

**METABOLISMO DE PROLINA E SÍNTESE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) SUBMETIDAS AO
DÉFICIT HÍDRICO**

FLÁIVE LOYZE BALDASSARINI SILVA

**METABOLISMO DE PROLINA E SÍNTESE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM
PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum*) SUBMETIDAS AO
DÉFICIT HÍDRICO**

FLÁIVE LOYZE BALDASSARINI SILVA

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia – Área de concentração: Produção Vegetal.

Orientador:
Prof^a. Dr.^a Ana Cláudia Pacheco Santos

630
S586m

Silva, Fláive Loyze Baldassarini.
Metabolismo de prolina e síntese de compostos fenólicos em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) submetidas ao déficit hídrico. / Fláive Loyze Baldassarini Silva – Presidente Prudente, 2017.
(56)f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2017.

Bibliografia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Pacheco Santos.

1. Via do ácido chiquímico. 2. Estresse abiótico. 3. Via pentose fosfato. I. Título.

Campus I Rua José Bongiovani, 700 · Cidade Universitária · CEP 19050 920 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 1000
Campus II Rodovia Raposo Tavares, Km 572 · Bairro Limoeiro · CEP 19067 175 · Presidente Prudente SP · Tel|Fax: 18 3229 2000

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "METABOLISMO DE PROLINA E SÍNTESE DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE TABACO SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO"

AUTOR(A): FLÁIVE LOYZE BALDASSARINI SILVA

ORIENTADOR(A): ANA CLAUDIA PACHECO SANTOS

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE em AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. Ana Claudia Pacheco Santos

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)


Profa. Dra. Natália Corniani

UNESP – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Botucatu (SP)


Prof. Dr. Tiago Benedito dos Santos

Bolsista de Pós-Doutorado PNPd/CAPES - UNOESTE – Universidade do Oeste Paulista – Presidente Prudente (SP)

Data da realização: 27 de junho de 2017.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, minha base de vida e principais incentivadores da minha jornada acadêmica. Se não fossem vocês com suas palavras motivadoras e encorajadoras, eu não chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela proteção, pelo refúgio forte e por cada dia que dirigiu meus passos.

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À orientadora Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Pacheco Santos, pela disponibilidade de orientação, pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira, pelas sugestões valiosas, pelos ensinamentos, muita paciência e pela amizade.

À Prof.^a Dr.^a Alessandra Ferreira Ribas pelo apoio em todo tempo, pela preocupação, pelo comprometimento, sugestões e pela amizade.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Creste pelo incentivo à carreira acadêmica, conselhos e amizade valiosa desde os tempos de graduação.

Ao meu esposo Wellington pelo incentivo, compreensão, paciência, amor e apoio até mesmo com o experimento, nunca me deixando esquecer o meu potencial. Obrigada por deixar meus dias mais felizes.

Aos meus pais, Fátima e João Luiz e irmã Ana Flávia, pela preocupação constante, inesgotável paciência, apoio diário e alegria que me impulsionava cada dia. Tudo se tornou mais leve graças a vocês!

À amiga Eliane pela ajuda com o experimento e análises laboratoriais, além do companheirismo e mútuo incentivo na realização do mestrado.

Ao Daniel e Pedro pela importantíssima ajuda com análises bioquímicas e envolvimento na compreensão dos resultados.

À amiga Aline pelo apoio em muitas análises e pelas conversas tão produtivas e agradáveis.

Aos companheiros do Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista (CEVOP), pela ajuda na condução das análises, pelos conhecimentos compartilhados e pela amizade. Se sozinha consigo ser forte, imagine em boas companhias!

A todos não mencionados que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“O coração do homem traça o seu caminho, mas o Senhor lhe dirige os passos”.

(Provérbios 16:9)

RESUMO

Metabolismo de prolina e síntese de compostos fenólicos em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) submetidas ao déficit hídrico

A associação entre o metabolismo de prolina na planta e a via pentose fosfato tem sido proposta como um modelo para se estimular uma das rotas do metabolismo secundário relacionada à produção dos diferentes compostos fenólicos em plantas, denominada via do ácido chiquímico. Em plantas transgênicas nas quais ocorrem a superexpressão do gene *P5CS* Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase, que codifica a enzima-chave da biossíntese de prolina, além do aumento de tolerância a estresses abióticos, existe a possibilidade de promoção da síntese de compostos fenólicos como um efeito pleiotrópico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da prolina “*per se*” em relação à produção de compostos fenólicos em plantas transgênicas de tabaco acumuladoras deste aminoácido (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) e verificar se o estresse hídrico modificaria essa resposta. O experimento foi realizado em condições de casa de vegetação, no Campus II da Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente - SP. Utilizou-se o delineamento experimental em arranjo inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3x2, formado por 3 genótipos (dois eventos transgênicos com expressão constitutiva *35S::P5CSF129A* e plantas controle não transformadas) e dois níveis de regime hídrico, com reposições diárias de água de 100% e de 30% da capacidade de campo (estresse hídrico). O papel da prolina “*per se*” foi avaliado por meio de análises biométricas de crescimento (altura de plantas, massas seca de parte aérea e raiz e número de folhas) além das análises de prolina, atividade das enzimas glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), fenilalanina amônia liase (FAL), compostos fenólicos totais nas folhas e lignina. Em resposta natural ao estresse hídrico, foi observado uma redução nos parâmetros biométricos para todos os genótipos. O acúmulo de prolina ocorreu em maior proporção nas plantas transgênicas como esperado pela expressão constitutiva do gene *P5CS*, porém a atividade da enzima G6PDH foi menor nas plantas transgênicas. A vinculação entre um maior conteúdo endógeno de prolina com a síntese aumentada de fenóis ocorreu tanto em condições normais de hidratação (para o evento E2) como na presença de estresse hídrico (para ambos os eventos transgênicos), assim como a atividade da FAL. Os teores de lignina aumentou em todos os genótipos em resposta ao estresse. Desta forma, os resultados dessa pesquisa levam-nos a afirmar a existência de respostas distintas entre aplicação exógena de prolina relatada na literatura e o metabolismo endógeno celular. Não foi possível confirmar a hipótese de que o metabolismo de prolina vinculado à via pentose fosfato induz a síntese de compostos fenólicos, pois a atividade da enzima G6PDH foi menor nas plantas transgênicas nas duas condições hídricas. Sugere-se que os precursores para a via dos compostos fenólicos ligados a prolina podem ser fornecidos por outras vias metabólicas tais como a glicólise e o ciclo de Calvin. Estudos mais aprofundados serão necessários para esclarecer esta questão.

Palavras-chave: via do ácido chiquímico. estresse abiótico. via pentose fosfato.

ABSTRACT

Proline metabolism and phenolic compounds synthesis in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants submitted to water deficit

The association between proline metabolism in the plant and the pentose phosphate pathway has been proposed as a model to stimulate one of the biosynthetic routes of secondary metabolism related to the production of the different phenolic compounds in plants, known as the shikimic acid pathway. In transgenic plants in which overexpression of the *P5CS* gene Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase encoding the key enzyme of proline biosynthesis occurs, in addition to increased tolerance to abiotic stresses, there is the possibility of promoting the synthesis of phenolic compounds as a pleiotropic effect. The objective of this work was to evaluate the role of proline "*per se*" in relation to the production of phenolic compounds in transgenic tobacco plants accumulating this amino acid (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1) and to verify if water stress would modify this answer. The experiment was carried out under greenhouse conditions, at Campus II of Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente - SP. A completely randomized design was used in the factorial scheme 3x2 consisting of 3 genotypes (two transgenic events with constitutive expression 35S::*P5CSF129A* and untransformed control plants) and two levels of water regime, with daily water replenishment of 100% and 30% of field capacity (water stress). The role of proline "*per se*" was evaluated by means of biometric growth analyzes (plant height, shoot and root dry mass and leaf number) in addition to proline analyzes, glucose-6-phosphate dehydrogenase activity (G6PDH), phenylalanine ammonia lyase (PAL), total phenolic compounds in leaves and lignin. In a natural response to water stress, a reduction in biometric parameters was observed for all genotypes. The accumulation of proline occurred in a greater proportion in the transgenic plants as expected by the constitutive expression of the *P5CS* gene, but the activity of the G6PDH enzyme was lower in the transgenic plants. The link between increased proline endogenous content and increased phenol synthesis occurred both under normal hydration conditions (for E2 event) and in the presence of water stress (for both transgenic events), as well as PAL activity. Lignin contents increased in all genotypes in response to stress. Thus, the results of this research lead us to affirm the existence of distinct responses between exogenous application of proline reported in the literature and endogenous cellular metabolism. It was not possible to confirm the hypothesis that the proline metabolism linked to the pentose phosphate pathway induces the synthesis of phenolic compounds, since the activity of the G6PDH enzyme was lower in the transgenic plants in the two water conditions. It is suggested that the precursors to the pathway of phenolic compounds linked to proline may be provided by other metabolic pathways such as glycolysis and the Calvin cycle. Further study will be needed to clarify this issue.

Keywords: Shikimic acid pathway. Abiotic stress. Pentose phosphate pathway.

LISTA DE SIGLAS

ADP	– Difosfato de adenosina
APX	– Ascorbato peroxidase
ASC-GSH	– Ciclo ascorbato - glutathiona
ATP	– Trifosfato de adenosina
BSA	– Albumina de soro bovino
CaMV	– Vírus do mosaico da Couve flor
CaMV 35S	– Promotor constitutivo do vírus do mosaico da couve-flor
CQB	– Certificado de qualidade em biossegurança
DHAR	– Diidroascorbato redutase
DNA	– Ácido desoxirribonucleico
EC	– Enzyme Commission
EDTA	– Ácido etilendiamino tetraacético
EROS	– Espécies reativas de oxigênio
FAD+	– Flavina adenina dinucleotídeo
FADH2	– Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
FAL	– Fenilalanina amônia liase
G6PDH	– Glicose-6-fosfato desidrogenase
GSA	– Glutamato semi aldeído
MDHAR	– Monohidroascorbato redutase
NAD+	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida do NAD ⁺)
NADP+	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)
NADPH	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
OAT	– Ornitina δ -aminotransferase
P5C	– Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	– Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase
P5CS	– Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase
P5CSF129A	– Enzima mutante de <i>Vigna aconitifolia</i>
Pi	– Fosfato inorgânico
pH	– Potencial hidrogeniônico
PRODH	– Prolina desidrogenase
PSCR	– Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase
PVP	– Polivinilpirrolidona
RNA	– Ácido ribonucléico
UV	– Ultra-violeta
VPF	– Via pentose fosfato

