR, S.; KHAN, N. A.; KHAN, M. I. R. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance : Regulation of proline metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 34–42, 2014. Elsevier B.V.

ISMAIL, A. M.; HORIE, T. Genomics, Physiology and Molecular Breeding Approaches for Improving Salt Tolerance, **Annual Review of Plant Biology**, v. 68, p. 405–434, 2017.

JONYTIENÈ, V.; BURBULIS, N.; KUPRIENÈ *et al.* Effect of exogenous proline and de-acclimation treatment on cold tolerance in Brassica napus shoots cultured in vitro. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 10, n. February, 2012.

JULKOWSKA, M. M.; TESTERINK, C. Tuning plant signaling and growth to survive salt. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 9, p. 586–594, 2015.

KADER, A.; LINDBERG, S. Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. **Plant Signaling and Behavior**, v. 2324, n. November, p. 233–238, 2017.

KALAJI, H. M.; BOSHA, K.; KO, J.; ZUK-GOŁASZEWSKA, K. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. **Environmental and Experimental Botany**, v. 73, p. 64–72, 2011.

KAFI, M.; JAFARI, M. H. S.; MOAYEDI, A. The Sensitivity of Grain Sorghum (*Sorghum bicolor* L .) Developmental Stages to Salinity Stress : An Integrated Approach. **Journal of Agricultura Science Technology**, v. 15, p. 723–736, 2013.

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. **Plant Journal** v. 50, p.967-981, 2007.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline : a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 609–619, 2015.

KAVI KISHOR, P. B.; SREENIVASULU, N. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? **Plant, Cell and Environment**, v. 37, n. 2, p. 300–11, 2014.

KAVI KISHOR, P. B.; HIMA KUMARI, P.; SUNITA, M. S. L.; SREENIVASULU, N. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p.1-17, 2015.

KAYA, C.; TUNA, A. L.; ASHRAF, M.; ALTUNLU, H. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L .) by the addition of proline and potassium nitrate. **Enviromental and Experimental Botany**, v. 60, p. 397–403, 2007.

KIM, M.; DAY, D. F. Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 7, 803–807, 2011.

KIM, J.; SASAKI, T.; UEDA, M.; SAKO, K.; SEKI, M. Chromatin changes in response to drought , salinity , heat , and cold stresses in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. March, p. 1–12, 2015.

KOWAL, R. R. **The Biology of Sorghum bicolor (L .) Moench subsp. bicolor (Sorghum)**, Australian Government Department of Health, Office of the Gene Technology Regulator, 79 p., 2017.

KUDLA, J.; HASHIMOTO, K.; BATISTIC, O. Calcium Signals : The Lead Currency of Plant Information Processing. **The Plant Cell**, v. 22, n. March, p. 541–563, 2010.

LEA, P. J.; SODEK, L.; PARRY, M. A. J.; SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G. Asparagine in plants. **Annals of Applied Biology**, v. 150, p. 1–26, 2007.

LEE, B.; JIN, Y. L.; AVICE, J.; *et al.* Increased proline loading to phloem and its effects on nitrogen uptake and assimilation in water-stressed white clover (*Trifolium repens*). **New Phytologist**, v. 182, p. 654–663, 2009.

LI, L.; LI, L.; WANG, X.; *et al.* Plant Physiology and Biochemistry Plant growth-promoting endophyte *Piriformospora indica* alleviates salinity stress in *Medicago truncatula*. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 119, p. 211–223, 2017.

LIANG, X.; ZHANG, L.; NATARAJAN, S. K.; BECKER, D. F. Proline Mechanisms of Stress Survival. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 19, n. 9, p. 998–1011, 2013.

MAATHUIS, F. J. M. Sodium in plants : perception , signalling , and regulation of sodium fluxes. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 3, p. 849–858, 2014.

MACHADO, R.; SERRALHEIRO, R. Soil Salinity: Effect on Vegetable Crop Growth. Management Practices to Prevent and Mitigate Soil Salinization. **Horticulturae**, v. 3, n. 2, p. 30, 2017.

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.

MANSOUR, M. M. F. Nitrogen containing compounds and adaptations of plants to salinity stress. **Biologia Plantarum**, v. 43, n.4, p. 491–500, 2000.

