

# EFEITO DO ESTRESSE SALINO SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTOS E PROLINA EM FOLHAS DE ARROZ<sup>(1)</sup>

MARIA DA GRAÇA DE SOUZA LIMA<sup>(2,4)</sup>; NEI FERNANDES LOPES<sup>(2,3)</sup>;  
MARCOS ANTONIO BACARIN<sup>(2)</sup>; CRISTINA RODRIGUES MENDES<sup>(3)</sup>

## RESUMO

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação com as cultivares BRS Bojurú, IAS 12-9 Formosa e BRS Agrisul, a fim de analisar o efeito da concentração de NaCl (0, 25, 50, 75 e 100 mM) nos teores de clorofilas, carotenóides totais e de prolina, determinados a 30 dias após salinização do solo. A salinidade reduziu fortemente o teor de clorofilas e carotenóides totais no genótipo Agrisul, mas esses pigmentos não foram afetados no Bojurú e Formosa pela concentração salina. O teor de prolina foi maior na cultivar Agrisul do que nas cultivares Bojurú e Formosa e acentuou-se com o incremento na concentração de NaCl. Foi verificada uma concentração salina limiar que inicia o processo de acúmulo de prolina nas folhas, sendo de 50 mM para a cultivar BRS Agrisul (sensível) e de 75 mM para BRS Bojurú e IAS 12-9 Formosa (tolerantes).

**Palavras-chave:** *Oryza sativa*, pigmentos fotossintéticos, prolina, salinidade.

## ABSTRACT

### EFFECT OF SALT STRESS ON PIGMENTS AND PROLINE CONCENTRATIONS IN LEAVES OF RICE

In order to analyse the effect of salt (0, 25, 50, 75 and 100 mM) concentration on chlorophylls, total carotenoids and proline contents, an experiment was carried out in greenhouse conditions with cultivars BRS Bojurú, IAS 12-9 Formosa and BRS Agrisul. Total contents were determined 30 days after soil salinization. The salinity strongly reduced chlorophylls and total carotenoids contents on Agrisul genotype, but pigments were not quite affected on Bojuru and Formosa. Proline contents were lighter in Agrisul than in the Bujuru and Formosa genotypes, and the proline accumulation was accentuated with increase in salt concentration. A threshold of salt concentration that starts the process of proline accumulation in leaves was verified, being 50 mM to cultivar BRS Agrisul (sensitive) and 75 mM to cultivars BRS Bojuru and IAS 12-9 Formosa (tolerants).

**Key words:** *Oryza sativa*, photosynthetic pigments, proline, salinity.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Dissertação de Mestrado em Fisiologia Vegetal, apresentada pela primeira autora à Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas (RS). Projeto financiado pela CAPES. Recebido para publicação em 18 de março de 2003 e aceito em 24 de junho de 2004.

<sup>(2)</sup> Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Caixa Postal 354, Universidade Federal de Pelotas, 96010-900 Pelotas (RS) Brasil. E-mail:pecoli@ig.com.br; neilopes@ufpel.edu.br; cmendes@bol.com.br.

<sup>(3)</sup> Bolsista do CNPq.

<sup>(4)</sup> Bolsista da CAPES.

## 1. INTRODUÇÃO

O germoplasma do arroz possui uma variabilidade genética para tolerância ao sal, mas o nível de tolerância não é muito alto. Fontes para o caráter tolerância ao sal são raras, entretanto duas tradicionais variedades de arroz, Pokkali e Nona-Bokra, têm suficiente tolerância à salinidade para programas de melhoramento (AKBAR et al., 1985; GREGÓRIO e SENADHIRA, 1993). A maioria das cultivares crescidas em meio salino são seleções de linhas puras, muito bem adaptadas às condições locais, possuindo ciclo longo de crescimento, altas, sensíveis ao fotoperíodo e à baixa produção em grãos (XIE et al., 2000). O impacto da salinidade do solo sobre a produtividade agrícola é um problema, principalmente em regiões áridas e semi-áridas, que dependem da irrigação para um suprimento adequado de água para as culturas. Além disso, a salinidade afeta as plantas pela redução da taxa de absorção de água (WASHINGTON, 1980). A maioria das halófitas tem desenvolvido adaptações, como suculência, ajustamento osmótico, glândulas de sal e compartimentação iônica para diluir ou contrabalançar os efeitos da salinidade (MARSCHNER, 1995; CORDAZZO, 1999; LARCHER, 2000).