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Via metabólica da biossíntese e degradação de prolina a partir do glutamato. GSA: Glutamato semi aldeído; P5C: Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato.	17
FIGURA 2 - Relação entre o metabolismo de prolina e as vias metabólicas da pentose fosfato e do ácido chiquímico.	22
FIGURA 3 - Obtenção de plantas de tabaco geração T3.	27
FIGURA 4 - Instalação do experimento e imposição do estresse hídrico.	28
FIGURA 5 – Análises biométricas das plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).	35
FIGURA 6 - Plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).	36
FIGURA 7 - Concentração de prolina nas folhas de plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).	37
FIGURA 8 - Atividade da enzima Glicose 6 – fosfato desidrogenase (G6PDH) nas folhas de plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).	38
FIGURA 9 - Atividade da enzima Fenilalanina amônia liase (FAL) nas folhas de plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).	39
FIGURA 10 - Fenóis totais nas folhas de plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).	40
FIGURA 11 – Teor de lignina nas folhas de plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resumo da análise de variância com valores de F e coeficiente de variação para altura de plantas, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de folhas (NF).34

TABELA 2 - Resumo da análise de variância com valores de F e coeficiente de variação para prolina, atividade das enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), fenilalanina amônia liase (FAL), fenóis totais e teor de lignina nas folhas.37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Prolina como molécula do estresse	16
3.2	Mecanismos de proteção ao estresse envolvendo prolina	18
3.3	Metabolismo de prolina ligado à via pentose fosfato e produção de compostos fenólicos	20
3.4	Compostos fenólicos e sistema antioxidante	23
3.5	Tabaco transgênico para produção de prolina.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Material vegetal e obtenção da geração T3.....	26
4.2	Instalação do experimento.....	27
4.3	Análises biométricas	29
4.3.1	Altura das plantas.....	29
4.3.2	Massa seca de parte aérea e da raiz	29
4.3.3	Número de folhas	29
4.4	Análises bioquímicas	29
4.4.1	Conteúdo de prolina nas folhas.....	29
4.4.2	Atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	30
4.4.3	Atividade da enzima fenilalanina amonia liase (FAL)	31
4.4.4	Fenóis totais nas folhas.....	31
4.4.5	Teor de lignina nas folhas	31
4.5	Análise Estatística.....	32
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

A relação entre o acúmulo do aminoácido prolina e o aumento da tolerância à estresses abióticos tem sido estudado em plantas pela manipulação exógena e endógena dos níveis de prolina (SZABADOS; SAVOURE, 2010; KAUR; ASTHIR, 2015; YAISH, 2015).

O metabolismo de prolina envolve duas enzimas que catalisam sua biossíntese a partir do glutamato, sendo elas Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase - P5CS e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase - P5CR, e duas enzimas que catalisam a degradação, a prolina desidrogenase - PRODH e a pirrolina-5-carboxilato desidrogenase - P5CDH. Porém, a enzima P5CS é limitante no processo de biossíntese da prolina, sendo inibida pelo acúmulo deste aminoácido (SZABADOS; SAVOURE, 2010).

Entre vários mecanismos de atenuação do estresse, o ciclo prolina-P5C - Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato pode ajudar a manter níveis apropriados de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ no citosol, direcionando a via pentose fosfato (VPF) (PHANG, 1985). A ciclagem de prolina e P5C via PRODH e P5CR resulta na transferência de moléculas redutoras do citosol para a mitocôndria (MILLER et al., 2009; PHANG, 1985). Desta forma, acredita-se que o fluxo metabólico da prolina ajude a manter uma apropriada razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, estimulando a via oxidativa pentose fosfato, a qual por sua vez poderia estimular a produção de compostos fenólicos. Este modelo provê um fundamento científico para o desenvolvimento de diferentes dinâmicas metabólicas como estratégia para a estimulação da biossíntese de compostos fenólicos em plantas alimentícias (alimentos funcionais) e medicinais (fitoterápicos), com a finalidade última de promoção da saúde humana. Tal modelo é passível de ser aplicado em diferentes espécies vegetais (SARKAR; SHETTY, 2014).

Plantas geneticamente modificadas com alto acúmulo endógeno de prolina não sofrem a retroinibição com o gene *P5CS* mutado no sítio F129A, promovendo-se maior acúmulo de prolina nos tecidos, e permitindo dessa maneira verificar a hipótese de que a ativação da via pentose fosfato pelo aumento da biossíntese de prolina pode estimular a síntese de compostos fenólicos, visto que muitos estudos têm utilizado prolina exógena para aumentar níveis de metabólitos secundários em plantas (KWOK; SHETTY, 1998; YANG; SHETTY, 1998). Estudos

com a utilização de plantas geneticamente modificadas para o alto acúmulo de prolina relacionados com o aumento na produção de compostos fenólicos ainda são inexistentes na literatura.

Diante do exposto, esta pesquisa pretendeu confirmar a hipótese de que o metabolismo de prolina endógena vinculado à via pentose fosfato induz o aumento da síntese de compostos fenólicos, além de avaliar se o estresse hídrico modificaria essa resposta. Para tanto, foram utilizadas plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) geneticamente modificadas com super-expressão constitutiva do gene que codifica a enzima chave na biossíntese de prolina (Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase - P5CS), comparando-as com plantas não transformadas sob dois níveis de regime hídrico.

2 OBJETIVO

Este estudo teve por objetivo avaliar o papel da prolina “*per se*” em relação à produção de compostos fenólicos em plantas transgênicas de tabaco acumuladoras deste aminoácido. Adicionalmente, buscou-se verificar se o estresse hídrico modificaria essa resposta.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Prolina como molécula do estresse

Em resposta a variadas condições de estresse, as plantas acumulam ampla quantidade de solutos compatíveis (SERRAJ; SINCLAIR, 2002). Solutos compatíveis são moléculas orgânicas de baixo peso molecular, altamente solúveis e geralmente não tóxicas em altas concentrações celulares. Estes solutos fornecem proteção às plantas contra o estresse, contribuindo para o ajuste osmótico celular, desintoxicação de EROS – Espécies Reativas de Oxigênio, proteção da integridade da membrana e estabilização de enzimas e proteínas (YANCEY, 1994, BOHNERT; JENSEN, 1996; ASHRAF; FOOLAD, 2007). Entre os solutos compatíveis incluem-se a prolina, sacarose, polióis, trealose e compostos quaternário de amônio tais como glicina betaína, alanina betaína e prolina betaína (HAYAT et al., 2012).

O acúmulo do aminoácido prolina tem sido observado em diferentes tipos de organismos, incluindo protozoários, eubactérias, invertebrados marinhos e também em várias espécies de plantas sob condições de estresse (VERSLUES; SHARMA, 2010). Este acúmulo tem sido relatado durante condições de seca, salinidade, alta luminosidade, radiação UV, metais pesados, estresse oxidativo e em resposta a estresses bióticos (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; MILLER et al., 2009).

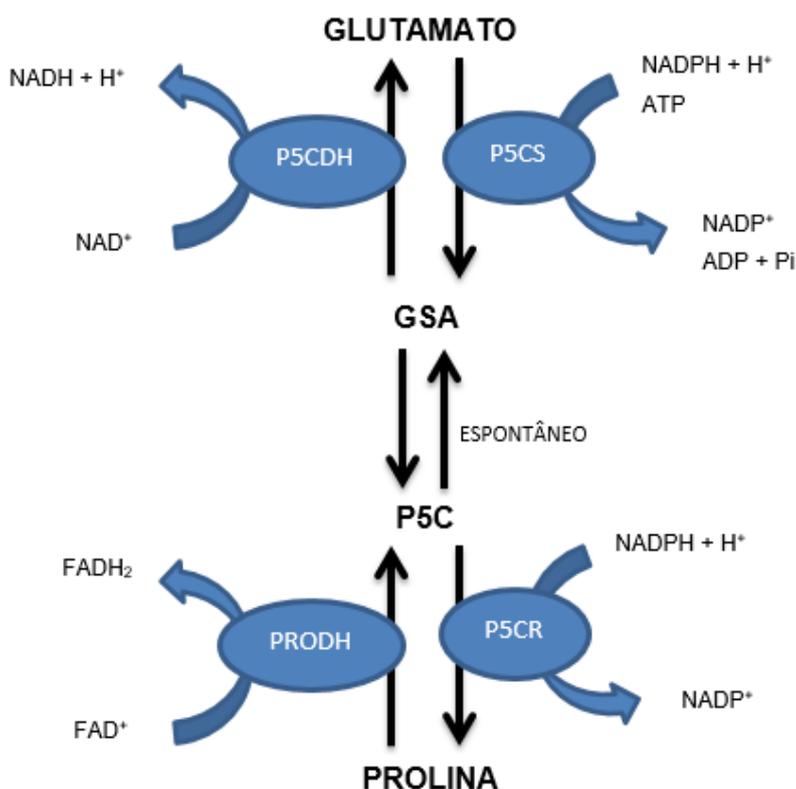
Os níveis intracelulares de prolina nas plantas são regidos pela sua biossíntese, catabolismo, transporte entre células e diferentes compartimentos celulares (SZABADOS; SAVOURE, 2010).

Em plantas, o aminoácido L-prolina é sintetizado no citoplasma ou cloroplasto via glutamato e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) por duas sucessivas reduções, as quais são catalisadas pelas enzimas P5C sintetase - P5CS (EC 2.7.2.11/1.2.1.41) e P5C redutase - P5CR (EC 1.5.1.2) (HARE; CRESS; STADEN, 1999) ou, alternativamente, a partir de ornitina, pela enzima ornitina δ -aminotransferase - OAT (EC 2.6.1.13) (LUTTS; MAJERUS; KINET, 1999). O acúmulo de prolina também depende da sua via de catabolismo. A degradação de prolina em plantas é restrita à mitocôndria e catalisada por duas enzimas. A prolina desidrogenase - PRODH (EC 1.5.99.8) catalisa a conversão de prolina em P5C que

é, então, oxidada a glutamato pela P5C desidrogenase - P5CDH (EC 1.5.1.12) (SZABADOS; SAVOURE, 2010).

A partir de ornitina, a prolina pode ser sintetizada por duas rotas, ambas envolvendo a transaminação da ornitina, seguida pela sua ciclização e redução (SZABADOS; SAVOURE, 2010; VERSLUES; SHARMA, 2010). Em condições de estresse osmótico a via glutamato é predominante em plantas (DELAUNEY; VERMA, 1993).

FIGURA 1 - Via metabólica da biossíntese e degradação de prolina a partir do glutamato. GSA: Glutamato semi aldeído; P5C: Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato.



Fonte: Adaptado de Liang et al. (2013).

O acúmulo de prolina e a tolerância ao estresse têm sido estudados em plantas pela manipulação exógena e endógena dos níveis de prolina. Sob condições de estresse, o aumento de prolina em plantas envolve a regulação recíproca das enzimas P5CS e PRODH. Em tabaco, a superexpressão da enzima P5CS resulta em maiores níveis de prolina, aumentando a osmotolerância, a biomassa de raízes e desenvolvimento de flores (HARE; CRESS; STADEN, 1999; HONG et al., 2000).

3.2 Mecanismos de proteção ao estresse envolvendo prolina

Durante muito tempo, a prolina foi considerada como um osmólito compatível inerte que protegia estruturas subcelulares e macromoléculas sob estresse osmótico (CSONKA; HANSON, 1991; HARE; CRESS, 1997; KAVI KISHOR et al., 2005).

