

Variação dos níveis de prolina em folhas de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) submetido a diferentes déficits hídricos

Maysa de Lima Leite¹
Jorim Sousa das Virgens Filho²
João Domingos Rodrigues³

¹Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB.
Vitória da Conquista, BA (45100-000). E-mail: Sousalima@convoy.com.br

²Dep. de Engenharia Rural, Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP.
Botucatu, SP (18603-970). E-mail: Sousalima@convoy.com.br

³Dep. de Botânica, Instituto de Biociências, UNESP.
Botucatu, SP (18618-000). E-mail: Rodrigues@laser.com.br

Aceito para publicação em 10/12/99

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito do estresse hídrico sobre o acúmulo de prolina livre em folhas de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cv. EMAPA-821. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em Botucatu, SP, Brasil, com 22°52' latitude sul, 48°26' longitude oeste e 800m altitude. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com sete tratamentos decorrentes da interrupção da irrigação por períodos variáveis em diferentes estádios fenológicos (vegetativo, pré-floração e enchimento de grãos). A matéria seca das folhas foi obtida através de sete coletas periódicas realizadas com intervalos de dez dias e a concentração de prolina livre na folha foi determinada

após cada coleta. À medida que aumentou a duração do período de estresse, houve acúmulo de prolina livre nas folhas. A maior concentração de prolina ocorreu nos tratamentos cuja duração do período de estresse se prolongou por mais tempo, porém após a irrigação as plantas apresentaram decréscimo nos níveis desse aminoácido. Os resultados sugerem que o acúmulo de prolina pode representar um importante mecanismo na manutenção da turgidez das plantas, permitindo-lhes resistir parcialmente a condições de seca durante seu desenvolvimento.

Unitermos: *Vigna unguiculata*, prolina, déficit hídrico.

Summary

The objective of this paper was to verify the accumulation of free proline in leaves of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cv. EMAPA-821, when subjected to water stress. The experiment was conducted under green house conditions in Botucatu, SP, Brasil, 22°52' south latitude, 48°26' west longitude and 800 m of altitude. The experimental design was a randomized block with seven treatments and consisted of suspending irrigation of plants in various developing phases (vegetative, preflowering and grain filling) for a different number of days. Leaves dry matter was taken in seven collects, with a ten-day interval and leaf proline concentration was determined and expressed as mmol/g dry weight. With the development of water deficits, free proline accumulated in the leaves. The greatest increases in proline occurred in those treatments with the longest water deficit periods but after rewatering, the plants exhibited lower levels of this aminoacid. The results suggest that proline accumulation may play an important role in the maintenance of turgor of the plants, which enable them to partially resist drought conditions during their development.

Key words: *Vigna unguiculata*, proline, water deficit.

Introdução

A água é um elemento essencial na agricultura participando, direta e indiretamente, do crescimento das plantas. Embora seja um dos constituintes mais abundantes na natureza, é reconhecidamente um dos fatores que mais restringem o incremento da produtividade das culturas.

Vários estudos vêm sendo realizados no sentido de verificar a ação de determinados compostos como indicadores de diferentes tipos de estresse ambiental, principalmente o hídrico. Dentre estes compostos encontra-se a prolina, que segundo relatos da literatura, é acumulada quando as plantas são submetidas a déficits hídricos.

Assim, Machado et al. (1976) e Jager e Meyer (1977), estudando plantas de feijão, evidenciaram a possível importância ecológica desse fato para a planta, por ser um mecanismo de adaptação para superar períodos curtos de seca. Sendo a prolina um aminoácido altamente hidrófilo, capaz de estabilizar colóides e processos metabólicos no tecido, armazenando carbono, nitrogênio e energia, os citados autores consideraram a possibilidade de plantas com maior habilidade em acumular prolina suportarem maiores déficits hídricos.

Jager e Meyer (1977) observaram que o metabolismo de destruição de prolina formando glutamato fornece energia na forma de compostos redutores, NADH e NADPH. Como o glutamato fornece compostos de carbono para o ciclo de citrato que são metabolizados para CO_2 , os redutores seriam usados para assimilação desse CO_2 por um mecanismo diferente da fotossíntese. Isto possibilitaria o fornecimento de carbono às plantas, considerando-se o fato de que os estômatos e a fotossíntese só se recuperam gradualmente após a reidratação. A alta solubilidade de prolina em água (162,3g/100ml), em relação ao glutamato (0,843g/100ml) e aspartato (0,5g/100ml), confirma sua impor-

tância em vista do fato de que em estresse a prolina pode permanecer em concentrações extremas na célula, na forma solúvel ativa, como C, N e fonte de energia.

