



## VARIAÇÃO DO TEOR DE PROLINA EM FOLHAS DE FEIJÃO EM FUNÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE ÁGUA NO SOLO (1)

HAIKO ENOK SAWAZAKI (2), JOÃO PAULO FEIJÃO TEIXEIRA, *Seção de Fitoquímica*, e LUIZ D'ARTAGNAN DE ALMEIDA (3), *Seção de Leguminosas, Instituto Agronômico*

### RESUMO

Para verificar o comportamento de cultivares e linhagens de feijão quanto à capacidade de acumular prolina livre em suas folhas em condições de escassez de água no solo, foram utilizados dezoito cultivares e duas linhagens de feijão, desenvolvidos em casa de vegetação. Desse material, foram amostradas folhas primárias, de acordo com os tratamentos: a) irrigado diariamente; b) onze e quinze dias sem irrigação; e c) plantas reidratadas após onze dias sem irrigação, com o objetivo de avaliar o teor de prolina. Os resultados obtidos mostraram diferenças no teor de prolina e na capacidade de acúmulo desse aminoácido em função de cultivares e tratamentos. 'Jalo', 'Roseli' e 'Roxão Lustroso' acumularam maiores quantidades de prolina ( $> 7$  micromoles/grama de matéria seca), enquanto 'Moruna' e 'Curitibano-Bairro das Palmeiras' mostraram os menores acúmulos ( $< 3$  micromoles/grama de matéria seca), após quinze dias de ausência de irrigação. As plantas reidratadas após onze dias sem irrigação mostraram teores de prolina semelhantes aos de plantas irrigadas diariamente. Fez-se uma classificação dos materiais estudados em função da capacidade de acumular prolina livre em suas folhas.

### 1. INTRODUÇÃO

Na resistência total a seca em vegetais, interagem, segundo LEVITT (7), os fatores de escape e tolerância, sendo o escape relacionado à perda de água pelos estômatos, pela cutícula etc., e a tolerância, aos fatores de conservação da vida das células, tais como prevenção ou reparos da dena-

turação e agregação de proteínas específicas. Em termos de equação, a resistência à seca é dada como:

$$- \psi e 50 = - \psi p50 \times \frac{\psi e 50}{\psi p 50},$$

sendo

$$- \psi e 50 = \text{resistência à seca} = \text{estresse de água para produzir 50\% de morte};$$

(1) Recebido para publicação a 11 de junho de 1980.

(2) Com bolsa de aperfeiçoamento do CNPq.

(3) Com bolsa de pesquisa do CNPq.

—  $\psi$  p 50 = tolerância;

$\psi$  e 50

— = escape

$\psi$  p 50

A dificuldade de obtenção dos parâmetros de potencial da água ( $\psi$ ) conduz ao estudo de uma metodologia mais fácil e rápida de reconhecimento do fator ecológico de resistência à seca, como parâmetro para fins de melhoramento genético.

O acúmulo de prolina, quando as plantas entram em **deficit** de água, tem sido relatado e estudado desde 1954, por vários autores.

SINGH et alii (11), em estudo com cevada, mostraram que o acúmulo de prolina foi mais rápido na lâmina foliar e mais lento nas raízes, sendo que os pecíolos e ápice dos ramos se comportaram de maneira intermediária.

SINGH et alii (12), submetendo plantas de cevada a estresse de água, na ausência ou não de luz, mostraram que o aumento de prolina foi maior nos tecidos de plantas crescendo à luz. Todavia, quando adicionaram precursores de prolina, tais como ácido glutâmico e carboidratos, aos tecidos de folha sujeita a desidratação, a presença de luz não alterou a taxa de acúmulo de prolina quando comparada com o tratamento sem luz.

BRANDLE et alii (13), estudando plantas de alfarrobeira submetidas a estresse de água, admitiram que o decréscimo do conteúdo protéico observado fosse decorrente da diminuição da síntese protéica, ou aumento na hidrólise protéica, ou uma combinação de ambos, e que sistemas de enzimas associados com o metabolismo de manutenção podem proporcionar maior resistência à seca.

