



ACÚMULO DIFERENCIAL DE PROLINA COMO INDICADOR DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE SALINO EM CULTIVARES DE *Phaseolus vulgaris* L.

Luís Gustavo Gomes Lobo, Luiz Henrique Bovi de Quadros, Jardel de Oliveira, Diliane Harumi Yaguinuma, Tiago Benedito dos Santos

PROBLEMÁTICA

Os estresses abióticos, ou seja, salinidade, seca, frio, calor, dentre outros, afetam negativamente a sobrevivência, a dinâmica de crescimento e o rendimento de muitas culturas alimentares essenciais, como o feijoeiro. Em particular, o estresse salino nas plantas pode afetar a atividade das enzimas, a capacidade de fotossíntese e aumentar o estresse osmótico e a toxicidade iônica. Entretanto, as plantas ao longo da evolução, desenvolveram estratégias de defesa eficiente, incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para mitigar os danos desencadeado por esses efeitos ambientais adversos. Neste cenário, torna-se cada vez mais necessário a triagem de cultivares que possam ser tolerantes a essas adversidades ambientais que o agricultor vem enfrentando no campo.

CONHECIMENTO PRÉVIO

O estresse provocado pelas adversidades ambientais é uma das áreas de grande interesse científico devido às suas consequências prejudiciais à produtividade agrícola. Nas últimas décadas, isso está se tornando ainda pior devido às mudanças climáticas (El-Ramady et al., 2019; Farooq et al., 2020). Assim, existem enormes esforços científicos para reforçar a produtividade das culturas sob vários estresses ambientais e para lidar com o aumento da demanda global de alimentos (Alshaal et al., 2017; Elhawat et al., 2018). Em suma, os estresses abióticos, ou seja, salinidade, seca, frio e calor afetam negativamente a sobrevivência, a dinâmica de crescimento e o rendimento de muitas culturas alimentares essenciais (El-Ramady et al., 2018). A alta salinidade afeta as plantas de várias maneiras, podendo desencadear: estresse hídrico, toxicidade iônica, distúrbios nutricionais, estresse oxidativo, alteração nos processos metabólicos, desorganização da membrana, redução da divisão e expansão celular e genotoxicidade (El-Ramady et al., 2018; dos Santos et al., 2022). Existem muitas culturas economicamente importantes que são severamente afetadas pela salinidade: o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma dessas culturas. Cabe enfatizar que o feijão-comum é uma das maiores leguminosas cultivadas e consumidas em todo o mundo (Rawal e Navarro, 2019).

As plantas ao longo da evolução desenvolveram alguns mecanismos para sobreviver a ambientes desfavoráveis, dentre estas estratégias pode-se mencionar o acúmulo de determinadas substâncias que auxiliam a sua sobrevivência (solutos compatíveis que não são tóxicos em altas concentrações). Esses solutos compatíveis são caracterizados por seu baixo peso molecular, alta solubilidade, e também diferem entre as diferentes espécies de plantas (Hannachi e Van Labeke, 2018). Os osmólitos incluem aminas quaternárias (por exemplo, betaínas), açúcares (por exemplo, manitol, sorbitol e



trealose) e aminoácidos (por exemplo, prolina) (Zulfiqar et al., 2020). Resumidamente, pode-se mencionar que a prolina é caracterizada como um osmólito endógeno mais comum nas plantas, e pode ser acumulado sob vários estresses abióticos, incluindo a salinidade. Assim, as altas concentrações de prolina em plantas estressadas com a salinidade podem indicar que essas plantas estão aptas a uma maior tolerância a tal adversidade. Em plantas de *Zea mays* L. sob condições de estresse salino, foi observado por exemplo, um aumento no teor de prolina e na taxa de crescimento (Molazem e Azimi, 2015). Alguns estudos com feijão-comum também têm demonstrado que essa espécie é acumuladora de prolina em resposta ao estresse salino (Jiménez-Bremont et al., 2006; Al Hassan et al., 2016; Arteaga et al., 2020).