Os teores dos constituintes bioquímicos de folhas de arroz, como pigmentos fotossintéticos, açúcares e proteínas, são reduzidos pela salinidade, sendo esse efeito agravado pela prolongada duração de exposição ao NaCl (SULTANA et al., 1999). Em algumas espécies, o acúmulo de aminoácidos livres, principalmente prolina, aumenta devido à presença de NaCl em comparação com as plantas crescidas em meio não salino (LANGDALE et al., 1973; CÂMARA et al., 1998). O acúmulo de prolina é rápido e parece ser uma adaptação ao estresse salino (BERTELI et al., 1995), defendendo os tecidos vegetais contra estresse osmótico e/ou atuando como protetor enzimático (SOLOMON et al., 1994; LIU e ZHU, 1997). Quando o estresse salino é mais severo, o ajustamento osmótico envolve maior gasto de energia devido à síntese de solutos orgânicos (RODRÍGUEZ et al., 1997). Os solutos orgânicos no citossol contribuem para o equilíbrio osmótico intracelular, quando a concentração de íons orgânicos é alta no vacúolo, podendo também proteger enzimas citossólicas quando a concentração de íons aumenta (GREENWAY e MUNNS, 1980).

O objetivo deste trabalho foi determinar alterações nos teores de prolina e na concentração de pigmentos em plantas de arroz submetidas a diferentes doses de NaCl, no intuito de verificar características de resistência de genótipos ao estresse salino.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em janeiro e fevereiro, em casa de vegetação, na Estação Experimental de Terras Baixas, Embrapa – Clima Temperado. Com base em resultados obtidos nos experimentos anteriores, foram selecionadas as cultivares IAS 12-9 Formosa e BRS Bojurú, que apresentaram maior tolerância ao sal e BRS Agrisul, considerada o genótipo mais sensível.

As sementes foram semeadas em bandejas plásticas, com capacidade para 12 kg de substrato, em três repetições. O substrato utilizado foi solo tipo Planossolo retirado da camada superficial (0 a 0,2 m) quinze dias após a emergência foi adicionado ao solo cloreto de sódio nas concentrações de zero, 25, 50, 75 e 100 mM. O substrato solo foi sempre mantido próximo à capacidade de campo.

A coleta foi realizada aos trinta dias após a salinização do solo. O material vegetal fresco foi utilizado para a determinação das clorofilas a, b, total e carotenóides de acordo com o método descrito por LICHTENTHALER (1987).

A extração de aminoácidos livres foi realizada seguindo o método descrito por SINGH et al. (1973). O material vegetal foi macerado com uma mistura de metanol, clorofórmio e água (MCA) na proporção de 12:5:1 (v/v/v) e centrifugado por 3 minutos à 4.000 rpm, sendo coletado o sobrenadante. No resíduo, foram adicionados 2 mL de MCA e novamente centrifugado e os sobrenadantes obtidos foram combinados.

As etapas de lavagem, centrifugação e coleta foram novamente repetidas. O sobrenadante foi colocado em funil de separação, onde se adicionou 2,3 mL de água destilada e 1,5 mL de clorofórmio, agitando-se o funil levemente. A fase inferior foi descartada e a superior, utilizada para a quantificação de prolina. A prolina foi determinada pelo método de MESSER (1961). Utilizou-se uma alíquota adequada da fração de aminoácidos em tubo de hidrólise, adicionou-se 1 mL de glicina, na concentração de 12,6  $\mu$ M e completou-se o volume para 3 mL com água. A seguir, foram adicionados 2 mL de ácido acético glacial e 3 mL de reagente ácido de ninhidrina. Em seguida, colocaram-se os tubos em banho-maria por 35 minutos e a reação terminada com um banho de gelo. Posteriormente, acrescentou-se 4 mL de toluol e agitou-se vigorosamente por 15 segundos. Obteve-se assim uma fase toluênica rosada da qual fez-se a leitura em espectrofotômetro a 515 nm utilizou-se como padrão uma solução de prolina  $10^{-4}$  M, diluída com água na proporção de 1:1.