RAJAGOPAL et alii (9) relacionaram o acúmulo de prolina em folhas de trigo, sob estresse de água, como a primeira resposta rápida para manutenção da pressão osmótica das células e tecidos, pois em plantas que sofreram estresse, o maior acúmulo ocorreu entre as 12 e as 15 horas, ao passo que naquelas não submetidas a estresse a maior quantidade foi acumulada durante o período noturno. Sugeriram então, que, com o estresse, os estômatos se fecham, não há fotossíntese, diminuindo o  $\psi$  devido à não síntese de produtos solúveis e subsequente diminuição da oxidação de prolina.

STEWART (13), estudando o comportamento da prolina adicionada a folhas de feijão, submetidas a estresse de água, em ausência de luz, encontrou que tanto nas folhas murchas como nas não murchas, a desidratação causa o acúmulo de prolina. O acúmulo de prolina não protéica decorre do metabolismo de prolina, cuja oxidação é inibida em folhas com alto conteúdo de carboidratos e cuja síntese, através de precursores, não é sensível à inibição de "feed back" e dos efeitos de desidratação, pois ocorre o decréscimo da síntese protéica e o aumento da formação de prolina.

ARCAY & RENA (1) estudaram a influência de ácido abscísico (AAB), ácido giberélico (GA3), cloreto de 2-cloroetiltrimetilamônio (CCC), íon potássio ( $K^+$ ), benzaldenina (BA), pH e idade da folha, sobre o teor da prolina em discos foliares de feijoeiros submetidos durante duas a quarenta horas a diferentes valores de desidratação. Somente BA não contribuiu para o aumento de prolina. O acúmulo foi máximo no pH 7,1 e decresceu

rapidamente com a diminuição ou aumento do pH. A capacidade de acúmulo e a concentração decresceram constantemente com a idade da folha de 5 a 25 dias, o que sugere a hipótese de que altas concentrações de prolina livre caracterizam células em crescimento ativo.

Segundo BENGTON et alii (2), em estudo sobre o acúmulo de prolina em folhas de trigo, os caminhos biossintéticos da prolina e ácido aminolevulínico (ALA) são ligados pelo  $\alpha$ -cetoglutarato, e isso poderia significar que quando as condições de estresse inibem o metabolismo para ALA, isso favorece o acúmulo de prolina. O ALA, por sua vez, afeta a regeneração da protoclórofila (precursora da clorofila), o que explica o menor acúmulo de clorofila durante estresse de água. Os autores sugerem que a prolina acumulada seja utilizada para a biossíntese de clorofila imediatamente após a reidratação, além da utilização para outros caminhos metabólicos e síntese de proteína.

HANSON et alii (4), estudando dois cultivares de cevada, mostraram que em ambos a prolina livre é acumulada no tecido foliar quando o  $\psi$  da folha cai, e alcança a concentração mais alta quanto maior a área de tecido morto. Na presença de água, o nível de prolina declinou no tecido viável, mas permaneceu alto nas zonas mortas. O acúmulo de prolina parece decorrer do estado interno de água das folhas, pois as que mais rapidamente apresentam sintomas de dessecação são as que acumulam prolina também mais rapidamente. Uma simples correlação positiva entre potencial de acúmulo de prolina e resistência à seca pode, portanto, não ser verdadeira, visto que o

potencial de acúmulo de prolina resulta da suscetibilidade ao estresse de água.

JAGER & MEYER (6), em estudo com feijão, encontraram 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<sub>2</sub>, os redutores seriam usados para assimilação desse CO<sub>2</sub> 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 espartato (0,5g/100ml), confirma sua importância 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.