A prolina tem se apresentado como uma chaperona química de proteínas e evita a agregação de proteínas (KUMAR et al., 1998; SAMUEL et al., 2000) e termodesnaturação. Devido à propriedade da prolina em atuar como chaperona, tem sido proposto que a proteção ao estresse envolve o aumento e a estabilização de importantes enzimas antioxidantes em plantas, aumentando a sua atividade e conseqüentemente, resultando em aumento de tolerância ao estresse (HOQUE et al., 2008; ISLAM et al., 2009; CHEN; DICKMAN, 2005; XU; YIN; LI, 2009). Entre as enzimas antioxidantes são citadas a catalase, a superóxido dismutase e as enzimas relacionadas à glutatona e ao ciclo ascorbato-glutaciona (HOQUE et al., 2008). Esta última enzima é especialmente crítica para mitigar as espécies reativas de oxigênio (EROS) (NOCTOR; FOYER, 1998).

Outro mecanismo pelo qual a prolina protege as células contra o estresse envolve a quelação de metais. O teor elevado de prolina em plantas tolerantes a metais não é incomum (SHARMA; DIETZ, 2006). Uma das principais toxicidades dos metais pesados é a perturbação do balanço redox celular pela produção de EROS. Um agente oxidante potente de macromoléculas biológicas na célula é o radical hidroxila (OH^\cdot), que é formado pela redução de H_2O_2 por íons de metais de transição tais como Cu^+ e Fe^{2+} (SHARMA; DIETZ, 2009). A função da prolina como quelante de metal foi sugerida por Sharma, Schat e Vooijs (1998), que relataram que a prolina pode proteger as enzimas da inibição induzida por zinco e cádmio formando complexos prolina-metal.

Estudos indicam que a prolina também é responsável pela remoção de EROS e outros radicais livres (SMIRNOFF; CUMBES, 1989; CHEN; DICKMAN, 2005; BOHNERT; NELSON; JENSEN, 1995; HONG et al., 2000; NIYOGI, 1999; NOCTOR; FOYER, 1998; OKUMA et al., 2004), mecanismo esse que se dá pela fácil reação entre a prolina e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Devido a esta ação da prolina como dissipadora (“quencher”) de $^1\text{O}_2$, a mesma pode ajudar na estabilização de proteínas, DNA e membranas (MATYSIK; ALIA BHALU; MOHANTY, 2002).

Além dessas propriedades, o ciclo prolina-P5C pode ajudar a manter níveis apropriados de $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ no citosol, direcionando a via pentose fosfato (PHANG, 1985). A ciclagem de prolina e P5C via PRODH e P5CR resulta na transferência de moléculas redutoras do citosol para a mitocôndria (MILLER et al., 2009; PHANG, 1985). Desta forma, acredita-se que o fluxo metabólico da prolina ajude a manter uma apropriada razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, estimulando a via oxidativa pentose-fosfato, a qual por sua vez poderia possibilitar a biossíntese do nucleotídeo purina durante a recuperação do estresse (HARE; CRESS, 1997; KOHL et al., 1988).

Decréscimos significantes na razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ tem sido observado em diferentes condições de estresse, devido a uma menor atividade do Ciclo de Calvin (HARE; CRESS, 1997; SZABADOS; SAVOURE, 2009). Desta maneira, na ausência de níveis suficientes de NADP^+ para a ocorrência do transporte de elétrons, as células fotossintéticas sob condição de estresse produzem mais $^1\text{O}_2$ quando expostas à alta luminosidade. Entretanto, a exposição à luz promove a expressão da enzima P5CS, direcionando para um aumento na biossíntese de prolina e dos níveis de NADP^+ , o que em última análise diminui a produção de $^1\text{O}_2$ nos cloroplastos (LIANG et al., 2013).

Outro importante sistema de defesa das plantas para proteger as células contra os EROS destrutivos é o ciclo ascorbato-glutationa (ASC-GSH) (NOCTOR; FOYER, 1998). A aplicação exógena de prolina regula positivamente as atividades das enzimas no ciclo ASC-GSH. As atividades das enzimas APX (ascorbato peroxidase), MDHAR (monohidro ascorbato redutase) e DHAR (dihidro ascorbato redutase), que são componentes do ciclo ASC-GSH, foram significativamente aumentadas pela aplicação exógena de prolina em culturas de tabaco expostas ao estresse salino (HOQUE et al., 2008).

A superprodução de espécies reativas de oxigênio causam danos intracelular pela ação destas nas moléculas biológicas. Entretanto, as EROS são também importantes moléculas sinalizadoras que desencadeiam respostas adaptativas e de sobrevivência através da regulação da morte celular, proliferação e apoptose (FINKEL; HOLBROOK, 2000; WINTERBOURN, 2008). Desta forma, a ampla gama de efeitos da prolina sobre os processos celulares pode ser devida, em parte, à função sinalizadora das EROS na célula vegetal. O aumento na formação endógena de EROS devido ao metabolismo de prolina em plantas tem importante

função na sinalização celular (SZABADOS; SAVOURE, 2010). Sugere-se que a enzima PRODH (envolvida na degradação de prolina em glutamato) pode participar na resposta hipersensitiva de plantas à patógenos, auxiliando na indução de morte celular e impedindo o crescimento do patógeno (CECCHINI; MONTEOLIVA; ALVAREZ, 2011).

Hayat et al. (2012), ressaltou em seu trabalho a importância da prolina em várias situações de estresse, porém aplicada exogenamente, e que em doses elevadas pode conceder efeitos tóxicos. Entretanto Molinari et al. (2004) destacou a prolina endógena no ajustamento osmótico em plantas sob estresse hídrico e Campos et al. (2011) demonstrou que a prolina desempenhou um papel de tolerância ao estresse por seca em plantas transgênicas de Citrumelo 'Swingle' devido à sua ação como mediador de ajustamento osmótico, mediador e protetor contra os danos por radicais livres, como removedor de EROS e modulador de atividade de enzimas antioxidantes.

3.3 Metabolismo de prolina ligado à via pentose fosfato e produção de compostos fenólicos

Além da geração básica de energia, o processo respiratório em plantas é relacionado com outras vias do metabolismo de carbono. Vários compostos intermediários da respiração podem ser desviados para as vias de biossíntese de compostos essenciais para o metabolismo celular, servindo de esqueletos carbônicos. Neste sentido, a via pentose fosfato (VPF) é ligada ao Ciclo de Krebs e através dela são produzidas moléculas de açúcares de cinco carbonos (ribose e xilose, por exemplo), que são fundamentais para a síntese de DNA e RNA e para a síntese de polissacarídeos de grande importância nos tecidos vasculares (xilanos). É dessa via também que surgem as citocininas, as quais exercem papel crucial no desenvolvimento vegetal (BUCKERIDGE et al., 2008).

A via pentose fosfato desempenha diversos papéis no metabolismo vegetal, tais como: suprimento de NADPH para reações redox biossintéticas, suprimento de NADPH para a respiração, suprimento de substratos biossintéticos e geração de intermediários do ciclo de Calvin (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Shetty (1997) e Kwok e Shetty (1997) propuseram que a síntese de prolina, a qual envolve as reduções subsequentes do glutamato e pirrolina-5-carboxilato em prolina, pode estimular a via pentose fosfato em plantas.

A eritrose-4-fosfato, um intermediário da VPF, é utilizada como substrato para a via do ácido chiquímico, que por sua vez controla a via dos fenilpropanóides responsável pela produção de compostos fenólicos em plantas (SHETTY, 1997; KWOK; SHETTY, 1997).

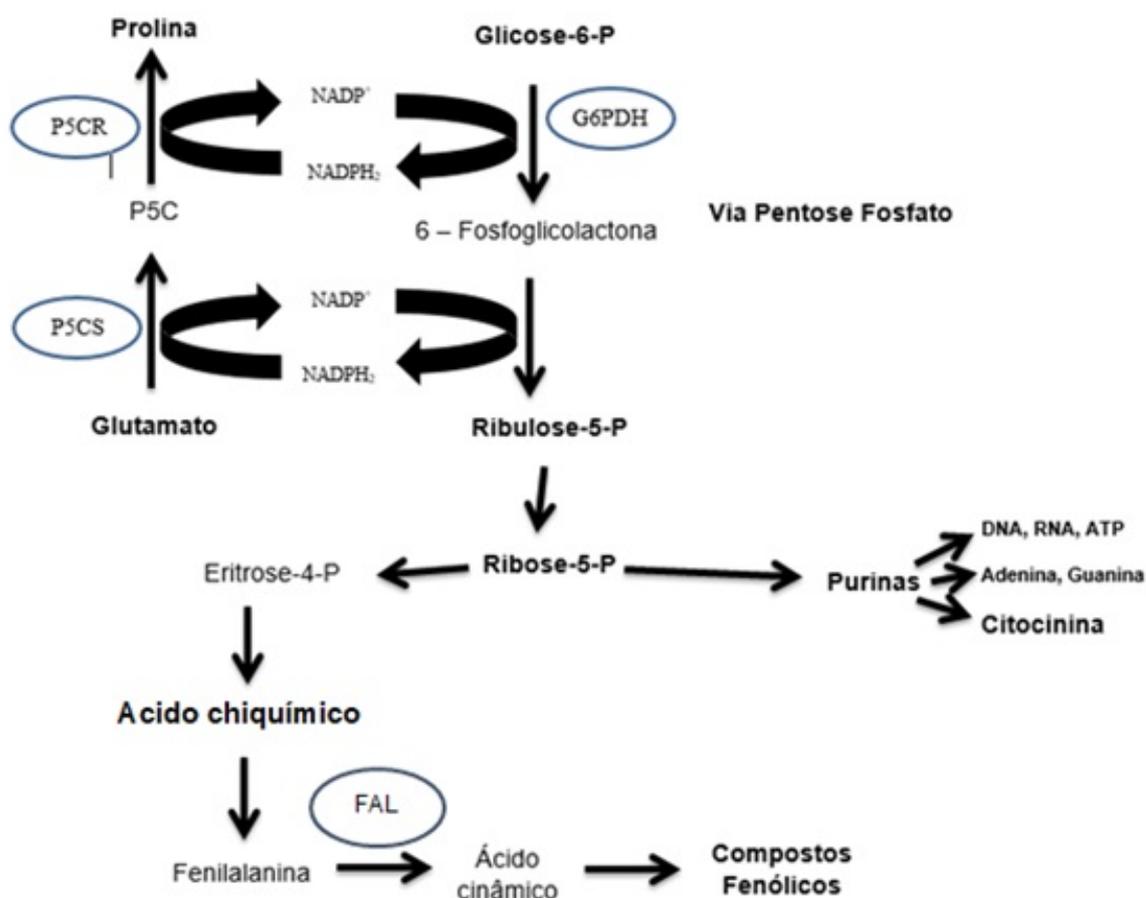
O primeiro passo limitante da via pentose fosfato é controlado pela atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (PHANG, 1985), a qual converte glicose-6-fosfato em 6-fosfoglicolactona e também produz equivalentes redutores como o NADPH (nicotinamida adenosina difosfato hidrogênio) para reações celulares anabólicas (Figura 2).