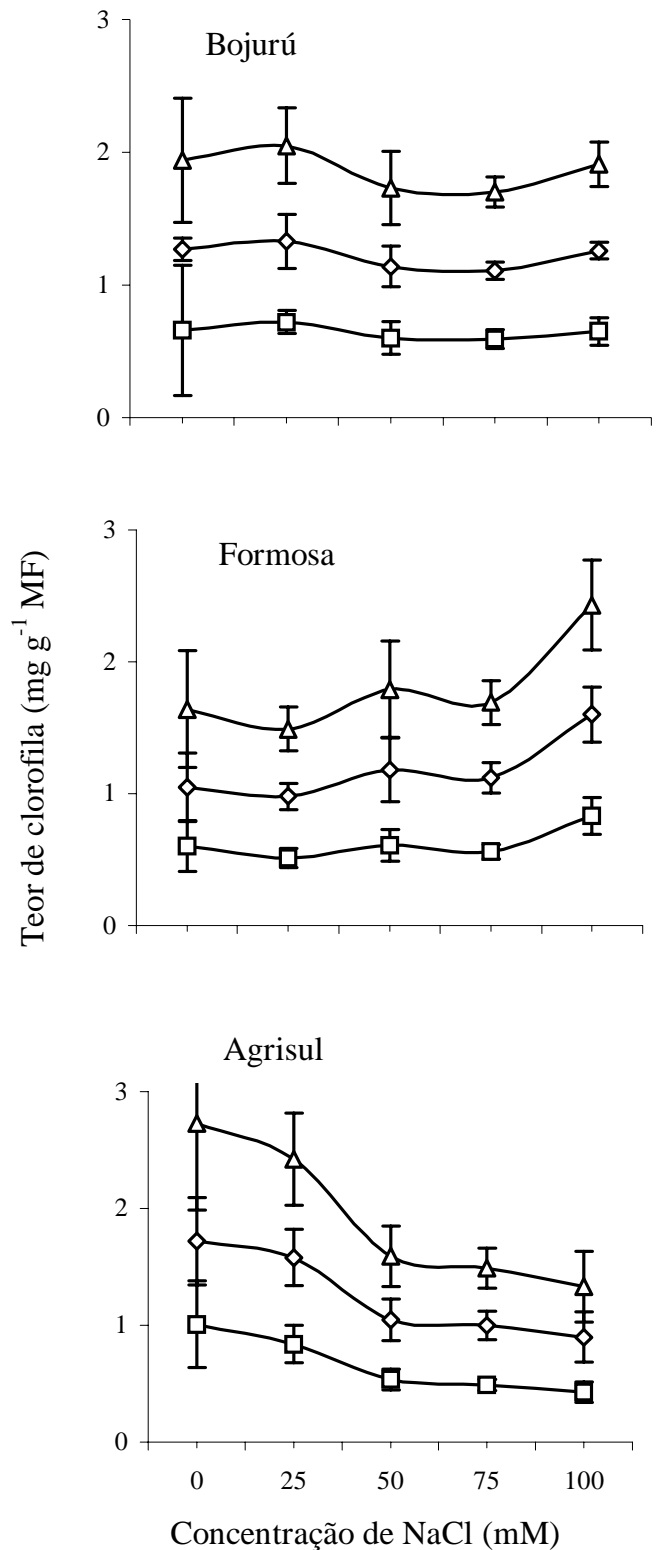
O delineamento experimental foi em blocos casualizados com três repetições estatísticas. As médias dos resultados obtidos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