HANSON et alii (5) discutem o acúmulo de prolina como adaptação metabólica que confere valor de sobrevivência. Essa possibilidade não pode ser avaliada sem saber quanto de N é exportado das folhas com estresse a outras partes da planta, e se o acúmulo de prolina e exportação são significativos na reserva total de N de uma folha durante o estresse. Esses autores, trabalhando com a mobilização do N em folhas de cevada que sofreram estresse, avaliaram a possível contribuição da prolina na translocação do N: ela só aumentou rapidamente após intensa diminuição na translocação. Apesar de a prolina acumulada com o estresse ser a princi-

pal forma de N solúvel, quantitativamente não pareceu uma reserva importante de N dentro da folha e não foi, também, a principal forma de N translocado durante o estresse.

O objetivo deste trabalho foi verificar o comportamento em cultivares e linhagens de feijão em relação ao acúmulo de prolina nas folhas, quando se alterou a disponibilidade de água no solo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para verificação do acúmulo de prolina em folhas primárias de plantas sujeitas a um estresse de água, foi feita uma seleção inicial entre os dezoito cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e as duas linhagens (LC) abaixo:

Grupo 'Rosinha' — Rosinha G<sub>2</sub>, Rosinha G<sub>2</sub>/69, Curitibaano — Bairro das Palmeiras.

Grupo 'Bico de Ouro' — Bico de Ouro, Aeté 1/38, Aeté 1/40.

Grupo 'Mulatinho' — Piratã, Mulatinho Simétrico.

Grupo 'Preto' — Moruna, Rico 23.

Grupo 'Chumbinho' — Aroana, Regente.

Grupo 'Manteiga' — Jalo, Goiano Precoce, Roseli.

Grupo 'Roxo' — Roxinho, Roxão Lustroso.

Grupo 'Carioca' — Carioca, LC7008, LC710.

O plantio foi efetuado em casa de vegetação com duas plantas por vaso. O recipiente plástico continha mistura de 12 kg de composto terriço com adubação de fósforo e potássio.

O ensaio constou de quatro repetições por variedade e por tratamento.

O estresse teve início no 23.º dia após o plantio, suspendendo-se a irrigação. Coletaram-se amostras de plantas após onze dias e após quinze dias de estresse, de testemunhas e de plantas com quatro dias de reidratação após um estresse de onze dias. Retiraram-se duas amostras por planta, correspondendo cada amostra a dois discos de folhas primárias de 1,7cm de diâmetro, imersas rapidamente em solução de metanol-clorofórmio-água (MCW), na proporção em volume 12:5:1, para máxima redução dos processos metabólicos, e mantidas a -5°C. A quantidade de prolina foi calculada em micromol de prolina por grama de matéria seca de folha. A determinação de prolina foi feita pelo método de TROLL & LINDSLEY (14) modificado por RENA & MASCIOTTI (10), o qual utiliza reação do aminoácido com solução ácida de ninhidrina e determinação fotométrica a 515 nm.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variação de concentração de prolina livre em discos de folhas de dezoito cultivares e duas linhagens de feijão em função da disponibilidade de água no solo é apresentada no quadro 1. Pode-se verificar pelos dados relativos a plantas irrigadas que houve acúmulo de prolina livre em função de cultivares.

O mesmo foi observado por MACHADO et alii (8), estudando outros cultivares. Neste estudo 'Mulatinho Simétrico', 'Roseli', 'Carioca', 'Rosinha G<sub>2</sub>', 'Rosinha G<sub>2</sub>/69' e 'Jalo' foram os que apresentaram os maiores teores de prolina, acima de

0,60 micromol por grama de matéria seca. Os dados de acúmulo de prolina livre em folhas de plantas que ficaram onze dias sem irrigação mostram que, em todos os cultivares, houve aumento da concentração desse aminoácido. Esse acúmulo, porém, ocorreu em taxas diferentes em função dos cultivares, provocando maior distinção entre

si. Tais dados mostram que o acúmulo de prolina livre influenciado pela escassez de água disponível às plantas não depende da concentração inicial desse aminoácido nas folhas de plantas de feijão.