Shevyakova (1984) constatou que uma das funções do acúmulo de prolina em plantas estressadas seria proteção e osmoregulação. Este aminoácido possui alta solubilidade em água e além de possuir uma parte hidrofílica, possui também uma parte hidrofóbica. A prolina poderia ligar-se com as superfícies residuais hidrofóbicas da proteína, não interferindo com as interações hidrofóbicas intramoleculares da proteína, evitando neste caso, a sua desnaturação. A prolina agregada à proteína aumentaria a sua solubilidade e a protegeria da desnaturação sob condições de déficit hídrico e salino.

Fumis et al. (1996) observaram que os níveis de prolina aumentaram quando plantas de trigo foram submetidas ao estresse hídrico e no decorrer do desenvolvimento da cultura. Segundo os autores, o aumento deste aminoácido teria promovido um ajustamento osmótico ou auxiliado neste ajustamento, concluindo-se que o aumento de prolina, sob condições de déficits hídricos, poderia ser um indicador de estresse hídrico na cultura do trigo.

Em muitas plantas, a prolina livre se acumula em resposta ao aparecimento de um grande número de formas de estresses bióticos e abióticos como por exemplo déficit hídrico, salinidade, altas e baixas temperaturas, toxicidade a metais pesados, infecção por patógenos, deficiência nutricional, poluição atmosférica e radiação ultra violeta. Entretanto, controvérsias têm envolvido a amplitude na qual alterações no metabolismo do nitrogênio poderiam beneficiar plantas sob condições ambientais adversas. A maioria das tentativas para avaliar o fenômeno têm colocado em evidência a habilidade da prolina de atuar sobre o ajustamento osmótico, estabilizar estruturas subcelulares e a eliminação de radicais livres. Além da forma de prolina livre, pontos de saturação de prolina poderiam apresentar importante atuação, como por

exemplo diminuir a acidificação induzida pelo estresse ou a respiração oxidativa primária fornecendo energia necessária para a sua recuperação (Hare e Cress, 1997).

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é considerado uma espécie altamente resistente à seca, no entanto, assim como a maioria das plantas, apresenta períodos críticos em relação à falta de água, o que pode diminuir consideravelmente seus rendimentos. Face às considerações expostas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as variações nos níveis de prolina como resposta ao estresse hídrico em plantas de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cultivar EMAPA-821, submetidas a diferentes regimes de umidade, em diferentes estádios fenológicos.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com cobertura plástica, na Área Experimental do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu-SP, com coordenadas geográficas de 20°52'latitude sul, 48°26' longitude oeste e 800 metros de altitude, durante o período compreendido entre os meses de setembro de 1997 a janeiro de 1998.

Utilizou-se o cultivar EMAPA-821 de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), cujas sementes foram cedidas pela Empresa Maranhense de Pesquisa Agropecuária (EMAPA).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial do tipo 7 tratamentos x 7 coletas com três repetições, totalizando 147 unidades experimentais utilizadas em coletas periódicas a cada 10 dias. Em cada coleta foram descartados 21 vasos correspondentes a três repetições dos 7 tratamentos utilizados e feita a separação das diversas partes da planta, as quais, posteriormente, foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 60°C por 48 horas. A determinação dos níveis de prolina em intervalos regulares, teve por objetivo verificar se o

efeito do estresse hídrico imposto às plantas, agindo sobre a fenologia da cultura, poderia modificar as quantidades de prolina livre nas folhas. A determinação de prolina foi feita utilizando-se amostras de matéria seca de folhas da planta e calculada em micromol de prolina por grama de matéria seca de folha. Posteriormente, estes resultados foram submetidos à análise de variância (teste F) e comparação de médias (teste Duncan), ao nível de 5% de probabilidade. A diferenciação dos tratamentos teve início 17 dias após a semeadura (DAS) sendo que a primeira coleta de material (C1) foi realizada 25 DAS e a última (C7), 85 DAS.

Os tratamentos consistiram da combinação entre a duração e a época de aplicação do estresse hídrico ao longo do ciclo da cultura, conforme indicado a seguir:

Tratamento 1: Estresse hídrico na fase vegetativa (a partir de V_3), com duração de 23 dias (17 – 40 DAS).

Tratamento 2: Estresse hídrico na fase reprodutiva (R_5), com duração de 20 dias (38 – 58 DAS).

Tratamento 3: Estresse hídrico na fase reprodutiva (R_8), até a maturação fisiológica (68 – 78 DAS).