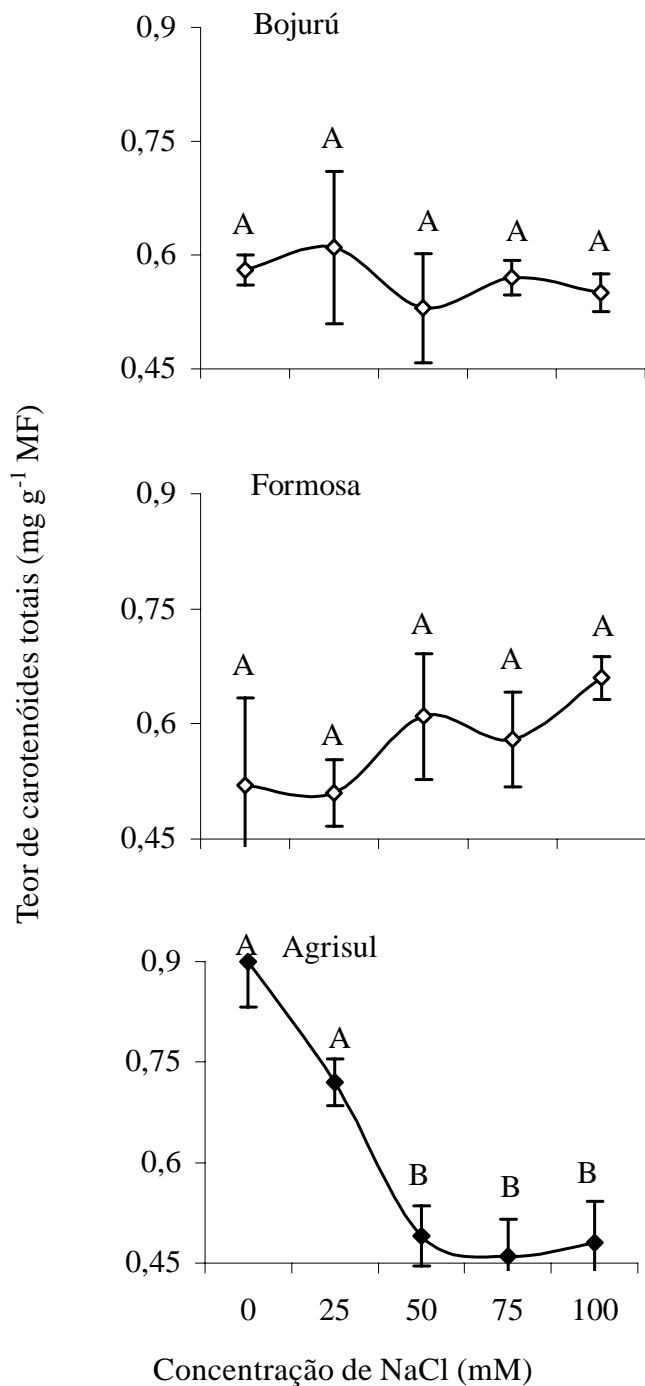
Os teores de clorofila a, b e total (Figura 1) não diferiram estatisticamente ( $P \leq 0,05$ ) nas cultivares BRS Bojurú e IAS 12-9 Formosa com o incremento da salinidade, sugerindo que a presença do sal não afetou a formação de clorofila nessas duas cultivares consideradas mais tolerantes ao estresse salino. No entanto, a cultivar BRS Agrisul apresentou uma queda no teor de clorofila, com relação ao controle, mostrando que a salinidade afetou significativamente ( $P \leq 0,05$ ) a formação de clorofila em concentrações acima de 25 mM de NaCl, nessa cultivar julgada sensível ao sal. Resultados semelhantes foram obtidos por SULTANA et al. (1999), quando avaliou o efeito da salinidade em plantas de arroz.