Os cultivares Roseli, Jalo e Roxão Lustroso apresentaram concen-

QUADRO 1 — Concentração ( $\mu\text{mol/g}$  de matéria seca) em folhas de cultivares e linhagens de feijão em função da disponibilidade de água no solo

Cultivar	Tratamentos					
	P.T.	P.R.	Média	P.E.		Média
				11 dias	15 dias	
Roseli	0,76	1,68	1,22	5,58	10,91	8,25
Jalo	0,62	1,00	0,81	5,48	10,90	8,19
Roxão Lustroso	0,54	2,03	1,29	5,14	7,01	6,08
Rosinha G <sub>2</sub>	0,71	0,83	0,77	4,78	6,32	5,55
Bico de Ouro	0,42	0,91	0,67	4,60	6,12	5,36
Carioca	0,70	0,94	0,82	4,78	6,10	5,44
Mulatinho Simétrico	0,84	0,84	0,84	4,76	5,91	5,34
Regente	0,43	0,77	0,60	4,58	5,90	5,24
Rico 23	0,44	0,60	0,52	2,60	6,06	4,33
Aeté 1/40	0,40	0,50	0,45	2,58	6,04	4,31
Roxinho	0,50	0,84	0,67	2,80	5,70	4,25
Piratã	0,50	0,81	0,66	2,51	5,43	3,97
Rosinha G <sub>2</sub> /69	0,64	0,74	0,69	3,46	5,42	4,44
Aeté 1/38	0,48	0,66	0,57	2,45	4,66	3,56
Aroana	0,41	0,45	0,43	2,40	3,65	3,03
Goiano Precoce	0,46	0,66	0,56	3,01	3,32	3,17
LC 7008 (Linhagem)	0,41	0,51	0,46	2,39	3,29	2,84
LC 7010 (Linhagem)	0,40	0,52	0,46	2,36	3,16	2,76
Moruna	0,45	0,56	0,51	2,03	2,50	2,27
Curitibano — Bairro das Palmeiras	0,48	0,56	0,52	1,74	2,43	2,09
F (5%)			1,82			2,40
D.M.S. (Duncan 5%)			—			3,84

P.T. = planta testemunha; P.R. = planta reidratada; P.E. = planta estressada.

tação superior a 5 micromoles de prolina por grama de matéria seca e o 'Curitibano' apresentou a menor concentração, 1,7 micromol de prolina por grama de matéria seca.

Ainda no quadro 1 e pela figura 1, pode-se observar que as plantas mantidas por quinze dias sem irrigação continuaram acumulando prolina livre em suas folhas.

Os cultivares Roseli e Jalo foram os que apresentaram as maiores concentrações, 10,90 micromoles de prolina por grama de matéria seca, seguidos de Roxão Lustroso e Rosinha G<sub>2</sub>, respectivamente com 7,01 e 6,32 micromoles de prolina por grama de matéria seca. Os cultivares Roseli e Jalo, tanto com onze como com quinze dias sem irrigação, foram sempre os que mais acumularam esse composto em suas folhas. 'Curitibano' e 'Moruna' apresentaram, após quinze dias de ausência de irrigação, as menores concentrações, em torno de 2,40 micromoles de prolina por grama de matéria seca. 'Moruna' e 'Curitibano', nas duas amostragens realizadas, onze e quinze dias, apresentaram as menores capacidades de acúmulo desse aminoácido em sua folhas.

'Goiano Precoce' foi o que menos acumulou prolina livre, ao comparar as concentrações obtidas após onze e quinze dias de falta de água. Esse fato pode ser atribuído ao menor ciclo desse cultivar, que floresceu durante os onze dias iniciais de estresse.

Os tratamentos sem irrigação durante quinze dias, embora tenham provocado alguns sintomas nas folhas das plantas, não provocaram danos irreversíveis.