MARQUES, E.C.; FREITAS, P.A.F.; ALENCAR, N.L.M.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Increased Na⁺ and Cl⁻ accumulation induced by NaCl salinity inhibits cotyledonary reserve mobilization and alters the source-sink relationship in establishing dwarf cashew seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 2171–2182, 2013.

MARSHALL, O. Perl Primer V1.1.20. 2003 – 2011.

MAY, A.; CAMPANHA, M.M.; SILVA, A.F.; COELHO, M.A.O.; PARRELLA, R.A.; SCHAFFERT, R.E.; PEREIRA FILHO, I.A. Variedades de sorgo sacarino em diferentes espaçamentos ou populações de plantas. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, p.278-290, 2012.

MEKI, M. N.; SNIDER, J. L.; KINIRY, J. R.; RAPER, R. L.; ROCATELI, A. C. Energy sorghum biomass harvest thresholds and tillage effects on soil organic carbon and bulk density. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 172-182, 2013.

MESSEDI, D.; FARHANI, F.; HAMED, K. B. E. N.; *et al.* Highlighting The Mechanisms By Which Proline Can Confer Tolerance To Salt Stress In *Cakile maritima*. **Pakistan Journal of Botany**, v. 48, n. 2, p. 417–427, 2016.

MILLER, G.; HONIG, A.; STEIN, H.; *ET AL.* Unraveling Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate-Proline Cycle in Plants by Uncoupled Expression of Proline Oxidation Enzymes. **Journal of Biological Chemistry**. v. 284, p. 26482–26492, 2009.

MILLER, G. A. D.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. O. N. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.

MING, Z.; LI-FENG, W.; KUN, Z.; FENG-ZHEN, L. I. U.; YONG-SHAN, W. A. N. Drought-induced responses of organic osmolytes and proline metabolism during pre-flowering stage in leaves of peanut (*Arachis hypogaea* L .). **Journal of Integrative Agriculture**, v. 16, n. 0, 10p., 2017.

MIRANDA, R.S.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T.; ALVAREZ-PIZARRO, J.C. Ammonium improves tolerance to salinity stress in *Sorghum bicolor* plants. **Plant Growth Regulation**. v. 78, p.121–131, 2016.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 110–121, 2014.

MISHRA, S.; DUBEY, Ñ, R. S. Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings : Role of proline as enzyme protectant. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, 2006.

MOTA, L.H.D.S. D.O.; GOMES, A.D S.; VALLADARES, G.S.; MAGALHÃES, R.M.F.; LEITE, H.M.F.; SILVA, T.A.DA. Risco de salinização das terras do baixo Acaraú (CE). **Revista Brasileira de Ciência Do Solo**, v. 36, n.4, p. 1203–1210, 2012.

- MOSTEK, A.; BÖRNER, A.; BADOWIEC, A.; WEIDNER, S. Alterations in root of salt-sensitive and tolerant barley lines under salt stress conditions. **Journal of Plant Physiology**. 174, p. 166–176, 2015.
- MOUSTAKAS, M.; SPERDOULI, I.; KOUNA, T.; THERIOS, I. Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Growth Regulation**. n. August 2014, 2011.
- MULLET, J.; MORISHIGE, D.; MCCORMICK, R.; TRUONG, S.; HILLEY, J.; MCKINLEY, B.; ... ROONEY, W. Energy Sorghum-A genetic model for the design of C4 grass bioenergy crops. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 13, p. 3479–3489, 2014.
- MUNNS, R.; JAMES, R. A.; GILLIHAM, M. *et al.* Tissue tolerance : an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. **Functional Plant Biology**, v. 43, p. 1103–1113, 2016.
- 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.
- MUNNS, R.; GILLIHAM, M. Salinity tolerance of crops - what is the cost? **New Phytologist**, v. 208, n. 3, p. 668–673, 2015.
- NADA, A. M. K.; ABD-ELHALIM, H. M.; EL-DOMYATI, F. M.; *et al.* Expression , detection of candidate function and Expression , detection of candidate function and homology modeling for *Vicia villosa* ornithine δ -aminotransferase. **GM Crops**, v. 1999, n. December 2017, p. 250–256, 2010.
- NADGÓRSKA-SOCHA, A.; KAFEL, A.; KANDZIORA-CIUPA, M.; GOSPODAREK, J.; ZAWISZA-RASZKA, A. Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Vicia faba* plants grown on monometallic contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 2, p. 1124–1134, 2013.
- NANJO, T.; FUJITA, M.; SEKI, M.; *et al.* Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. **Plant and Cell Physiology**, v. 44, n. 5, p. 541–548, 2003.