O teor de carotenóides totais (Figura 2), em vista da concentração de NaCl, apresentou uma tendência similar ao das clorofilas. Assim, o teor dos carotenóides totais ficou praticamente constante na cultivar BRS Bojurú e com moderado aumento na cultivar IAS 12-9 Formosa. No entanto, na cultivar BRS Agrisul ocorreu acentuada queda no teor de carotenóides em função do incremento na concentração de NaCl. Os carotenóides são pigmentos acessórios na absorção e transferência de energia radiante, e protetores da clorofila no tocante à fotooxidação. Certamente, a degradação ou inibição da síntese de carotenóides implicou degradação das clorofilas nas folhas da cultivar BRS Agrisul que é sensível à salinidade. Em plantas submetidas à salinidade, decréscimos na concentração de clorofila podem ser atribuídos ao aumento da atividade da enzima clorofilase que degrada a clorofila. O estresse salino induz a degradação de  $\beta$ -caroteno e a redução na formação de zeaxantina, produzindo diminuição no teor de carotenóides, pigmentos aparentemente envolvidos na proteção contra a fotoinibição (SHARMA e HALL, 1991).

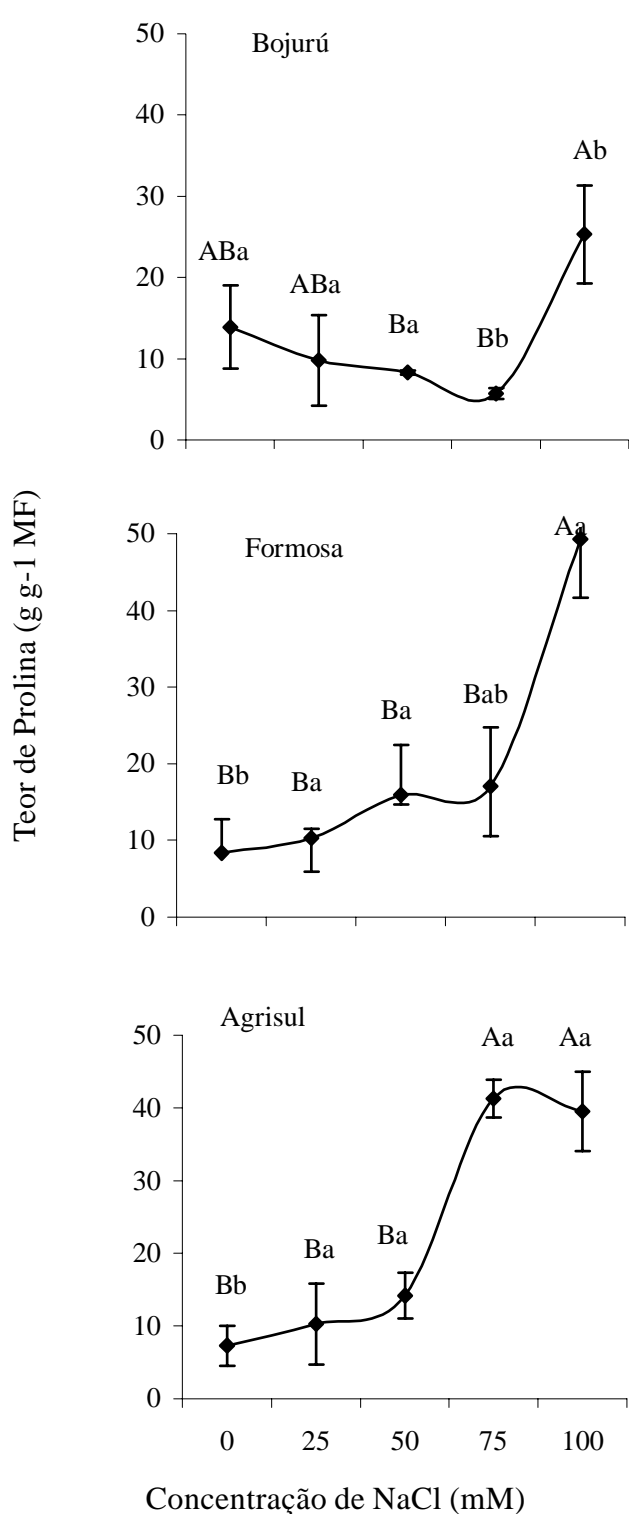
Acréscimos graduais no teor de prolina ocorreram nas cultivares Formosa (Figura 3) e Agrisul (Figura 3) com aumento na concentração salina; no entanto, na cultivar BRS Bojurú (Figura 3), o conteúdo de prolina decresceu paulatinamente até a concentração de 75 mM de NaCl, aumentando somente aos 100 mM, demonstrando que o genótipo talvez seja sensível à salinidade em concentrações maiores ou iguais a 100 mM.