A capacidade de acumular prolina, observada durante a falta de

água, tem sido associada com a tolerância das plantas a essa condição desfavorável. Assim, JAGER & MEYER (7), estudando plantas de feijão, evidenciaram a possível importância ecológica para a planta por ser um mecanismo de adaptação para superar períodos curtos de seca.

MACHADO et alii (8), estudando plantas de feijão, consideraram a possibilidade de plantas com maior habilidade para acumular prolina reagirem a déficits hídricos, por ser a prolina um aminoácido altamente hidrófilo, capaz de estabilizar colóides e processos metabólicos no tecido, armazenando carbono, nitrogênio e energia.

Baseando-se nos trabalhos citados (7, 8), os materiais foram reunidos em três classes segundo a capacidade de acumular prolina livre nas folhas, como critério para estabelecer tolerância à seca.

O quadro 2 apresenta a classificação dos materiais estudados em função da capacidade de acumular prolina livre em suas folhas, baseada na média após a suspensão de irrigação por quinze dias.

Utilizaram-se os dados de acúmulo desse aminoácido após quinze dias de ausência de água, porque nessa amostragem verificaram-se sintomas mais intensos devido ao tratamento, além de os dados de acúmulo serem os maiores encontrados.

Por essa classificação, apresentada no quadro 2, poder-se-ia afirmar que os materiais com maior capacidade de acumular prolina livre em suas folhas, 'Roseli' e 'Jalo', são os mais tolerantes à falta de água no solo, ao contrário de 'Rosinha G<sub>2</sub>/69', 'Rico 23', 'Aeté 1/38', 'Aeté 1/40', 'Roxi-

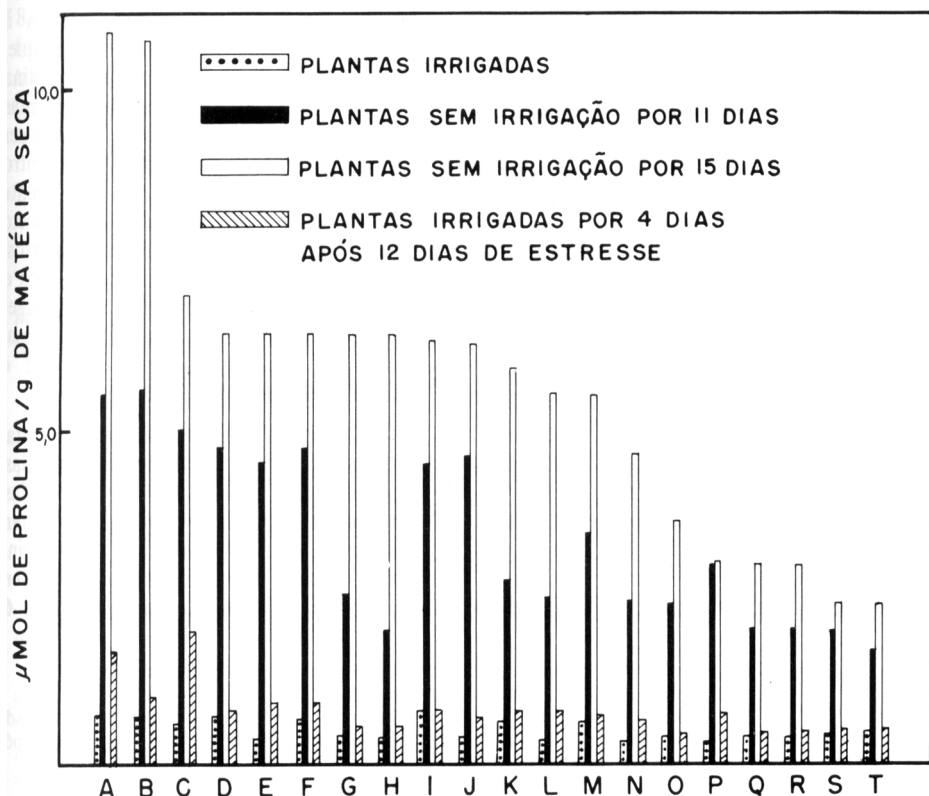


Figura 1. — Variação da concentração de prolina em folhas de vinte cultivares de feijão em função da disponibilidade de água