Neste sentido, no presente estudo foi investigado o conteúdo de prolina em duas cultivares de feijão-comum estressadas com NaCl (cloreto de sódio). Espera-se que os resultados aqui apresentados auxiliem no aprimoramento da produção de feijão em solos salinizados ou irrigados com água de baixa qualidade, além de permitir o delineamento de novos estudos para essa importante cultura.

DESCRIÇÃO DA PESQUISA

Na casa de vegetação climatizada localizada a 22°06'59"S, 51°27'02"W e altitude de 475 m no Campus II da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), foram germinadas em caixas contendo substrato vegetal sementes de duas cultivares de feijão (BAT 477) e (Pérola). Tais sementes foram solicitadas e gentilmente concedidas pela pesquisadora Dra. Paula Pereira Torga que é atual curadora do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (Embrapa Arroz e Feijão). Após as cultivares terem atingido o estágio V2, as plantas foram individualmente separadas e alocadas em vasos de 1,5 L e irrigadas semanalmente com 100 mL de água em cada vaso. Ao atingirem estágio V4 deu-se o início do estresse salino (Figura 1).



Figura 1. Cultivares de feijão (BAT 477) e (Pérola) utilizadas para o experimento de estresse salino. (Fonte próprio autor).

Para evitar choque osmótico, as cultivares foram irrigadas no primeiro dia com 250 mL com a solução de NaCl a 50 mM, e no segundo dia com 100 mM. A partir do



terceiro dia até o final do experimento (14 dias) as plantas foram irrigadas diariamente com 150 mM de NaCl. Um par de trifólios de ambas as cultivares foram coletadas antes de iniciar o tratamento (controle sem adição de NaCl) e 7, 14 dias após o início do tratamento com 150 mM de NaCl. Após a coleta os trifólios foram imediatamente submergidos em N líquido para posteriores análises. A determinação do conteúdo de prolina nas folhas das cultivares BAT 477 e Pérola foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Bates, Waldren e Teare (1973). Para esta análise foi utilizado 50 mg de tecido vegetal macerados em nitrogênio líquido, adicionados 5 mL de ácido sulfosalicílico (3%), agitados vigorosamente em vórtex e posteriormente, permaneceram por 15 min em repouso. Em seguida, todas as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm por 3 min. Foram retirados 2 mL do sobrenadante e acrescentados a cada amostra 2 mL de ninidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial. As amostras foram então incubadas em banho-maria por 1 h a 100°C e, após esse período, transferidas para gelo. Após o resfriamento, foram acrescentados 4 mL de tolueno e agitados vigorosamente em vórtex por 20 s e foram deixadas em repouso por 5 min para a separação das fases e o cromóforo contendo tolueno foi retirado da fase aquosa e realizada a leitura no espectrofotômetro a 520 nm. Importante mencionar, que as análises foram realizadas em triplicata e a concentração de prolina foi determinada usando curva padrão (0 - 100 µg mL⁻¹). Por se tratar de um estudo preliminar, optou-se por apresentar os resultados dessa análise através de uma figura denominada *Heat map* (gerado pela plataforma *CIMMiner*: www.discover.nci.nih.gov/cimminer) para inferir a quantidade do conteúdo de prolina durante o período de estresse salino.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estresse salino é sem dúvida um dos principais estresses ambientais que afetam drasticamente o crescimento e a produtividade das plantas, e estima-se que mais de um terço das terras irrigadas do mundo sejam afetadas pela salinidade (Munns et al., 2019). Dentre os efeitos deletérios da salinidade nas plantas destaca-se os estresses osmóticos, iônicos e oxidativos (dos Santos et al., 2022). Em algumas espécies de plantas sob condições de estresse salino, o acúmulo de prolina tem sido considerado um indicador que pode estar correlacionado com a tolerância ao sal (Mansour; Ali, 2017). Assim, buscando entender o mecanismo fisiológico em plantas sob condições de estresse salino, foi realizada a quantificação do conteúdo de prolina em folhas de duas cultivares de feijão (Figura 1).