**Figura 1.** Concentração de clorofila a (◇), b (□) e total (Δ) em folhas de arroz das cultivares BRS Bojurú, IAS 12-9 Formosa e BRS Agrisul em vista da concentração de NaCl, aos 30 dias após a salinização do solo. As barras representam o desvio-padrão da média.



**Figura 2.** Concentração de carotenóides totais em folhas de arroz das cultivares BRS Bojurú, IAS 12-9 Formosa e BRS Agrisul em função da concentração de NaCl, aos 30 dias após a salinização do solo. As barras representam o desvio-padrão da média. Letras maiúsculas diferem entre si, nos tratamentos, a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.



**Figura 3.** Concentração de prolina em folhas de arroz das cultivares BRS Bojurú, IAS 12-9 Formosa e BRS Agrisul em função da concentração de NaCl, aos 30 dias após a salinização do solo. As barras representam o desvio-padrão da média. Letras maiúsculas diferem entre si, nos tratamentos e minúsculas nas cultivares, a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

O valor da concentração de prolina foi maior na cultivar mais sensível, apesar de não haver evidências de maior acúmulo de prolina em espécies tolerantes que em espécies sensíveis ao sal (GREENWAY e MUNNS, 1980). Os resultados evidenciam a existência de um teor limiar ou limítrofe de sal a partir do qual é desencadeado o acúmulo de prolina, sendo um mecanismo de proteção ao estresse salino. Nas cultivares BRS Bojurú e IAS 12-9 Formosa, a concentração limiar foi de 75 mM de NaCl, ao passo que na cultivar BRS Agrisul o teor limiar foi bem menor (< 50 mM). Provavelmente, as cultivares BRS Bojurú e IAS 12-9 Formosa excluem a absorção de Na<sup>+</sup> em concentrações de NaCl < 100 mM, acumulando esses íons no apoplasto das raízes ou compartimentalizando-os, para não causar danos ao protoplasma (simplasto).

Existe variabilidade genotípica na capacidade de acumular prolina sob condições de estresse (MADRUGA, 1977). O acúmulo de prolina em folhas de arroz é significativamente aumentado pela salinidade (SULTANA et al., 1999) e pelo estresse hídrico (MADRUGA, 1977). Esse acúmulo é uma resposta aos estresses e possui um efeito protetor na germinação de sementes em substratos salinos (BAR-NUN e POLJAKOFF-MAYBER, 1977).

O incremento no teor de prolina parece ter várias funções; primeiramente, a de não permitir o acúmulo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, composto muito tóxico por ser desacoplador da produção de ATP na fotofosforilação e fosforilação oxidativa. Também, a prolina tem a propriedade de proporcionar ajustamento osmótico sem causar injúria aos tecidos em comparação ao efetuado por íons. Plantas de milho respondem à salinização pela manutenção de maiores concentrações de sacarose e prolina, visto que o nível de prolina aumenta com a salinização e com o tempo de exposição das plantas ao sal, sugerindo um papel protetor da prolina (RODRÍGUEZ et al., 1997).

Essa acumulação de compostos orgânicos nitrogenados deve refletir um mecanismo protetor ao qual se inclui acúmulo de solutos compatíveis como a prolina e outros aminoácidos, refletindo como um mecanismo osmorregulatório (KUZNETSOV e SHEVYAKOVA, 1997).

#### 4. CONCLUSÕES

1. Os teores de clorofilas e de carotenóides totais não são afetados pelas diferentes concentrações salinas nas cultivares BRS Bojurú e IAS 12-9 Formosa, porém a cultivar BRS Agrisul reduz acentuadamente os conteúdos desses pigmentos com o aumento da salinidade.