Tratamento 4: Estresse hídrico na fase vegetativa (à partir de V_3), com duração de 23 dias (17 – 40 DAS) e na fase reprodutiva (R_8) até a maturação fisiológica (84 – 93 DAS).

Tratamento 5: Estresse hídrico na fase reprodutiva (R_5), com duração de 28 dias (38 – 66 DAS).

Tratamento 6: Estresse hídrico na fase vegetativa (à partir de V_3), com duração de 37 dias (17 – 54 DAS).

Tratamento 7: Irrigado durante todo o ciclo (testemunha).

De acordo com a descrição anterior, as plantas de cada tratamento tinham sua irrigação interrompida nos estádios fenológicos pré-determinados, sendo que a intensidade do estresse era definida pela duração dos mesmos. Para o acompanhamento da fenologia da

cultura e a aplicação do estresse hídrico nos estádios fenológicos desejados, foram feitas observações de fenologia diariamente, conforme pode ser verificado em Leite et al. (1999). Após o final do período de estresse, as plantas voltavam a receber água normalmente até atingirem capacidade de campo (-10 Kpa).

Para a determinação de prolina, foi utilizado o método de Bates et al. (1973) modificado por Torello e Rice (1986). Foram utilizadas 40mg de material seco das folhas, homogeneizado em 10 ml de ácido sulfosalicílico a 3% e, após agitação por 60 minutos, o extrato foi filtrado através de papel de filtro Whatman no. 2. Do extrato foi retirada uma alíquota de 2 ml ao qual foram adicionados 2 ml de uma solução de ninhidrina ácida e 2 ml de ácido acético glacial. O material foi colocado em banho-maria em ebulição por 60 minutos e em seguida resfriado em banho de gelo. A leitura foi realizada a 520 nm em fotocolorímetro, contra um branco, onde o volume da amostra foi substituído por ácido sulfosalicílico a 3%. O valor da absorbância foi comparado com uma curva padrão de prolina. Os resultados foram expressos em micromoles de prolina por grama de material seco de folhas.

Resultados

A tabela 1 revela que na coleta II (35 DAS), quando todos os tratamentos se encontravam com a terceira folha trifoliada completamente expandida, os maiores níveis de prolina ocorreram nos tratamentos T1 e T6, seguidos pelo tratamento T4. Nesta data, estes três tratamentos se encontravam igualmente estressados pelo mesmo período. Os tratamentos T2, T3 e T5 não diferiram estatisticamente entre si, e nem em relação ao tratamento T7 (testemunha).

Na coleta III (45 DAS), os níveis de prolina mais elevados ocorreram nos tratamentos T1 e T4 (fase vegetativa), os quais já estavam sendo irrigados, porém mantinham elevados valores de

prolina como resposta ao período de estresse hídrico anterior. O tratamento T6 praticamente manteve-se inalterado em relação à coleta anterior e não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos T4 e T5. Nesta coleta, os tratamentos T2 e T5, os quais já se encontravam na fase reprodutiva, demonstraram aumentos dos níveis de prolina em relação à coleta anterior, evidenciando o efeito do estresse hídrico sobre o acúmulo de prolina na folha. Os tratamentos T2 e T3 não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à testemunha.

TABELA 1 – Resultados obtidos para níveis de prolina (mmol/gMS) de folhas do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cv EMAPA-821, submetidas a déficits hídricos de diferentes intensidades, em diferentes estádios de desenvolvimento, através do teste de Duncan, ao nível de 5% de probabilidade.

Trat.	Coletas						
	C1 (25DAS)	C2 (35DAS)	C3 (45DAS)	C4 (55DAS)	C5 (65DAS)	C6 (75DAS)	C7 (85DAS)
T1	27,69A	39,88A	57,86A	24,70C	27,72B	27,80A	20,23A
T2	20,07A	16,49BC	26,50C	69,96A	44,80B	33,71A	29,32A
T3	24,61A	19,10BC	26,69C	30,14C	30,01B	33,35A	18,58A
T4	30,62A	30,76B	47,01AB	28,78C	34,54B	17,97A	33,17A
T5	26,47A	15,77BC	35,65BC	49,04B	67,85A	27,31A	32,41A
T6	25,12A	33,80AB	33,78BC	72,90A	41,56B	27,48A	18,96A
T7	21,94A	11,53C	24,77C	26,21C	33,55B	28,54A	24,00A

Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente.
Letras maiúsculas = vertical

Na coleta IV (55DAS), os tratamentos T6 (fase vegetativa) e T2 (fase reprodutiva) apresentaram os maiores níveis de prolina ainda como resposta ao estresse hídrico ao qual esteve submetido o

tratamento T6 anteriormente e ao prosseguimento do estresse fornecido ao tratamento T2, logo após a terceira coleta, não diferindo significativamente entre si. Em seguida, o tratamento T5 apresentou elevado nível de prolina em resposta à continuidade da condição de estresse, enquanto os tratamentos T1 e T4 mostraram diminuição dos níveis de prolina, não apresentando diferenças significativas entre si e nem em relação aos tratamentos T3 e T7.