NAWAZ, I.; IQBAL, M.; HAKVOORT, H. W. J.; BLIEK, M.; DE BOER, B.; SCHAT, H. Expression levels and promoter activities of candidate salt tolerance genes in halophytic and glycophytic Brassicaceae. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 59–66, 2014.

NEGRÃO, S.; SCHMÖCKEL, S. M.; TESTER, M. (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. **Annals of Botany**, v. 119, n. 1, p. 1–11, 2017.

NOUNJAN, N.; THEERAKULPISUT, P. Effects of exogenous proline and trehalose on physiological responses in rice seedlings during salt-stress and after recovery. **Pant Soli Environment**, v. 2012, n. 7, p. 309–315, 2012.

NOUNJAN, N.; TUAN, P.; 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, n. 6, p. 596–604, 2012.

NOURI, H.; CHAVOSHI, S.; NIROLA, R.; *et al.* Application of green remediation on soil salinity treatment: A review on halophytoremediation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, p. 94–107, 2017. Institution of Chemical Engineers.

OLIVEIRA, A. B.; GOMES-FILHO, E.; ENEAS-FILHO, J. O problema da salinidade na agricultura e as adaptações das plantas ao estresse salino. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 6, n. 11, p. 1-16, 2010.

PANDOLFI, C.; AZZARELLO, E.; MANCUSO, S.; SHABALA, S. Acclimation improves salt stress tolerance in *Zea mays* plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 201, p. 1–8, 2016.

PARK, H. J.; KIM, W.; YUN, D. A New Insight of Salt Stress Signaling in Plant. **Frontiers in Plant Science**, v. 39, n. 6, p. 447–459, 2016.

PARVAIZ, A.; SATYAWATI, S. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants—a review. **Plant Soil Environment**, v. 2008, n. 3, p. 89–99, 2008.

PATERSON, A.H. *et al.* The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. **Nature**, v.457, n.7229, p.551-556, 2009.

PEREIRA, A. Plant Abiotic Stress Challenges from the Changing Environment. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 1123, 2016.

PEDROTTI, A.; CHAGAS, R. M.; RAMOS, V. C.; PRATA, A. P. DO N.; LUCAS, A. A. T.; SANTOS, P. B. dos. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Revista Eletrônica Em Gestão, Educação E Tecnologia Ambiental**, v.19, n. 2, p. 1308–1324, 2015.

PHANG, J. M.; LIU, W.; HANCOCK, C. N.; FISCHER, J. W. Proline metabolism and cancer : emerging links to glutamine and collagen. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, n. 1, p. 71–77, 2015.

PORTAL BRASIL, 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2014/10/dnocs-divulga-novos-dados-sobre-erimetros-irrigados-no-nordeste>>. Acessado em 06/09/2017.

PURCINO, A. A. C. **Sorgo sacarino na Embrapa: histórico, importância e usos.** Agroenergia Em Revista, 6p., 2011.

QAMAR, A.; MYSORE, K. S.; SENTHIL-KUMAR, M. Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. July, p. 1–9, 2015.

QUEIROZ, V. A. V.; MORAES, É. A.; MARTINO, H. S. D.; PAIVA, C. L.; MENEZES, C. B. DE. Potencial do sorgo para uso no alimentação humano. **Informe Agropecuário**, v. 35, n. 278, p. 7–12, 2014. Disponível em:<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/102302/1/Potencial-sorgo.pdf>> Acessado em: 17/08/2017.

RANI, C. R.; REEMA, C.; ALKA, S.; SINGH, P. K. Salt Tolerance of *Sorghum bicolor* Cultivars during Germination and Seedling Growth, **Research Journal of Recent Science**. v. 1, n. 3, p. 1–10, 2012.

RAO, A. Q.; DIN, S.; AKHTAR, S.; *et al.* Genomics of Salinity Tolerance in Plants. INTECH.

RASHEED, R.; ARSLAN, M. *et al.* Exogenous proline and glycinebetaine mitigate cadmium stress in two genetically different spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **Brazilian Journal of Botany**, v. 37, p. 399–406, 2014.