A prolina, em associação com a via pentose fosfato, pode exercer função essencial na regulação metabólica deste mecanismo de defesa das plantas (HARE; CRESS; STADEN, 1999; SHETTY, 2004). A demanda de NADPH para a síntese de prolina no citosol pode aumentar a relação $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ e ativar a enzima G6PDH, a qual catalisa a primeira reação limitante da VPF (SHETTY, 2004). Os direcionamentos para a proposição deste modelo foram obtidos quando um análogo da prolina (azetidina-2-carboxilato), o qual é inibidor da enzima prolina desidrogenase, foi utilizado. Ponderou-se que uma maior tolerância a este análogo poderia estimular a biossíntese de prolina, a qual direciona a demanda de NADPH e desta forma a síntese de compostos fenólicos. Em sistemas vegetais, as correlações entre prolina e G6PDH também foram associadas com o conteúdo de fenóis, o potencial de polimerização dos fenóis pela guaiacol peroxidase e a capacidade antioxidante baseada na atividade removedora de radicais livres de fenóis e de enzimas antioxidantes como a SOD (SHETTY, 2004).

Este modelo provê um fundamento científico para o desenvolvimento de diferentes dinâmicas metabólicas como estratégia para a estimulação da biossíntese de compostos fenólicos em plantas alimentícias categorizadas como alimentos funcionais e plantas medicinais (empregadas na produção de fitoterápicos), com a finalidade última de promoção da saúde humana. Tal modelo é passível de ser aplicado em diferentes espécies vegetais (SARKAR; SHETTY, 2014).

Outra enzima chave envolvida na produção de compostos fenólicos é a fenilalanina amônia liase (FAL), que catalisa a conversão por desaminação do aminoácido L-fenilalanina, em ácido trans-cinâmico, evento esse que é o primeiro passo na biossíntese dos fenilpropanóides. A FAL desempenha um papel crucial entre o metabolismo primário e secundário (WANNER et al., 1995).

FIGURA 2 - Relação entre o metabolismo de prolina e as vias metabólicas da pentose fosfato e do ácido chiquímico.



Fonte: Adaptado de Shetty; MacCue (2003) e Caretto et al. (2015).

3.4 Compostos fenólicos e sistema antioxidante

Compostos fenólicos (também conhecidos como polifenóis) são encontrados em plantas e incluem os ácidos fenólicos, flavonóides, ligninas, estilbenos, taninos, cumarinas e antocianinas. Estruturalmente, os compostos fenólicos possuem um anel aromático com um ou mais radicais hidroxila (OH), incluindo seus derivativos funcionais (RICE-EVANS, 1995). Quimicamente, os compostos fenólicos podem ser desde moléculas simples tais como os ácidos fenólicos com um único anel aromático em sua estrutura, denominados de fenilpropanóides (como por exemplo, os ácidos cafeico, ferúlico, clorogênico), até compostos altamente polimerizados, denominados de fenóis complexos (tais como os taninos, flavonóides e lignina) (RICE-EVANS, 1995).

Entre os grupos de metabólitos secundários, os compostos fenólicos formam o grupo mais numeroso e amplamente distribuído de produtos naturais no reino vegetal, e atualmente são conhecidas mais de 8000 estruturas fenólicas, dentre elas mais de 4000 flavonóides (TSAO, 2010).

Nas plantas, os compostos fenólicos podem atuar como inseticidas, antimicrobianos, substâncias sinalizadoras, atraentes de polinizadores, agentes de proteção contra a radiação ultra-violeta e constituintes da parede celular (SHAHIDI; NACZK, 2004). Dentre as várias funções fisiológicas que os compostos fenólicos exercem nas células vegetais, a mais significativa é a ação antioxidante contra o estresse oxidativo (CLOSE; MCARTHUR, 2002).

Antioxidantes são definidos como substâncias químicas presentes em baixas concentrações, comparados aos metabólitos primários das plantas, tais como proteínas, lipídeos e carboidratos; os quais atrasam ou impedem a oxidação de substratos (ARUOMA, 1999). Os compostos fenólicos podem atuar como antioxidantes pela supressão do oxigênio singleto ou de radicais livres nas células (RICE-EVANS, 1995). A propriedade antioxidante se deve principalmente à sua habilidade em doar hidrogênios dos grupos hidroxila posicionados ao longo do anel benzênico, a fim de impedir a oxidação de lipídeos e outras biomoléculas (FOTI et al., 1994). Compostos fenólicos também combatem os radicais livres através da ativação de enzimas antioxidantes (SHETTY; WAHLQVIST, 2004).

O sistema de defesa das plantas pode envolver compostos antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular, tal como ascorbato,

glutathiona, α -tocoferol, carotenoides e fenilpropanóides; em conjunto com várias enzimas antioxidantes, incluindo a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases (PO), glutathiona redutase e ascorbato peroxidase (APX) (RAO; PALIYATH; ORMROD, 1996; BOWLER et al., 1994; CREISSEN; EDWARDS; MULLINEAUX, 1994; PINHERO et al., 1997).

O grau em que a atividade de enzimas antioxidantes e a quantidade de compostos antioxidantes aumentam sob estresse hídrico é extremamente variável entre espécies de plantas e até mesmo entre duas cultivares da mesma espécie. O nível de resposta depende da espécie, do estágio de desenvolvimento e do estado metabólico da planta, bem como a duração e intensidade do estresse. Muitas situações de estresse causam aumento na atividade antioxidante foliar (PASTORI; MULLINEAUX; FOYER, 2000).

A enzima SOD é considerada uma primeira barreira enzimática contra o estresse oxidativo por converter o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (FRIDOVICH, 1995). O produto da dismutação do superóxido pela SOD, o H_2O_2 , deve ser removido a fim de evitar sua conversão em radicais mais reativos, como o OH^{\cdot} e para isso, diversas enzimas como CAT e APX atuam reduzindo o H_2O_2 a H_2O (PERL-TREVES; PERL, 2002).

3.5 Tabaco transgênico para produção de prolina

O tabaco é utilizado como planta-modelo por apresentar algumas vantagens em relação a outras espécies, como, ser uma espécie autógama, de ciclo anual, facilmente manipulada em experimentos genéticos e, por ser muito próxima filogeneticamente de outras plantas de interesse econômico. Desta forma, plantas de tabaco são frequentemente usadas como modelo em estudos da funcionalidade de genes utilizando ferramentas biotecnológicas. É reconhecida como planta modelo para transformação genética vegetal devido a sua alta taxa de regeneração *in vitro*, seu genoma relativamente pequeno (o que facilita as manipulações moleculares), potencial de produção rápida em larga escala devido ao ciclo curto e a grande produção de sementes (DUNG et al., 2006; ROMMENS, 2006).

A utilização de plantas geneticamente modificadas com alto acúmulo endógeno de prolina permite verificar a hipótese de que a ativação da via pentose fosfato pelo aumento da biossíntese de prolina pode estimular a síntese de

compostos fenólicos, visto que alguns estudos têm utilizado prolina exógena para aumentar níveis de metabólitos secundários em plantas (KWOK; SHETTY, 1998; YANG; SHETTY, 1998).

Como a enzima P5CS é limitante no processo de biossíntese da prolina, sendo inibida pelo acúmulo do aminoácido, a enzima mutante P5CSF129A de *Vigna aconitifolia* não sofre inibição pela substituição do aminoácido fenilalanina pela alanina na posição 129, promovendo maior acúmulo de prolina nos tecidos (ZHANG; LU; VERMA, 1995).

Plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) super-expressando o gene *P5CS* o qual codifica a enzima P5CS (proveniente de *Vigna aconitifolia*) sob o controle do promotor constitutivo CaMV 35S (isolado de vírus) produzem até 10 vezes mais prolina comparadas com plantas controles em condições normais (BORGIO; MARUR; VIEIRA, 2015). Em condições de estresse salino, as plantas de tabaco transformadas acumularam três vezes mais prolina do que as plantas controle, o que resultou em maior tolerância ao estresse (KAVIKISHOR et al., 1995; HONG et al., 2000).

Quanto ao uso de promotores, os constitutivos direcionam a expressão gênica uniformemente na maioria dos tecidos e células em todas as fases de crescimento e desenvolvimento da planta, conferindo elevados níveis de expressão do transgene quando transferidas para células vegetais (DUTT et al., 2014). O promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV 35S ou simplesmente 35S) é o mais utilizado na transformação de plantas (PORTO et al., 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e obtenção da geração T3

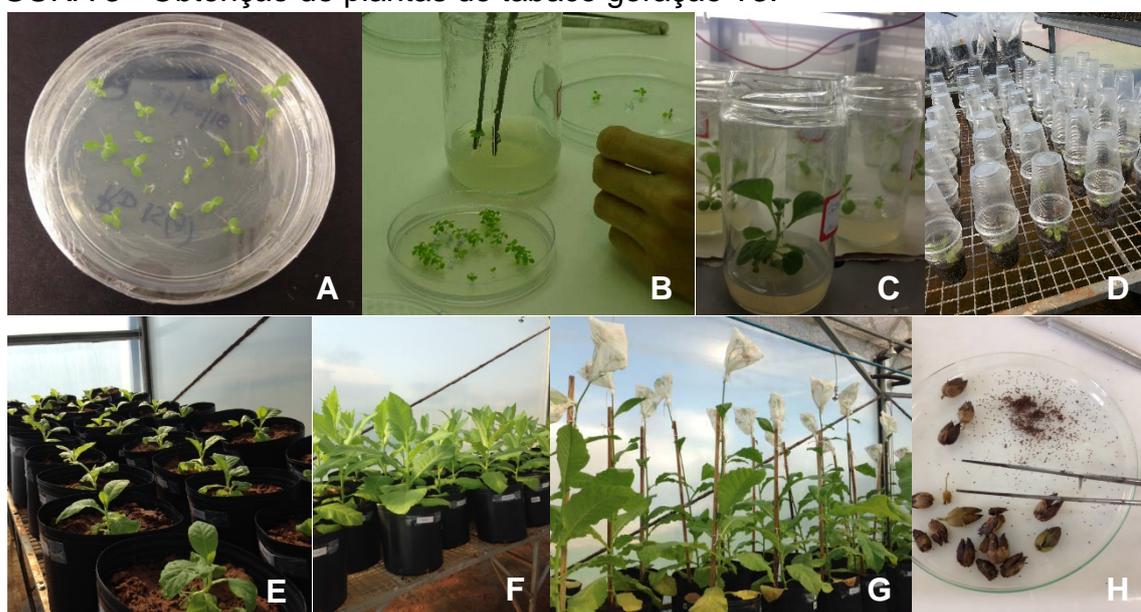
Foram utilizadas sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1), obtidas por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA 105. O vetor binário usado foi o: *i.* pBI121-P5CSF129A (ZHANG; LU; VERMA, 1995) contendo o gene *P5CSF129A* sob controle do promotor 35S (constitutivo), e o gene *NPTII* o qual confere resistência na planta ao antibiótico canamicina. A transformação do tabaco e a obtenção da geração T2 foi realizada por Borgo et al. (2015). Para atingir homozigose, foi conduzida a obtenção da geração T3.