Na coleta V (65 DAS), o maior nível de prolina foi observado no tratamento T5, o qual ainda era mantido sem reposição de água, não havendo significância estatística entre os demais tratamentos, mesmo em relação aos tratamentos T2 e T6 os quais ainda se mantinham um pouco altos, porém mostravam decréscimo dos níveis de prolina pela interrupção do estresse hídrico.

Quanto às coletas VI e VII, a tendência geral foi haver uma diminuição dos níveis de prolina em consequência do fornecimento de água às plantas submetidas ao estresse, não havendo diferenças significativas entre os mesmos.

Observa-se ainda que, mesmo não tendo apresentado diferença estatisticamente significativa, na coleta VII, o tratamento T4 mostrou elevação do nível de prolina em resposta ao novo período de estresse ao qual foi submetido no estágio de enchimento de grãos.

Discussão

De um modo geral, foi observado aumento dos níveis de prolina na folha quando as plantas foram submetidas ao estresse hídrico, o qual se acentuou com o aumento da duração do período de estresse. Por outro lado, esses níveis diminuíram rapidamente à medida que o fornecimento de água foi restabelecido, conforme pode ser observado pelos resultados dos tratamentos T2, cujo estresse hídrico foi interrompido aos 58 DAS e T5, aos 66 DAS, ambos na fase reprodutiva. Os tratamentos T1, T4 e

T6, todos na fase vegetativa, mantiveram níveis mais elevados de prolina por um período mais prolongado, mesmo após o final do estresse hídrico (40 e 54 DAS, respectivamente). Esses resultados indicam que a elevação dos níveis de prolina estaria diretamente relacionada à duração e intensidade do estresse hídrico porém, o estágio fenológico da planta poderia estar afetando de alguma forma estas respostas.

Os resultados obtidos concordam com os da literatura, que relatam acúmulo de prolina nas folhas de plantas submetidas ao estresse hídrico. Este aumento poderia ser devido a uma regulação osmótica e proteção da integridade celular (Stewart e Lee, 1974), constituição de um estoque de nitrogênio e carbono, para ser utilizado depois do período de estresse (Machado et al., 1976; Jager e Meyer, 1977), aumento da atividade das enzimas envolvidas na síntese deste aminoácido (Jager e Meyer, 1977) ou ainda, à inibição da oxidação da prolina (Stewart et al., 1977), sugerindo que o aumento observado, principalmente em cereais, durante o estresse hídrico poderia ser considerado um mecanismo de adaptação das plantas às condições adversas ocorridas.

McMichael e Elmore (1977) verificaram que plantas de algodão, crescendo em casa de vegetação, submetidas a estresse hídrico, apresentaram cerca de 100 vezes mais prolina livre do que as plantas não estressadas. Os autores também notaram aumento no conteúdo de prolina total, sugerindo que houve alguma síntese de prolina. Barker et al. (1993) avaliaram respostas fisiológicas de gramíneas forrageiras ao déficit hídrico, buscando respostas quanto a resistência à seca e encontraram concentrações médias de prolina na folha, vinte vezes maior nas plantas estressadas quando comparadas às plantas irrigadas, cultivadas em casa de vegetação.

Os resultados encontrados no presente experimento para folhas de plantas do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cultivar EMAPA-821, mostraram aumentos bastante significativos dos

níveis de prolina livre na folha acumulados nos diversos tratamentos em relação à testemunha, chegando a apresentar valores aproximadamente três vezes maiores em relação à mesma, conforme observado para os tratamentos T2 e T6 na coleta IV.

Especificamente para o caupi, Turk e Hall (1980) relataram que esta espécie apresenta uma capacidade de escape ao déficit hídrico durante todo o ciclo e que o mecanismo de resistência à seca resulta num decréscimo do fluxo de absorção de água quando o solo começa a secar. Independentemente da época e da demanda atmosférica, durante a época de crescimento, o potencial hídrico das folhas não cai além de -1,5 MPa (Clark e Hiller 1973; Turk e Hall 1980). Esta flexibilidade limitada de potencial hídrico parece ser principalmente devida aos mecanismos controladores do fluxo de transpiração, tais como redução da taxa de crescimento foliar e aumento da taxa de abscisão de folíolos (Turk et al., 1980; Leite, 1999) e orientação dos folíolos de modo a reduzir a taxa de absorção de radiação solar (Shackel e Hall, 1979). Shouse (1979) também concorda que o caupi evita o estresse hídrico pela sua capacidade de manter alto potencial hídrico interno. No entanto, existe uma variabilidade genética quanto à resistência das plantas a estas condições hídricas.