- A. Roseli
- B. Jalo
- C. Roxão Lustroso
- D. Rosinha G<sub>3</sub>
- E. Bico de Ouro
- F. Carioca
- G. Rico 23
- H. Aeté 1/40
- I. Mulatinho Simétrico
- J. Regente

- K. Roxinho
- L. Piratã
- M. Rosinha G<sub>2</sub>/69
- N. Aeté 1/38
- O. Aroana
- P. Goiano Precoce
- Q. LC7008
- R. LC7010
- S. Moruna
- T. Curitibaano

nho', 'Aroana', 'Piratã', 'Goiano Precoce', LC7008, LC7010, 'Moruna' e 'Curitibano', que seriam os mais suscetíveis a essa condição desfavorável.

Há necessidade, porém, de medir outros parâmetros, como crescimento, área foliar e produção, para que se possa verificar a validade das afirmativas de JAGER & MEYER (6) e MACHADO et alii (8), que relatam a possibilidade de usar o teor desse aminoácido como parâmetro estimativo da tolerância à seca. HANSON et alii (4, 5) revelam que o acúmulo de prolina em plantas de cevada pode ser apenas sintoma do efeito deletério provocado pela falta de água: portanto, não seria o acúmulo de prolina um mecanismo de adaptação, não podendo, dessa forma, ser usado como

parâmetro para definir tolerância à seca. Esses autores encontraram que, com quatro dias de estresse, a prolina é a principal forma de N solúvel, mas quantitativamente ela não parece ser uma reserva de N importante dentro da folha com estresse, especialmente porque a maior parte desse composto se localiza dentro dos tecidos mortos, o que impede a sua utilização após o término do estresse. Além disso, sugerem que a prolina não seja a principal forma de N translocada durante o período de estresse.

Neste trabalho, plantas que estavam sem irrigação durante onze dias, receberam água por quatro dias, quando foram amostradas para determinação da concentração de prolina nas folhas. A semelhança do observado por vários autores (1, 2, 5, 6,

QUADRO 2 — Classificação de linhagens e cultivares de feijão quanto à capacidade de acumular prolina livre em suas folhas, baseada em dados obtidos na média após a suspensão da irrigação por quinze dias

Capacidade de acumular prolina livre		
Alta	Média	Baixa
'Roseli' a (1)	'Roxão Lustroso' ab	'Rosinha G <sub>2</sub> /69' bc
'Jalo' a	'Rosinha G <sub>2</sub> abc	'Rico 23' bc
	'Bico de Ouro' abc	'Aeté 1/40' bc
	'Carioca' abc	'Roxinho' bc
	'Mulatinho Simétrico' abc	'Piratã' bc
	'Regente' abc	'Aeté 1/38' bc
		'Aroana' bc
		'Goiano Precoce' bc
		LC 7008 bc
		LC 7010 bc
		'Curitibano' - Bairro das Palmeiras c

(1) Letras comuns indicam que não há diferenças significativas pelo teste de Duncan 5%.



8, 10) os valores desse aminoácido nas folhas de plantas reidratadas se mostram muito próximos das concentrações encontradas em plantas irrigadas, conforme quadro 1 e figura 1.

#### 4. CONCLUSÕES

a) Os dezoito cultivares e duas linhagens de feijão estudados apresentaram concentrações diferentes de pro-

lina em condições normais de irrigação, e acumularam, também, em taxas variadas quando houve falta de água, metabolizando rapidamente esse aminoácido tão logo foram reidratados.

b) Para verificar a validade do uso da concentração de prolina como parâmetro para medir tolerância à seca, serão necessários outros estudos associados à capacidade de acúmulo de prolina com análise de crescimento e produção de plantas de feijão.