Eventos independentes foram selecionados para o experimento por apresentarem apenas uma ou duas cópias do transgene (BORGGO et al., 2015). As sementes T2 dos eventos denominados E1, E2 (correspondentes aos eventos 35S2(8) e 35S8(4) respectivamente) e do controle não transgênico foram lavadas separadamente com álcool 70% durante 15 s, centrifugadas 1 min a 10.000 rpm, novamente lavadas em NaOCl 2,5% durante 10 min, centrifugadas 1 min a 10.000 rpm e finalmente lavadas 3 vezes em água destilada autoclavada e centrifugadas 1 min a 10.000 rpm. Para a germinação *in vitro* foram utilizadas placas de Petri contendo 25 ml de meio de cultura constituído de sais do meio MS (pH 5,7) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com concentração reduzida pela metade, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado com 8 g L⁻¹ de ágar. O meio foi autoclavado por 20 min a 121 °C. Foi adicionado ao meio 50 mg L⁻¹ de canamicina (esterilizada por filtração), exceto no meio do controle não transgênico. As placas foram incubadas por 3 dias no escuro a 25 °C e depois colocadas sob luz (30 µmol m⁻² s⁻¹) em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16/8 h (luz/escuro).

Aproximadamente 25 dias após a semeadura foram selecionadas as plântulas dos eventos transgênicos e controle que apresentaram maior vigor e homozigose. As plântulas foram transferidas para frascos de vidro maiores contendo 50 ml do meio MS com concentração dos sais reduzida pela metade, onde permaneceram em câmara de cultivo por um período de 30 dias. Plantas com 10 cm de altura foram transferidas e aclimatizadas em copos plásticos de 500 ml contendo substrato orgânico Carolina Padrão® e finalmente transferidas para vasos plásticos

com capacidade de 20 L contendo solo corrigido em casa de vegetação, irrigadas duas vezes por dia até capacidade de campo e aplicados 400 ml por vaso de solução nutritiva de Hoagland, duas vezes por semana. Embora as plantas de tabaco sejam autógamas, as inflorescências foram protegidas com saquinhos de tecido para evitar dispersão de sementes de plantas geneticamente modificadas, respeitando normas de biossegurança, e assim foram cultivadas até obtenção de sementes geração T3 que foram posteriormente utilizadas para o experimento.

FIGURA 3 - Obtenção de plantas de tabaco geração T3.



A: Germinação *in vitro*; B: Transferência das plântulas para frascos; C: Crescimento *in vitro*; D: Aclimatização das plantas; E: Transplântio para vasos com solo; F: Crescimento em casa de vegetação; G: Florescimento; H: Coleta das sementes. Fonte: Autor.

4.2 Instalação do experimento

A pesquisa foi conduzida em casa de vegetação climatizada, instalada na Área Experimental da Faculdade de Agronomia da UNOESTE, Campus II em Presidente Prudente/SP (CQB 346/12), localizada a 22°06'59"S, 51°27'02"W e altitude de 475 m, durante o período de junho a agosto de 2016.

Sementes recém-colhidas de tabaco apresentam dormência, assim a geração T3, dos eventos E1, E2 e controle não transgênico foram submetidas a tratamento de quebra de dormência por hipoxia, colocadas sob imersão em água destilada por 2 horas. A germinação das sementes foi realizada em bandeja contendo solo corrigido e adubado conforme análise química de macro e

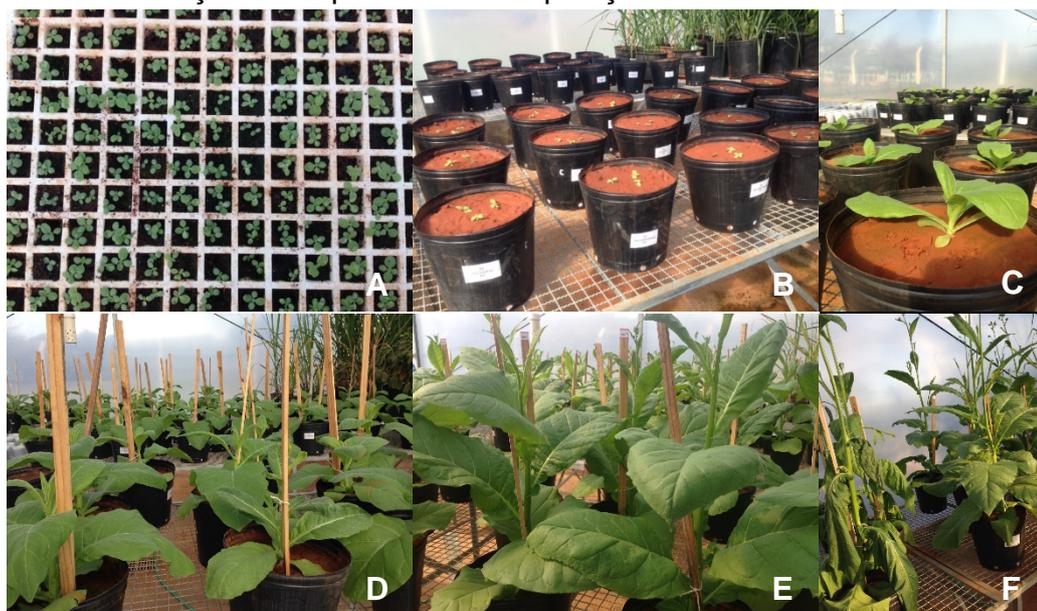
micronutrientes (Anexos 1, 2 e 3) e substrato comercial orgânico Plantimax[®] na proporção 1:1, realizando-se irrigação constante para manter a umidade do substrato.

Aos 20 dias após a germinação foi realizado o transplântio de três plantas por vaso, estes contendo 10 kg de solo peneirado, com reposição diária de água de 100% da capacidade de campo para todos os tratamentos. Após estabelecimento das plantas, foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta por vaso e estaqueamento para evitar danos de tombamento na manipulação dos vasos.

A imposição do déficit hídrico foi iniciada aos 30 dias após a transferência das plantas para os vasos, através do método gravimétrico, de acordo com a pesagem diária e reposição da quantidade de água evapotranspirada até alcançar 30% da capacidade de campo. Os tratamentos controle foram mantidos com reposição diária de água de 100% da capacidade de campo.

Após 11 dias do início da imposição do déficit hídrico, foi realizada a coleta de todas as plantas para as determinações biométricas, acondicionando as amostras em sacos de papel kraft identificados e para as análises bioquímicas as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C.

FIGURA 4 - Instalação do experimento e imposição do estresse hídrico.



A: Germinação em bandeja; B: Transplântio para vaso; C: Desbaste; D: Estaqueamento; E: Crescimento sem imposição de déficit hídrico; F: Imposição de déficit hídrico (genótipos dispostos aleatoriamente). Fonte: Autor.

4.3 Análises biométricas

4.3.1 Altura das plantas

A altura das plantas foi avaliada utilizando régua graduada medindo da base da planta até o ápice caulinar, expressa em centímetros.

4.3.2 Massa seca de parte aérea e da raiz

A massa seca da parte aérea e radicular foi medida separando-se os materiais em sacos de papel kraft identificados e colocados para secar em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C, até obtenção de massa constante, aferida em balança de precisão com resultados expressos em gramas.

4.3.3 Número de folhas

O número de folhas de cada planta foi obtido através da contagem, considerando-se as folhas com tamanho aproximado acima de 7 cm.

4.4 Análises bioquímicas

As análises foram realizadas utilizando a sexta folha (contadas a partir do ápice), retiradas do terço médio superior das plantas, a saber:

4.4.1 Conteúdo de prolina nas folhas

A determinação de prolina nas folhas foi realizada conforme metodologia descrita por Bates; Waldren, Teare (1973). Foram macerados 100 mg de tecido foliar, com adição de 6 ml de ácido sulfosalicílico (3%) e filtrados em papel Whatman número 2, sempre mantendo os tubos no gelo. Foram coletados 2 ml do

filtrado e acrescentados 2 ml da solução de ninidrina ácida (1,25 g de ninidrina; 30 ml de ácido acético glacial; 20 ml de ácido fosfórico 6 M) e 2 ml de ácido acético glacial. As amostras foram então incubadas a 100 °C por 60 min e, em seguida, transferidas para gelo. Após incubação, foram acrescentados 4 ml de tolueno à mistura reacional, e agitados em vortex por 20 segundos. O cromóforo contendo tolueno foi retirado da fase aquosa e realizado a leitura por espectrofotometria (520 nm), usando o tolueno como branco. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de prolina foi determinada usando uma curva padrão e expressa em μmol de prolina g^{-1} peso fresco.

4.4.2 Atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A extração foi realizada a partir de 300 mg de tecido foliar, suspenso em 600 μl de solução contendo 50 mM Tris-HCl a pH 8,0, 5 mM MgCl_2 , 4 mM EDTA, 10% glicerol, 15 μM NADP^+ , 1 ml/ 30 g Cocktail inibidor de protease (Sigma P9599). A atividade da G6PDH foi determinada de acordo com o método descrito por Castiglia et al. (2015), por monitoramento da redução do NADP^+ a 340 nm utilizando espectrofotômetro. A mistura do ensaio conteve: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM MgCl_2 , 1,5 mM NADP^+ , 30 mM glicose-6P, e de 10-100 μl do extrato. Atividade expressa como nmol de NADP^+ min^{-1} mg^{-1} proteína.

Para a quantificação de proteína foi realizada extração com 300 mg de tecido foliar fresco macerado e homogeneizados em 2 ml tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,3), PVP 1% (p/v), previamente resfriado a 4 °C. Após centrifugação por 10 min a 4 °C em 7500 rpm, o sobrenadante foi transferido a um novo tubo e mantido no gelo até o momento das análises. Os extratos foram submetidos à quantificação de proteínas totais, realizada pelo método Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA 0 – 15 μg μL^{-1}) como padrão. As análises foram realizadas em triplicata.

4.4.3 Atividade da enzima fenilalanina amonia liase (FAL)

Foi pesado 1,0 g de folhas, as quais foram colocadas no almofariz, sendo acrescentado 50 mg de polivinilpirrolidona (PVP) e nitrogênio líquido. As folhas foram maceradas com o auxílio de um pistilo e imediatamente acrescentados 3 ml da solução-tampão TRIS (0,5 M, pH 8,5), contendo 1mM de EDTA. A mistura foi homogeneizada e em seguida centrifugada por 10 minutos, a 10.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos de eppendorf e procedeu-se a avaliação da atividade enzimática. Foi pipetado 0,5 ml do extrato enzimático para tubos de ensaio e acrescentado 2,0 ml de solução tampão TRIS-EDTA (0,5 M, pH 8,5), e 0,5 ml de solução de fenilalanina (300 µM), sendo incubado em banho-maria a 40 °C, por 1 hora. A prova em “branco” foi preparada usando-se água destilada em vez da fenilalanina para cada tratamento testado. As análises foram realizadas em triplicata. Após a incubação, os tubos foram transferidos imediatamente para banho de gelo, com o objetivo de encerrar a reação. As leituras espectrofotométrica foram realizadas a 290 nm e para os cálculos foi utilizado o coeficiente de extinção molar $10^4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ZUCKER, 1965). Os resultados foram expressos em Kat mg de proteína⁻¹.