2. Existe um teor limiar ou limítrofe de sal a partir do qual se desencadeia o acúmulo de prolina, sendo de 75 mM de NaCl para as cvs. BRS Bojurú e IAS 12-9 Formosa e em torno de 50 mM para a cv. BRS Agrisul.

3. Os genótipos mais tolerantes à salinidade são BRS Bojurú e IAS 12-9 Formosa, acumulando prolina somente após 30 dias da adição de 100 mM de NaCl no substrato.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo suporte financeiro.

#### REFERÊNCIAS

- AKBAR, M.; KHUSH, G.S.; HILLERISLAMBERS, D. Genetics of salt tolerance in rice. In: **Rice Genetics. Proceedings of the International Rice Genetics Symposium**. Los Baños, Philippines: IRRI, 1985 p.399-409.
- BAR-NUN, N.; POLJAKOFF-MAYBER, A. Salinity stress and the content of proline roots of *Pisum sativum* and *Tamarix tetragyna*. **Annals of Botany**, Londres, v.41, n.174, p.173-179, 1977.
- BERTOLI, F.; CORRALES, E.; GUERRERO, C.; ARIZA, M.J.; PILEGO, F.; VALPUESTA, V. Salt stress increases ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 93, n. 2, p. 259-264, 1995.
- CÂMARA, T.R.; WILLADINO, L.; TORNÉ, J.M.; RODRIGUEZ, P.; SANTOS, M.A. Efeito da putrescina e do estresse salino em calos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 10, n. 2, p. 153-156, 1998.
- CORDAZZO, C.V. Effects of salinity on seed germination, seedling growth and survival of *Spartina Ciliata* Breng. **Acta Botânica Brasileira**, Brasília, v. 13, n. 3, p. 317-322, 1999.
- GREENWAY, H.; MUNNS, R. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.31, p.149-190, 1980.
- GREGÓRIO, G.B.; SENADHIRA, D. Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Theoretical Applied Genetics**, New York, v.86, n.3, p.333-338, 1993.
- KUZNETSOV, V.V.; SHEVYAKOVA, N.I. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, n.2, p. 320-326, 1997.

- LANGDALE, G.W.; THOMS, J.R.; LITTLETON, T.G. Nitrogen metabolism of stargrass as affected by nitrogen and salinity. **Agronomy Journal**, Madison, v.65, n.3, p.468-470, 1973.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000. 531p.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.350-382, 1987.
- LIU, J.; ZHU, J.K. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt hypersensitive mutant of arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockeville, v.114, n.2, p.591-596, 1997.
- MADRUGA, L.A.N.; RENA, A.B. Efeito do déficit hídrico sobre o metabolismo de aminoácidos livres e proteínas em folhas de cinco cultivares de arroz (*Oryza sativa* L). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 24, n. 133, p. 237-246, 1977.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1995. 889p.
- MESSER, M. Interference by amino acids and peptides with the photometric estimation of proline. **Analytical Biochemistry**, New York, v.2, n.4, p.353-359, 1961.
- RODRÍGUEZ, H.G.; ROBERTS, J.K.M.; JORDAN, W.R.; DREW, M.C. Growth, water relation, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. **Plant Physiology**, Rockeville, v.113, n.3, p.881-893, 1997.
- SHARMA, P.K.; HALL, D.O. Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.138, n.5, p.614-619, 1991.
- SINGH, T.N.; PALEG, L.G.; ASPINALL, D. Stress metabolism I. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress. **Australian Journal of Biology Science**, Victoria, v.6, n.1, p.45-56, 1973.
- SOLOMON, A.; BEER, S.; WAISEL, G.; JONES, P.; PALEG, L.G. Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.90, n.1, p.198-204, 1994.
- SULTANA, N.; IKEDA, T.; ITOH, R. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v.42, n.3, p.211-220, 1999.
- WASHINGTON. Water management on small farms. Washington, D.C. USA: Agency for International Development, 1980. 91p.
- XIE, J. H.; ZAPATA-ARIAS, F.J.; SHEN, M; AFZA, R. Salinity tolerant performance and genetic diversity of four rice varieties. **Euphytica**, Holanda, v.116, n.2, p.105-110, 2000.