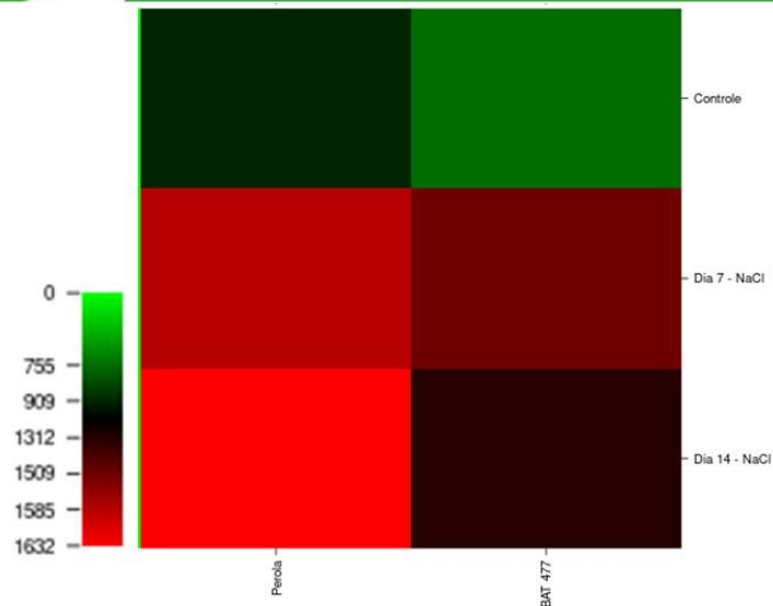


Figura 2. Perfil do conteúdo de prolina das cultivares BAT 477 e Pérola submetidas ao estresse salino (Controle, Dia 7 – NaCl, Dia 14 – NaCl). Ao lado da figura há uma escala de da quantificação do conteúdo de prolina, onde as caixas vermelhas e verdes indicam níveis de alto e baixo conteúdo de prolina, respectivamente.

De modo geral, na condição controle, o conteúdo de prolina das cultivares BAT 477 e Pérola não foram alterados, diferentemente do que ocorreu em condições de estresse salino, em que eles aumentaram (Figura 1). Na cultivar BAT 477, o conteúdo de prolina em plantas sob estresse foram maiores durante o sétimo dia sob salinidade (Figura 1). Curiosamente, após o sétimo dia até o 14 dia em condições de salinidade, foi observado um decréscimo no conteúdo de prolina, respectivamente (Figura 1). Já na cultivar Pérola, sob estresse salino, as plantas acumularam progressivamente o conteúdo de prolina com o passar dos dias, conforme pode ser observado na Figura 1.

O acúmulo de prolina observado nas folhas do cultivar Pérola em resposta ao estresse salino (Figura 1), pode ser um indicativo de tolerância a esse tipo de estresse. Esse achado sugere que a cultivar Pérola é um forte candidato para estudos de melhoramento genético para esse tipo de adversidade. Contudo, vale enfatizar que dentro de uma determinada espécie, existem cultivares que apresentam genótipos e fenótipos diferentes, e a tolerância ao estresse salino envolve complexas vias de defesa, as quais podem estar associadas a mecanismos fisiológicos e moleculares de controle do acúmulo de Na^+ no citosol celular (dos Santos et al., 2022). Assim, este estudo avaliou preliminarmente a tolerância diferencial de duas cultivares de feijão ao estresse salino e forneceu evidências sobre o mecanismo bioquímico que são responsáveis por esse fenômeno.

APLICAÇÃO PRÁTICA

A salinização de terras agrícolas representa um desafio significativo para o futuro, dadas as previsões de mudanças climáticas e crescimento populacional. Neste sentido, sugere-



se que a quantificação da prolina pode ser utilizada como um marcador bioquímico adequado para triagem simples, rápida e em larga escala de genótipos de feijão nos programas de melhoramento, para excluir os mais sensíveis, aqueles que acumulam maiores concentrações de prolina em resposta a tratamentos de estresse salino.

AGRADECIMENTOS

Ao Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (Embrapa Arroz e Feijão) por disponibilizar, as sementes para o presente estudo. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo nº 2021/01302-7), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa e taxa.

LITERATURA CITADA

Al Hassan, M.; Morosan, M.; López-Gresa, M.P.; Prohens, J.; Vicente, O.; Boscaiu, M. Salinity-induced variation in biochemical markers provides insight into the mechanisms of salt tolerance in common (*Phaseolus vulgaris*) and runner (*P. coccineus*) beans. **International Journal of Molecular Sciences**, 17, 1582, 2016.