4.4.4 Fenóis totais nas folhas

Determinado a partir do extrato bruto etanólico (obtido de folhas novas e folhas adultas) utilizando-se o reagente *Folin-Ciocalteu* e solução de carbonato de sódio (SINGLETON; ROSSI, 1965). Para a elaboração da curva analítica padrão foi utilizado o ácido gálico nas concentrações de 5 a 70 µg mL⁻¹ e as concentrações de fenóis foram expressas em µg mL⁻¹ de equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata.

4.4.5 Teor de lignina nas folhas

Determinação por meio da fibra em detergente ácido (FDA) segundo metodologia descrita por Van Soest (1963, 1967). Foi pesado em tubo de digestão,

0,35 g de amostra seca a 65 °C e triturada em moinho com peneira de malha 20 a 30. Adicionou-se 35 ml de solução detergente ácida, levou-se ao bloco digestor, colocando-se em funis para condensação dos vapores (evitando a perda de solução). Após permanência em ebulição (aproximadamente 125 °C) por 60 minutos, a solução foi transferida para cadinho filtrante (previamente mantido por uma hora a 105 °C) sendo pesada e filtrada com auxílio de vácuo, lavando-se o resíduo aproximadamente três vezes com água fervente, ou até não haver mais espuma. Em seguida, realizou-se duas lavagens com acetona (aproximadamente 40 ml). Os cadinhos contendo o resíduo foram levados para estufa de secagem a 105 °C, até obtenção de peso constante (após aproximadamente 8 h). Após a secagem, as amostras foram transferidas para dessecador contendo sílica-gel. Após atingir temperatura ambiente, as amostras foram pesadas em balança analítica. A porcentagem da fibra em detergente ácido com base na matéria seca foi obtida por meio da diferença entre as pesagens. Para a determinação da lignina (PEREIRA; ROSSI JR., 1995), após submeter as amostras a análise de FDA foram umedecidas com água destilada e colocado um pouco de solução de ácido sulfúrico 72%. Com o uso de bastão de vidro foi homogeneizado a mistura até formar uma massa pastosa e assim distribuída no fundo do cadinho. Os cadinhos foram colocados em bandeja de vidro e adicionados solução de ácido sulfúrico 72% até cobrir as amostras e após completados, deixando-se passar lentamente pela amostra por 3 horas, sem deixá-las descobertas pelo ácido. Após as 3 h, os cadinhos foram transferidos para outra bandeja de vidro e deixados esgotar a solução de ácido restante. Os cadinhos foram lavados abundantemente com água destilada quente em ambos os lados interno e externo. Após, o filtrado foi lavado 2 vezes com acetona, interrompendo o vácuo cada vez que a acetona foi adicionada ao filtrado, religando-o em seguida. Os cadinhos foram levados para estufa a 105 °C por 12 horas e depois de esfriados em dessecador foram pesados. O resíduo dos cadinhos foram incinerados por 3 h a 550 °C e esfriados novamente em dessecador e pesados.

4.5 Análise Estatística

O experimento foi conduzido em arranjo inteiramente casualizado, no esquema fatorial formado por 3 genótipos, sendo 2 eventos transgênicos

denominados E1, E2 e plantas controle não transformadas e dois níveis de regime hídrico com reposição diária de água de 100% e de 30% da capacidade de campo (estresse hídrico), totalizando portanto 6 tratamentos e 6 repetições (indivíduos) em cada tratamento. Os dados biométricos e bioquímicos obtidos foram tabulados e submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$) e ao teste Tukey através do programa ASSISTAT.

5 RESULTADOS

Observando os parâmetros biométricos, a análise de variância para altura das plantas foi significativa somente para os regimes hídricos (Tabela 1), onde as plantas conduzidas na ausência de estresse hídrico apresentaram alturas superiores em todos os genótipos analisados.

TABELA 1 - Resumo da análise de variância com valores de F e coeficiente de variação para altura de plantas, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), número de folhas (NF).

FV	Altura de plantas	MSPA	MSR	NF
Regime hídrico (H)	34,70**	24,48**	23,48**	12,03**
Genótipo (G)	1,12ns	1,48ns	2,22ns	6,72**
H x G	0,25ns	2,03ns	0,71ns	0,39ns
Tratamentos	7,49**	6,30**	5,86**	5,25**
CV %	7,14	11,91	13,94	8,80

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

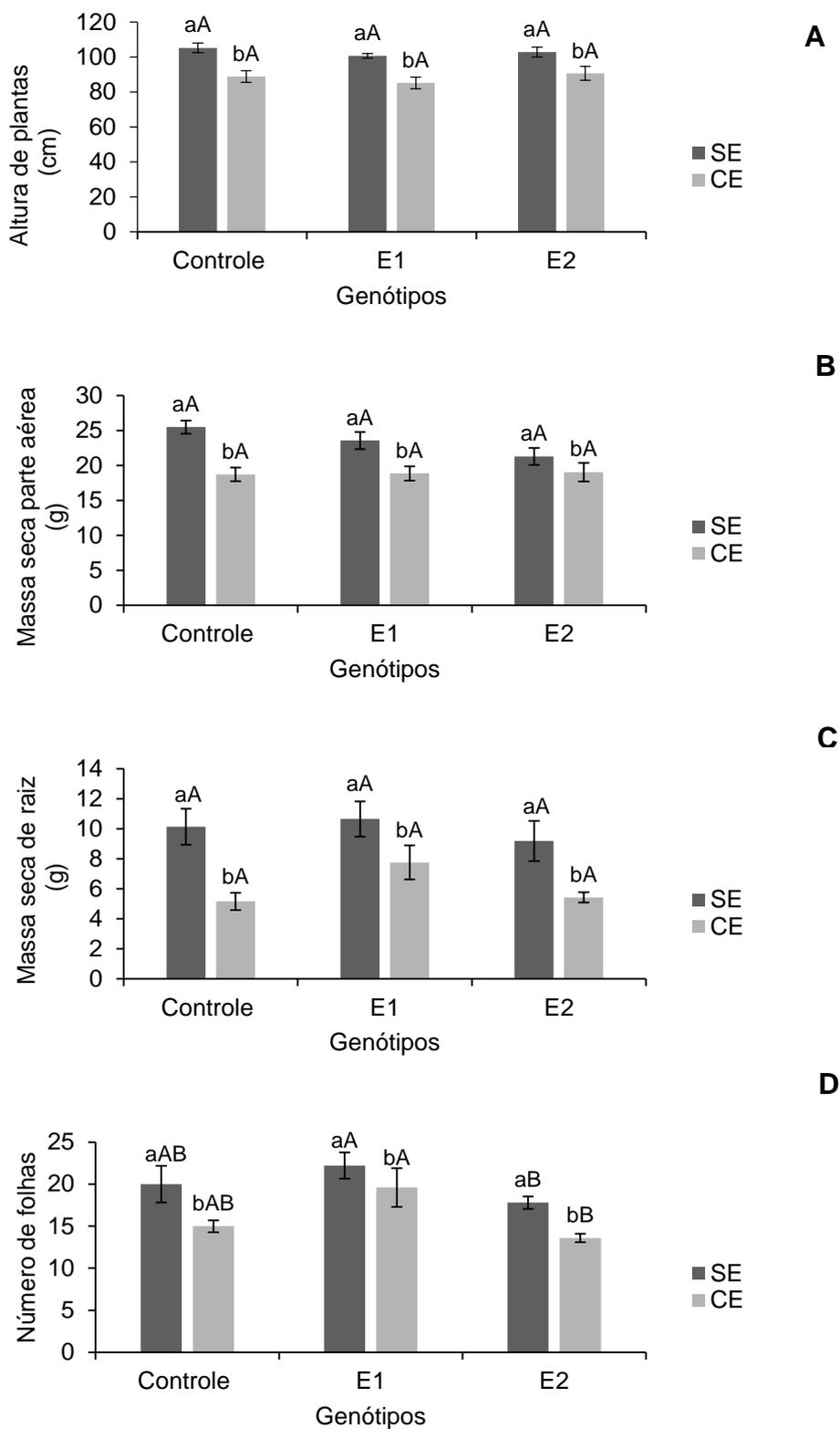
* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

Na variável massa seca da parte aérea (Figura 5b) e massa seca de raiz (Figura 5c), a análise de variância foi significativa apenas para os regimes hídricos (Tabela 1) e todos os genótipos apresentaram resultados superiores de massa seca em condições de suprimento integral de água, não havendo diferença significativa entre eles. Porém, pode-se observar uma maior redução de massa nas plantas controle (não transgênicas), demonstrando-se que foram mais afetadas pelo estresse hídrico, as quais apresentaram diminuições de 26,5% e 49% nas massas secas de parte aérea e raiz respectivamente, enquanto que os eventos transgênicos sofreram menor redução (evento E1 apresentou diminuições de 19,9% e 27% e E2 de 10% e 40% respectivamente).

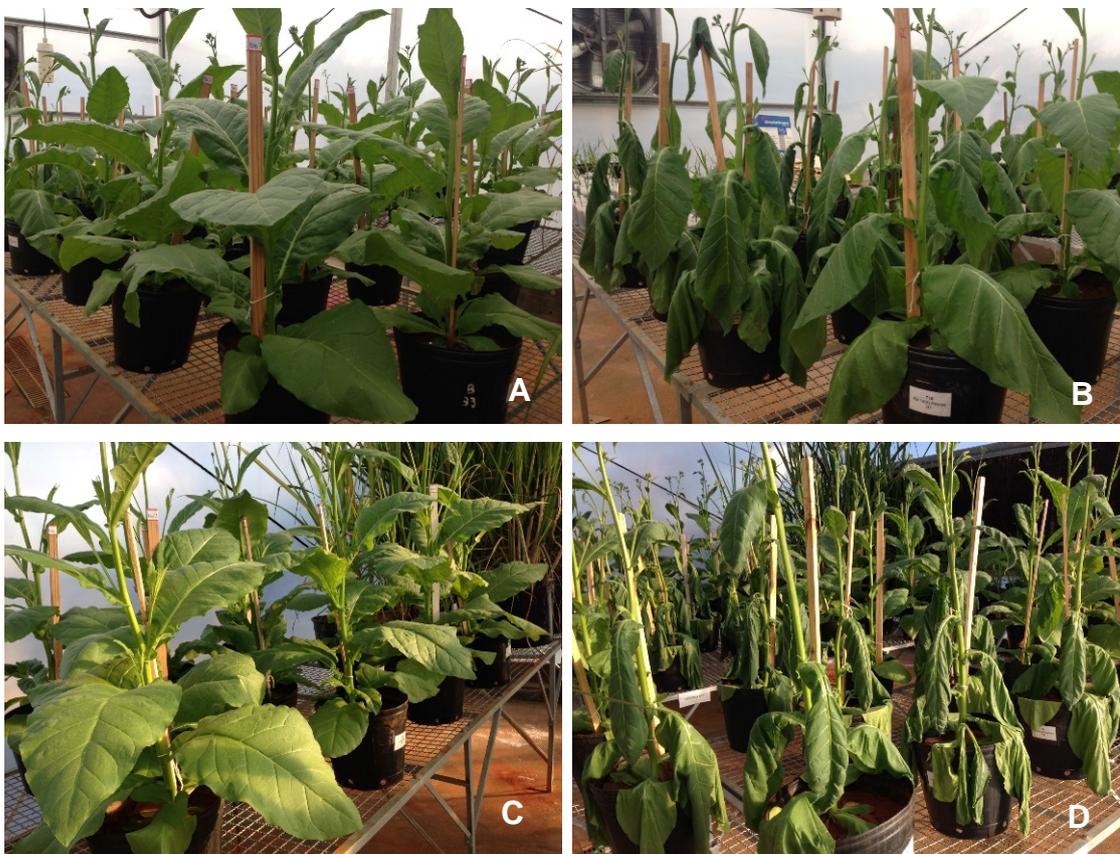
Em relação ao número de folhas, houve diferença significativa entre os regimes hídricos (Tabela 1), sendo encontrado maior número de folhas nas plantas que não passaram por estresse. Houve também diferença significativa entre os genótipos, sendo os eventos transgênicos iguais ao controle e apenas E1 superior ao evento E2 nas duas condições de suprimento de água (Figura 5d).