Considerando-se os diversos resultados obtidos por esses autores no que se refere ao comportamento desta espécie em presença de déficits hídricos, diversas causas podem ter contribuído para as variações nos níveis de prolina desta espécie, ocasionando as respostas observadas. Por outro lado, a elevada capacidade de recuperação das plantas após os períodos de estresse, deixa transparecer a alta capacidade de resistência à seca exibida pela cultura, a qual poderá estar ligada às variações observadas nos níveis de prolina na folha dos diversos tratamentos.

Esta poderá vir a se constituir uma característica adaptativa desejável a ser incorporada em cultivares comerciais, conferindo à espécie condições necessárias para recuperação após períodos

prolongados de estiagem. No entanto torna-se necessária uma pesquisa mais ampla entre cultivares com diferentes resistências à seca para que se possa concluir sobre um comportamento próprio desta espécie.

Referências Bibliográficas

- Barker, D.J.; Sullivan, C.Y.; Moser, L.E. 1993. Water deficit effects on osmotic potential, cell wall elasticity, and proline in five forage grasses. *Agron. J.*, **85**: 270-275.
- Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, **39**: 205-207.
- Clark, R.N.; Hiler, E.A. 1973. Plant measurements as indicators of crop water deficit. *Crop Sci.*, **13**: 466-469.
- Fumis, T.E. 1996. **Variação nos teores de prolina e poliaminas em cultivares de trigo (*Triticum aestivum* L.) submetidos a déficits hídricos**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, 121 pp.
- Hare, P.D.; Cress, W.A. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Reg.*, **21**: 79-102.
- Jager, H.J.; Meyer, H.R. 1977. Effect of water stress on growth and proline metabolism of *Phaseolus vulgaris* L. *Oecologia*, **30**: 83-96.
- Leite, M. de L. 1999. **Fenologia, análise de crescimento e produção da cultura do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cultivar EMAPA-821, submetida a diferentes déficits hídricos**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil, 106 pp.
- Leite, M. de L.; Rodrigues, J. D.; Catâneo, A.; Virgens Filho, J. S. 1999. Efeitos do déficit hídrico sobre a cultura do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), cultivar EMAPA-821. 1 -

- Fitologia. **Revista de Agricultura**, 74 (2) : 191-200.
- Machado, R.C.R.; Rena, A.B., Vieira, C. 1976. The effect of osmotic dehydration on the accumulation of free proline in leaf discs of 20 bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) **Rev. Ceres**, 23: 308-309.
- McMichael, B.L.; Elmore, C.D. 1977. Proline accumulation in water stressed cotton leaves. **Crop Sci.**, 17: 905-908.
- Shackel, K.A.; Hall, A.E. 1979. Reversible leaflet movements in relation to drought adaptation of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Aust. J. Plant Physiol.**, 6: 265-276.
- Shevyakova, N.I. 1984. Metabolism and the physiological role of proline in plants under conditions of water and salt stress. **Soviet Plant Physiol.**, 30: 597-608.
- Shouse, P.; Dasberg, S.; Jury, W.A.; Stolzy, L.W. 1981. Water deficit effects on water potential, yield, and water use of cowpeas. **Agron. J.**, 73: 333-336.
- Stewart, G.R.; Lee, J.A. 1974. The role of proline accumulation in halophytes. **Planta**, 120: 279-289.
- Stewart, C.R.; Boggess, S.E.; Aspinall, D. 1977. Inhibition of proline oxidation by water stress. **Plant Physiol.**, 59: 930-932.
- Torcello, W.A.; Rice, L. A. 1986. Effects of NaCl stress on proline and cation accumulation in salt sensitive tolerant turfgrass. **Plant Soil**, 93: 241-247.
- Türk, K.J.; Hall, A.E. 1980. Drought adaptation of cowpea. II. Influence of drought on plant water status and relations with seed yield. **Agron. J.**, 72: 421-427.
- Türk, K.J.; Hall, A.E.; Asbell, C.W. 1980. Drought adaptation of cowpea. I. Influence of drought on seed yield. **Agron. J.**, 72: 413-420.