#### CHANGES IN PROLINE CONTENT IN LEAVES OF PHASEOLUS VULGARIS L. IN RESPONSE TO WATER STRESS

##### SUMMARY

The objective of this paper was to verify the accumulation of free proline in leaves of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) when subjected to water stress.

Leaves samples were taken at 11 and 15 days after starting the water stress and 4 days after irrigation to estimate the proline accumulation.

The results obtained showed differences among bean cultivars in the proline content and the capacity for accumulation of this aminoacid under 15 days of water stress.

'Jalo', 'Roseli', and 'Roxão Lustroso' were cultivars with the highest proline accumulation ( $> 7 \mu\text{mol/g DW}$ ) whereas 'Moruna' and 'Curitibano — Bairro das Palmeiras' were cultivars with the lowest proline content ( $< 3 \mu\text{mol/g DW}$ ), after 15 days of water stress.

The addition of water after 11 days of water stress showed proline content similar to the irrigated plants.

The materials studied were classified as a function of their capacity for proline accumulation following 15 days of water stress.

This classification represents differences in drought resistance if a higher proline contents is considered a measurement of the plant adaptation to the unfavorable condition.

##### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ARCAY, J. J. M. & RENA, A. B. Dehydration, growth regulators, potassium pH and leaf age and the accumulation of free proline in bean discs (*Phaseolus vulgaris* L.). *Experientiae*, 23(4):53-69, 1977.
2. BENGTON, C.; KLOCKARE, B.; KLOCKARE, R.; LARSSON, S.; SUNDOVIST, C. The after-effect of water stress on chlorophyll formation during greening and the levels of abscisic acid and proline in dark grown in wheat seedlings. *Physiologia Plantarum*, 43:205-212, 1978.

3. BRANDLE, J. R.; HINCKLEY, T. M.; BROWN, G. N. The effects of dehydration-rehydration cycles on protein synthesis of black locust seedlings. *Physiologia Plantarum*, 40:1-5, 1977.
4. HANSON, A. D.; NELSEN, C. E.; EVERSON, E. H. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. *Crop Science*, 17(5):720-726, 1977.
5. ———; ———; TULLEY, E. R. Proline accumulation in water-stressed barley leaves in relation to translocation and the nitrogen. *Plant Physiology*, 63(3):518-523, 1979.
6. JAGER, H. J. & MAYER, H. R. Effect stress on growth and proline metabolism of *Phaseolus vulgaris* L. *Oecologia*, 30:83-96, 1977.
7. LEVITT, J. Responses of plants to environmental stress. The measurement of drought resistance. New York, Academic Press, 1972. p. 425-445.
8. MACHADO, R. C. R.; RENA, A. B.; VIEIRA, C. The effect osmotic dehydration on the accumulation of free proline in leaf discs of 20 bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres, Viçosa*, 23(128):302-309, 1976.
9. RAJAGOPAL, V.; BALASUBRAMANIAN, V.; SINHA, S. K. Diurnal fluctuations in relative water content, nitrate reductase and proline content in water-stressed and non-stressed wheat. *Physiologia Plantarum*, 40:69-71, 1977.
10. RENA, A. B. & MASCIOTTI, G. Z. The effect of dehydration on nitrogen metabolism and growth of 4 bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres, Viçosa*, 23(128):288-301, 1976.
11. SINGH, T. N.; PALEG, L. G.; ASPINALL, D. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. *Australian Journal Biological Science*, 26:45-56, 1973.
12. ———; ASPINALL, D.; PALEG, L. C.; BOGGESE, S. F. Changes in proline concentration in excised plant tissues. *Australian Journal Biological Science*, 26:57-63, 1973.
13. STEWART, C. R. The effect of wilting on proline metabolism in excised bean leaves in the dark. *Plant Physiology*, 51:508-511, 1972.
14. TROLL, W. & LINDSLEY, J. The photometric methods to determination of proline. *Journal Biological Chemistry*, 215:655-660, 1955.