FIGURA 5 – Análises biométricas das plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).



Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão (n=5).

FIGURA 6 - Plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).



Figuras A, C: Plantas sem estresse hídrico; B: Plantas no 6º dia de estresse hídrico, D: Plantas no 9º dia de estresse hídrico (genótipos dispostos aleatoriamente). Fonte: Autor.

Para a concentração de prolina nas folhas, não houve interação significativa entre os fatores regime hídrico e genótipo (Tabela 2). Tanto na presença como ausência de estresse hídrico verificou-se que as plantas transgênicas apresentaram maiores valores de prolina em comparação às plantas controle, sendo o evento E2 superior ao evento E1. Sob condições normais, os eventos E1 e E2 acumularam cerca de 16 e 20 vezes mais prolina que as plantas controle, respectivamente. Já sob condição de estresse hídrico, o acúmulo de prolina foi 1,2 e 1,9 vezes maior nas plantas transgênicas em comparação ao controle não transformado (Figura 7).

TABELA 2 - Resumo da análise de variância com valores de F e coeficiente de variação para prolina, atividade das enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), fenilalanina amônia liase (FAL), fenóis totais e teor de lignina nas folhas.

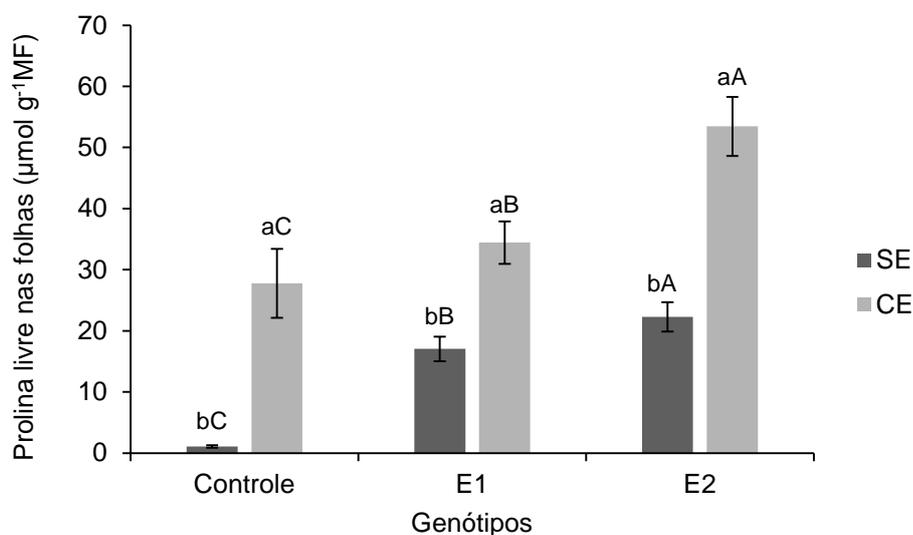
FV	Prolina	G6PDH	FAL	Fenóis totais	Lignina
Regime hídrico (H)	73,27**	17,30**	234,22**	71,79**	27,84 **
Genótipo (G)	21,35**	81,58**	87,35**	19,35**	0,66ns
H x G	1,91ns	3,33ns	39,61**	3,97*	1,57ns
Tratamentos	23,96**	37,43**	97,63**	23,69**	6,46**
CV %	23,90	10,45	9,40	3,00	14,26

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

ns não significativo ($p \geq 0,05$)

FIGURA 7 - Concentração de prolina nas folhas de plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).

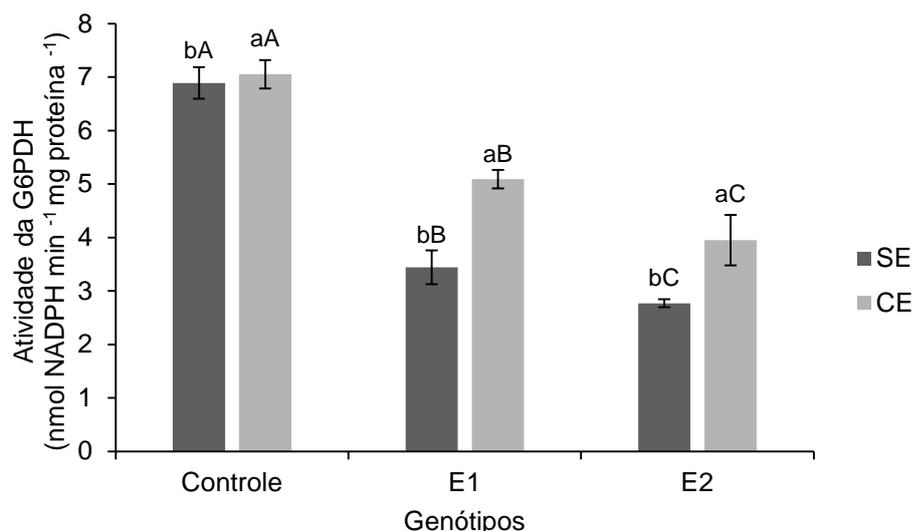


Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão ($n=3$).

Para a enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), observou-se uma atividade significativamente menor nas plantas transgênicas quando comparadas ao controle (sendo o evento E2 inferior ao E1), tanto em condições normais de hidratação como na presença de estresse. Entretanto, na comparação

entre os dois regimes hídricos dentro de cada genótipo (Tabela 2), verificou-se aumentos significativos na atividade da G6PDH em resposta à falta de água tanto nas plantas controle como nas transgênicas (Figura 8).

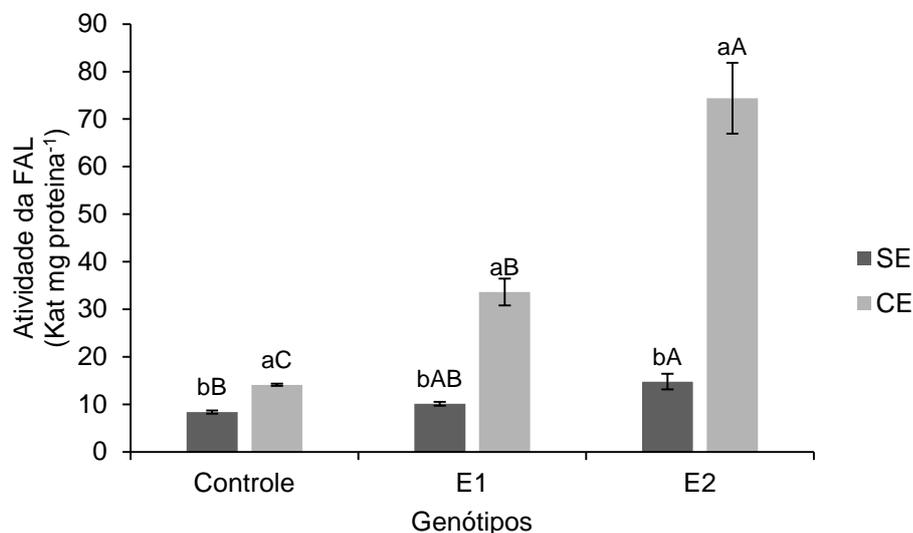
FIGURA 8 - Atividade da enzima Glicose 6 – fosfato desidrogenase (G6PDH) nas folhas de plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).



Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão (n=3).

Quanto à atividade da enzima fenilalanina amônia liase (FAL), houve interação significativa entre os fatores regimes hídrico e genótipo (Tabela 2), sendo observado um aumento na atividade desta enzima em resposta ao estresse hídrico em todos os genótipos (Figura 9). Na comparação entre genótipos, verifica-se maior atividade nas plantas do evento E2, seguido do evento E1 e controle na condição de estresse hídrico, já na condição de hidratação somente o evento E2 diferiu do controle, com maior atividade.

FIGURA 9 - Atividade da enzima Fenilalanina amônia liase (FAL) nas folhas de plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).

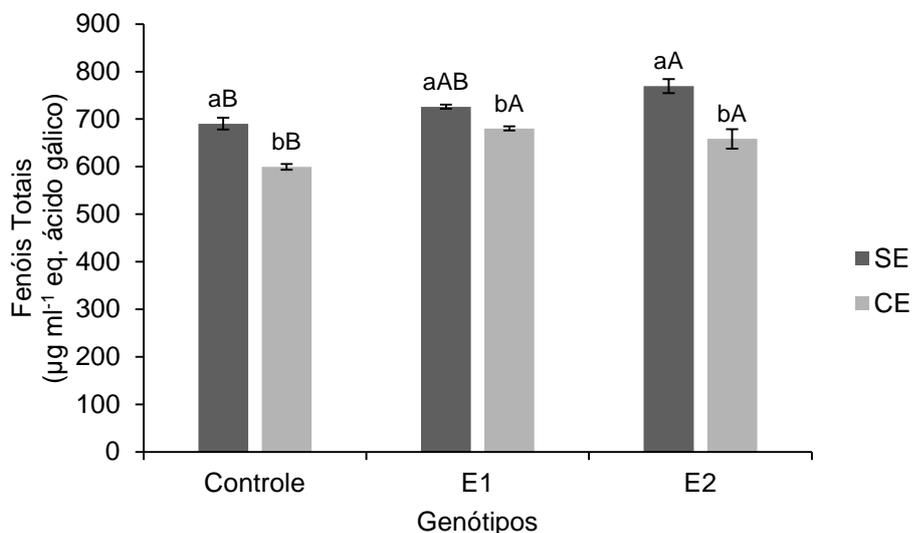


Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão (n=4).

Em relação ao teor de fenóis totais nas folhas, verificou-se a ocorrência de interação significativa entre os fatores regime hídrico e genótipo (Tabela 2). Na condição de estresse hídrico, o teor de fenóis foi significativamente menor, tanto para as plantas controle como para os eventos transgênicos (Figura 10). Na comparação entre genótipos, verifica-se que na ausência de estresse hídrico apenas as plantas do evento E2 apresentaram maior teor de compostos fenólicos em relação às plantas controle. Já sob deficiência hídrica, os dois eventos transgênicos apresentaram maior teor de fenóis quando comparados com as plantas controle.