REDDY, P. S.; JOGESWAR, G.; RASINENI, G. K.; *et al.* Plant Physiology and Biochemistry Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and

- antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L .) Moench]. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 94, p. 104–113, 2015.
- REJEB, K.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, 80, 278–284.
- RICHARDS, R.A. (Ed.) **Diagnosis and improvement of saline and alkali soils**. Washington: US Department of Agriculture, Handbook n° 60, 1954. 160p.
- RÖMHELD, V.; KIRKBY, E. A. Research on potassium in agriculture : needs and prospects. **Plant Soil**, v. 335, p. 155–180, 2010.
- ROOSENS, N.H.; AL BITAR, F.; LOENDERS, K.; ANGENON, G.; JACOBS, M. Overexpression of ornithine-delta-aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. **Molecular Breeding**. v. 9, p. 73-80, 2002.
- ROS, R.; MUÑOS-BARTOLOMEU, J.; KRUEGER, S. Serine in plants : biosynthesis , metabolism , and functions. **Cell Press**, v. 19, n. 9, 2014.
- ROTSCH, A. H.; KOPKA, J.; FEUSSNER, I.; ISCHEBECK, T. Central metabolite and sterol profiling divides tobacco male gametophyte development and pollen tube growth into eight metabolic phases. **The Plant Journal**, 1–18, 2017.
- ROY, S. J.; NEGRÃO, S.; TESTER, M. Salt resistant crop plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 115–124, 2014.
- RUIZ, J. M.; GARCI, P. C.; LO, L. R.; *et al.* Proline metabolism and NAD kinase activity in greenbean plants subjected to cold-shock. **Phytochemistry**, v. 59, p. 473–478, 2002.
- 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.
- SCHERTL, P.; CABASSA, C.; SAADALLAH, K.; BORDENAVE, M.; SAVOUR, A. Biochemical characterization of proline dehydrogenase in Arabidopsis mitochondria. **FEBS journal**, v. 281, p. 2794–2804, 2014.

SÉVIN, D. C.; STÄHLIN, J. N.; POLLAK, G. R. Global Metabolic Responses to Salt Stress in Fifteen Species. **PLOS one**, p. 1–21, 2016.

SHAHBAZ, M.; MUSHTAQ, Z.; ANDAZ, F.; MASOOD, A. Scientia Horticulturae Does proline application ameliorate adverse effects of salt stress on growth , ions and photosynthetic ability of eggplant (*Solanum melongena* L.)? **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 507–511, 2013.

SHAHID, M. A.; BALAL, R. M.; PERVEZ, M. A.; *et al.* Exogenous proline and proline-enriched *Lolium perenne* leaf extract protects against phytotoxic effects of nickel and salinity in *Pisum sativum* by altering polyamine metabolism in leaves. **Turkish Journal of Botany**, v. 38, p. 914–926, 2014.

SHABALA, S.; POTTOSIN, I. Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions : implications for abiotic and biotic stress. **Physiologia Plantarum**, v. 151, p. 257–279, 2014.

SHARMA, S. S.; SCHAT, H.; VOOUS, R. In Vitro Alleviation Of Heavy Metal-Induced Enzyme Inhibition By Proline. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1531–1535, 1998.

SHARMA, S.S.; DIETZ, K.J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. **Trends in Plant Science**. v. 14, p. 43-50, 2009.

SHARMA, S.; VERSLUES, P.E. Mechanisms independent of ABA or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. **Plant Cell and Environment**. v. 33, p. 1838-1851, 2010.

SHIRI, M.; RABHI, M.; ABDELLEY, C.; BOUCHEREAU, A.; EL, A. Chemosphere Moderate salinity reduced phenanthrene-induced stress in the halophyte plant model *Thellungiella salsuginea* compared to its glycophyte relative *Arabidopsis thaliana* : Cross talk and metabolite pro fi ling. **Chemosphere**, v. 155, p. 453–462, 2016.

SILVA, C.; SILVA, A. F.; VALE, W. G.; GALON, L.; PETTER, F. A.; MAY, A.; KARAM, D. Interferência das plantas daninhas na cultura do sorgo sacarino. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 4, p.438-445, 2014.

SINGH, A. Soil salinization and waterlogging: A threat to environment and agricultural sustainability. **Ecological Indicators**, v. 57, p. 128–130, 2015.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. V.; ARORA, K. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, v. 53, p. 65–73, 2007.

SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, S.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, p. 407–426, 2015a.

SINGH, M.; PRATAP, V.; DUBEY, G.; MOHAN, S. Ecotoxicology and Environmental Safety Exogenous proline application ameliorates toxic effects of arsenate in *Solanum melongena* L. seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 117, p. 164–173, 2015b.

SLABU, C.; ZÖRB, C.; STEFFENS D.; SCHUBERT, S. Is salt stress of faba bean (*Vicia faba*) caused by Na⁺ or Cl⁻ toxicity? **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 172, p. 644–650, 2009.

SLAMA, I.; REJEB, K. BEN; ROUACHED, A.; *et al.* Presence of proline in salinized nutrient solution re-enforces the role of this amino acid in osmoregulation and protects lipid membrane peroxidation in *Arabidopsis thaliana*. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 10, p. 1367–1372, 2014.

SLAMA, I.; ABDELLY, C.; BOUCHEREAU, A.; FLOWERS, T.; SAVOURE, A. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. **Annals of Botany**, v. 115, n. September, p. 433–447, 2017.

SREESHAN, A.; MEERA, S. P.; AUGUSTINE, A. A review on transporters in salt tolerant mangroves. *Trees*. 4p., 2014.

SRIVASTAVA, A. C.; RAMOS-PARRA, P. A.; BEDAIR, M.; *et al.* The Folylpolyglutamate Synthetase Plastidial Isoform Is Required for Postembryonic Root Development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 155, 1237–1251, 2011.

STEPHAN, A. B.; SCHROEDER, J. I. Plant salt stress status is transmitted systemically via propagating calcium waves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 111, n. 17, p. 6126–6127, 2014.

STRÁNSKÁ J.; KOPECNÝ, D.; TYLICOVA, M. *et al.* An enzyme implicated in salt tolerance in higher plants. **Plant Signaling and Behavior**, v. 3, n. 11, p. 929–935, 2008.

SU, M.; LI, X.; MA, X.; *et al.* Plant Science Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. **Plant Science**, v. 181, p. 652–659, 2011.

SUN, J.; KANG, Y.; WAN, S. Effects of an imbedded gravel–sand layer on reclamation of coastal saline soils under drip irrigation and on plant growth. **Agricultural Water Management**, v. 123, p. 12–19, 2013.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in plant science**, v. 15, n. 2, p. 89–97, 2010.

SZÉKELY, G.; ÁBRAHÁM, E., CSÉPLÖ, Á.; RIGÓ, G.; ZSIGMOND, L.; *et al.* Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **Plant Journal**, v. 53, p.11–28, 2008.

TAVAKKOLI, E.; RENGASAMY, P.; MCDONALD, G. K. High concentrations of Na⁺ and Cl⁻ ions in soil solution have simultaneous detrimental effects on growth of faba bean under salinity stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4449–4459, 2017.

TEAKLE N. L.; TYERMAN, S. D. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 566–589, 2010.

TEIXEIRA, J.; FIDALGO, F. Plant Physiology and Biochemistry Salt stress affects glutamine synthetase activity and mRNA accumulation on potato plants in an organ-dependent manner. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 807–813, 2009.

TEH, C. Y.; MAHMOOD, M.; SHAHARUDDIN, N. A.; HO C. L. In vitro rice shoot apices as simple model to study the effect of NaCl and the potential of exogenous proline and glutathione in mitigating salinity stress. **Plant Growth Regulation**, v. 75, p. 771–781, 2015.

TEH, C. Y.; NOOR, C. T.; SHAHARUDDIN, A.; MAZIAH, C. H. Exogenous proline significantly affects the plant growth and nitrogen assimilation enzymes activities in rice (*Oryza sativa*) under salt stress. **Acta Physiologie Plantarum**, v. 38, n. 151, 10p., 2016.

TESTER, M.; LANGRIDGE, P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. **Science**, v. 327, p. 818–822, 2010.

TURCHETTO-ZOLET, A.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. *Molecular Genetics and Genomics*. v. 281, p. 87–97, 2009.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World Agricultural Production**. 2017. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acessado em: 18/07/2017.