Alshaal, T.; Alsaeedi, A.H.; Shalaby, T.; Elsakhawy, T.; Omara, A.E.-D.; Gad, A.; Hamad, E.; El-Ghamry, A.; Mosa, A.; Amer, M.; Abdalla, N.; El-Ramady, H. The rhizosphere and plant nutrition under climate change M. Naeem, et al. (Eds.), **Essential Plant Nutrients**, Springer International Publishing AG, p. 275–308, 2017.

Arteaga, S.; Yabor, L.; Díez, M.J.; Prohens, J.; Boscaiu, M.; Vicente, O. The use of proline in screening for tolerance to drought and salinity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. **Agronomy**, 10, 817, 2020.

Bates, L.S.; Waldren, R.P.; Teare, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, 39, 205– 207, 1973.

dos Santos, T. B.; Ribas, A.F.; de Souza, S.G.H.; Budzinski, I.G.F.; Domingues, D.S. Physiological Responses to Drought, Salinity, and Heat Stress in Plants: A Review. **Stresses**, 2 (1), 113–135, 2022.

Elhawat, N.; Alshaal, T.; Hamad, E.; El-Nahrawy, E.; Omara, A.E.-D.; El-Nahrawy, S.; Elsakhawy, T.; Ghazi, A.; Abdalla, A.; Domokos-Szabolcsy, É.; El-Ramady, H. Nanoparticle associated phytotoxicity and abiotic stress under agroecosystems. M. Faisal, et al. (Eds.), **Phytotoxicity of Nanoparticles**, Springer International Publishing AG, p. 241–268, 2018.

El-Ramady, H.; Alshaal, T.; Bakr, N.; Elbana, T.; Mohamed, E.; Belal, A.A. Soils of Egypt World Soils Book Series (first ed.), Springer International Publishing AG, 2019.

El-Ramady, H.; Alshaal, T.; Elhawat, N.; Ghazi, A.; Elsakhawy, T.; Omara, A.E.D. El-Nahrawy, S.; Elmahrouk, M. Abdalla, N.; Domokos-Szabolcsy, É. Schnug, E. Plant nutrients and their roles under saline soil conditions. M. Hasanuzzaman, et al. (Eds.),



Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance, Springer Nature Singapore Pte Ltd, p. 297–324, 2018.

Farooq, A.; Bukhari, S.A.; Akram, N.A.; Ashraf, A.; Wijaya, L.; Alyemeni, M.N.; Ahmad, P. Exogenously applied ascorbic acid-mediated changes in osmoprotection and oxidative defense system enhanced water stress tolerance in different cultivars of safflower (*Carthamus tinctorious* L.). **Plants**, 9, p. 104, 2020.

Hannachi, S.; Van Labeke, M.C. Salt stress affects germination, seedling growth and physiological responses differentially in eggplant cultivars (*Solanum melongena* L.). **Scientia Horticulturae**, 228, p. 56–65, 2018.

Jiménez-Bremont, J.F.; Becerra-Flora, A.; Hernández-Lucero, E.; Rodríguez-Kessler, M.; Acosta-Gallegos, J.; Ramírez Pimentel, J. Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. **Biologia Plantarum**, 50, 763–766, 2006.

Mansour, M.M.F.; Ali, E.F. Evaluation of proline functions in saline conditions. **Phytochemistry**, 140: 52, 2017.

Molazem, D.; Azimi, J. Morpho-Physiological Characterization in Eight Varieties of Maize (*Zea mays* L.) under Soil Salinity. **Polish Journal of Environmental Studies**, 24, 2537–2542, 2015.

Munns R, Day DA, Fricke W, et al. Energy costs of salt tolerance in crop plants. **New Phytologist**, 2019.

Rawal, V.; Navarro, D.K. The Global Economy of Pulses. **FAO**, Rome, 2019.

Zulfiqar, F.; Akram, N.A.; Ashraf, M. Osmoprotection in plants under abiotic stresses: new insights into a classical phenomenon. **Planta**, 251:3, 2020.