VASCONCELOS, R. R. A. de; BARROS, M. de F. C.; SILVA, Ê. F. de F. e; GRACIANO, E. S. A.; FONTENELE, A. J. P. B.; SILVA, N. M. L. da. Características físicas de solos salino-sódicos do semiárido pernambucano em função de diferentes níveis de gesso. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola E Ambiental**, v. 17, n. 12, p. 1318–1325, 2013.

WAKEEL, A. Potassium–sodium interactions in soil and plant under saline-sodic conditions. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 176, n. 2009, p. 344–354, 2013.

WANG, Y.; WU, W. Plant Sensing and Signaling in Response to K⁺ -Deficiency. **Molecular Plant**, v. 3, n. 2, p. 280–287, 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.

WANG, G., ZHANG, J., WANG, G., FAN, X., SUN, X., QIN, H. *et al.* Proline responding1 plays a critical role in regulating general protein synthesis and the cell cycle in maize. **Plant Cell**. v.26, p. 2582–2600, 2014.

WANG, H.; TANG, X.; WANG, H.; SHAO, H.-B. Proline accumulation and metabolism-related genes expression profiles in *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v.6, article 792, p. 1–9, 2015.

WANI, A. S.; AHMAD, A.; HAYAT, S.; TAHIR, I. Is foliar spray of proline sufficient for mitigation of salt stress in *Brassica juncea* cultivars ? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 13413–13423, 2016.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, n. 1, p. 307-314, 1994.

WESTENGEN, O. T.; OKONGO, M. A.; ONEK, L.; BERG, T.; UPADHYAYA, H.; BIRKELAND, S.; ... BRYSTING, A. K. Ethnolinguistic structuring of sorghum genetic diversity in Africa and the role of local seed systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 39, p. 14100–14105, 2014.

WU, D.; CAI, S.; CHEN, M.; *et al.* Tissue Metabolic Responses to Salt Stress in Wild and Cultivated Barley. **PLOS one**, v. 8, n. 1, 2013.

WU, G. –Q.; FENG, R. –J.; LI, S. –L.; DU, Y. –Y. Exogenous application of proline alleviates salt-induced toxicity in Sainfoin Seedlings. **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 27, n. 1, p. 246–251, 2017.

XIONG, J.; ZHANG, L.; FU, G.; *et al.* Drought-induced proline accumulation is uninvolved with increased nitric oxide, which alleviates drought stress by decreasing transpiration in rice. **Journal of Plant Research**, v. 125, n. 1, p. 155–164, 2012.

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

YAMAOKA, Y.; YU, Y.; MIZOI, J. *et al.* PHOSPHATIDYLSERINE SYNTHASE1 is required for microspore development in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v. 67, p. 648–661, 2011.

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

YOSHIDA, T.; MOGAMI, J.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, 21, 133–139, 2014.

ZAKI, H. E. M.; YOKOI, S. A comparative in vitro study of salt tolerance in cultivated tomato and related wild species. **Plant Biotechnology**, v. 372, p. 361–372, 2016.

ZAREI, S.; EHSANPOUR, A. A.; ABBASPOUR, J. The role of over expression of P5CS gene on proline , catalase , ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic

tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plant under in vitro drought stress, **Journal of Cell and Molecular Research**, v. 4, p. 43–49, 2012.

ZHANG, L.; BECKER, D. F. Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. July, p. 1–8, 2015.

ZHANG, H.; ZHANG, G.; LÜ, X.; ZHOU, D.; HAN, X. Salt tolerance during seed germination and early seedling stages of 12 halophytes. **Plant and Soil**, v. 388, p. 229–241, 2015.

ZHENG, J. L. ZHAO, L. Y.; WU, C.; SHEN, B. ZHU, A. Exogenous proline reduces NaCl-induced damage by mediating ionic and osmotic adjustment and enhancing antioxidant defense in *Eurya emarginata*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 9, p. 1–10, 2015. Springer Berlin Heidelberg.

ZÖRB, C.; SENBAYRAM, M.; PEITER, E. Potassium in agriculture – Status and perspectives. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 9, p. 656–669, 2014.

ZOUARI, M.; ELLOUMI, N.; BEN, C.; *et al.* Exogenous proline enhances growth , mineral uptake , antioxidant defense , and reduces cadmium-induced oxidative damage in young date palm (*Phoenix dactylifera* L.). **Ecological Engineering**, v. 86, p. 202–209, 2016.