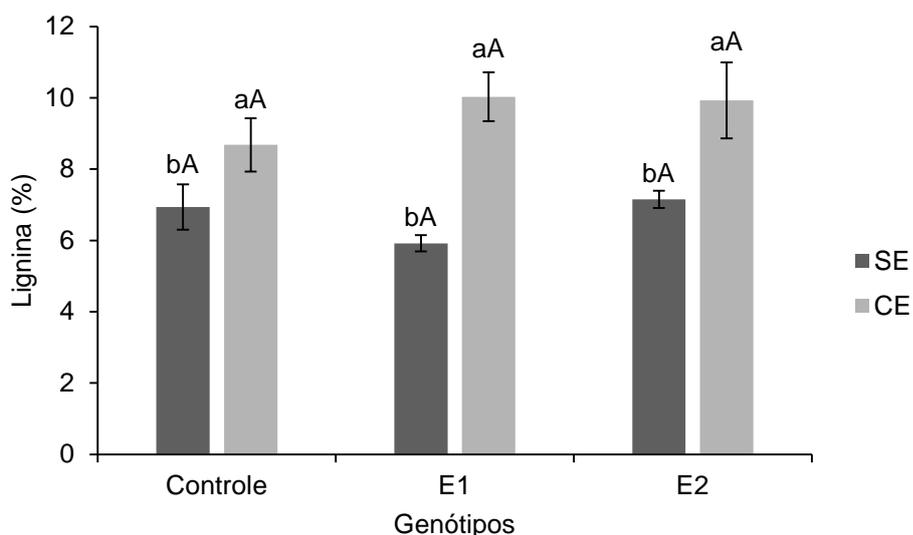
Em relação aos valores de lignina nas folhas, a análise de variância foi significativa somente para os regimes hídricos (Tabela 2), onde na presença de estresse hídrico houve um aumento para todos os genótipos (Figura 11).

FIGURA 10 - Fenóis totais nas folhas de plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).



Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão (n=3).

FIGURA 11 – Teor de lignina nas folhas de plantas de tabaco (controle e eventos transgênicos) submetidas a dois níveis de regime hídrico (SE: sem estresse, CE: com estresse).



Letras minúsculas comparam os regimes hídricos e letras maiúsculas comparam os genótipos. Letras iguais não apresentam diferença pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Barra de erros indica erro padrão (n=3).

6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa foi baseada nos estudos de Shetty e colaboradores, os quais mostraram que os compostos fenólicos em plantas são eficientemente produzidos através de um tipo alternativo de metabolismo, o qual vincula a síntese de prolina com a VPF (SHETTY, 1997, YANG; SHETTY, 1998, ZHENG et al., 2001; SHETTY; MCCUE, 2003; SHETTY, 2004). Tais estudos foram realizados utilizando-se prolina exógena em uma concentração diferente daquela que é produzida endogenamente pelas células vegetais.

No presente trabalho, utilizou-se plantas geneticamente modificadas com alto acúmulo de prolina, para validar a hipótese de que o metabolismo de prolina vinculado à VPF induz a síntese de compostos fenólicos. Avaliou-se também como o estresse hídrico modificaria essas respostas.

Analisando os dados biométricos, foram observadas diminuições em altura, massas secas de parte aérea e raiz e número de folhas em todos os genótipos analisados (controle e transgênicos), como resposta natural das plantas à imposição do estresse hídrico. Um dos processos biofísicos visíveis devido ao estresse das plantas é a redução no crescimento. À medida que o conteúdo de água diminui, o protoplasma fica com volume reduzido, os solutos se tornam cada vez mais concentrados e a membrana plasmática torna-se mais espessa, uma vez que cobre uma área menor. Como a perda de turgidez é o primeiro efeito biofísico da carência hídrica, as atividades relacionadas com a turgidez celular são as mais sensíveis ao déficit hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Neste trabalho, a imposição de deficiência hídrica às plantas de tabaco por um período de 11 dias não permitiu a observação de diferenças significativas entre plantas controle e transgênicas com relação aos parâmetros biométricos. Porém percebeu-se uma menor tolerância das plantas controle ao estresse hídrico, nas quais as reduções de biomassa foram mais acentuadas. Tal fato pode ser explicado, dentre outros fatores, pela presença de maiores teores de prolina nas plantas transgênicas. A função da prolina na adaptação das plantas ao estresse é frequentemente explicada pela propriedade da mesma em atuar como um osmólito compatível e ser ágil para balancear o déficit hídrico. Os mecanismos protetivos da prolina compreendem a estabilização de proteínas e enzimas antioxidantes,

remoção de EROS, balanço da homeostase redox intracelular e sinalização celular promovida pelo metabolismo de prolina (LIANG et al., 2013).

O acúmulo de prolina ocorreu em maior proporção nos eventos transgênicos, para ambos os regimes hídricos. Isso se explica pela transformação genética para expressão constitutiva do gene que codifica a enzima chave para a produção deste aminoácido, além do gene nativo da planta que em situação de estresse, acumula prolina como mecanismo de osmoproteção. Esses resultados concordam com Dobra et al. (2010), Pospisilova et al. (2011) e Hong et al. (2000), os quais utilizaram plantas de tabaco com a mesma transformação genética e relataram alto acúmulo de prolina tanto em condições ótimas, como em situação de estresses abióticos.

Reportando-se à enzima G6PDH verificou-se que, ao contrário do que era esperado, as plantas controle apresentaram maior atividade dessa enzima em comparação às plantas transgênicas, tanto em condições de hidratação como na presença de estresse hídrico. Desta maneira, é possível sugerir que nas plantas transgênicas o maior conteúdo de prolina endógena provocou diminuição na atividade da G6PDH. Desta forma, mesmo na ocorrência de um maior fornecimento de NADP decorrente do metabolismo de prolina nas plantas transgênicas, tal aumento não esteve vinculado a um maior funcionamento da via pentose fosfato. Possivelmente existem outros mecanismos relacionados ao desencadeamento desta via.

Na presença de estresse hídrico, tanto as plantas controle como transgênicas apresentaram aumentos na atividade da enzima G6PDH. No caso das transgênicas, a ativação da G6PDH talvez tenha ocorrido como contribuição de um gene nativo e seu promotor e não em resposta ao gene inserido. De acordo com os resultados de atividade da G6PDH, não é possível afirmar que o aumento do teor de compostos fenólicos em decorrência da presença de uma maior concentração de prolina endógena nas plantas transgênicas estaria atrelado ao estímulo da via pentose fosfato. Neste caso, sugere-se que a VPF tenha funcionado mais como resposta ao estresse do que em função do maior teor de prolina endógena.

A aplicação exógena de prolina em altas concentrações pode gerar estresse nas plantas por aumento na produção de EROS devido à degradação da prolina a P5C nas mitocôndrias (MILLER et al., 2009), o que explicaria os aumentos observados na VPF. Landi et al. (2016), trabalhando com tomate sob condição de

restrição hídrica, observaram um aumento na atividade da G6PDH em resposta ao estresse, indicando que esta enzima pode desempenhar um papel fundamental para atenuação do estresse oxidativo induzido por seca, além de representar uma das principais fontes de redução de NADPH nas células vegetais.

O aumento no teor de compostos fenólicos atrelado ao aumento da atividade da G6PDH e conteúdo de prolina foi verificado em aplicações exógenas de prolina (SHETTY et al., 2003). É possível supor que a aplicação exógena de prolina resulta em efeitos diferentes daqueles relacionados aos níveis endógenos deste aminoácido. Borgo et al. (2015), estudando os efeitos da prolina endógena induzida por estresse hídrico em tabaco transgênico, verificou as alterações na ultraestrutura dos cloroplastos e mitocôndrias, comparando seus resultados com um trabalho no qual a aplicação de concentrações molares de prolina exógena resultou em efeitos tóxicos nestas organelas (HARE et al., 2001). Os autores concluíram que não houve alterações nestas organelas, indicando que os níveis constitutivos de prolina endógena nas plantas transgênicas não exerceram efeito tóxico, sugerindo que as plantas foram capazes de manter a homeostase celular, diferentemente da aplicação exógena.

Além da VPF, o ciclo de Calvin também pode fornecer esqueletos de carbono na forma de eritrose-4-fosfato, que junto com fosfoenolpiruvato, formado a partir de glicólise, serve como precursor do metabolismo de fenilpropanóides através da via do ácido chiquímico. Em condições de estresse, reduzidas taxas fotossintéticas podem exigir maiores taxas de VPF para o fornecimento de esqueletos de carbono ao metabolismo fenólico. Neste trabalho, provavelmente o tempo de imposição de estresse não foi suficiente para reduzir a fotossíntese das plantas, portanto o precursor da via de fenilpropanóides (eritrose-4-fosfato) pode ter vindo do ciclo de Calvin e não da VPF.

A atividade da FAL aumentou em resposta ao estresse hídrico em todos os genótipos analisados. Porém, em suprimento total de água somente as plantas do evento E2 apresentaram maior atividade desta enzima. De acordo com Keles e Oncel (2002), a intensificação da atividade das principais enzimas da via dos compostos fenólicos, entre elas a FAL, tem sido associada a uma maior resistência da planta ao estresse hídrico. Também Gitz et al. (2004) demonstraram que mutantes deficientes em FAL são sensíveis ao estresse ambiental, demonstrando o papel antioxidante dos compostos fenólicos na adaptação das plantas.

Rivero et al. (2001) mostrou uma relação altamente positiva entre a atividade da FAL e a concentração de fenóis em tomate e melancia, sugerindo que a acumulação destes compostos em resposta ao estresse por calor e frio poderia ser atribuída a ativação da enzima FAL. Isso seria benéfico para se alcançar aclimação e tolerância ao estresse hídrico, uma vez que muitos tipos de fenóis são considerados a principal linha de aclimação celular contra o estresse em plantas (DIXON et al., 1992; RIVERO et al., 2001).

A enzima FAL é um intermediário chave nas vias sintéticas de compostos fenólicos, dentre os quais a lignina. Esta enzima catalisa a desaminação da fenilalanina em trans-cinamato, etapa esta que mostrou ser regulada após a exposição das plantas ao estresse. No arroz, uma abordagem proteômica mostrou um aumento do nível da FAL após o estresse por seca (PANDEY et al., 2010). Em *Ctenanthe setosa* exposta ao estresse hídrico a longo prazo, a atividade FAL aumentou até 16 vezes, com consequentes efeitos sobre o teor de lignina, peroxidase ligada ionicamente à parede celular e atividade da polifenol oxidase (TERZI et al., 2013).

Quanto ao teor de fenóis totais nas folhas, observou-se que quando o suprimento de água para as plantas foi normal, apenas o evento E2 apresentou maior teor de fenóis totais nas folhas em comparação ao controle. É importante ressaltar que cada evento é diferente do outro, cuja expressão está provavelmente relacionada com o local de integração do transgene no genoma vegetal (JOYCE et al., 2014), que pode ser em regiões promotoras de genes transcricionalmente ativos (BOURRAS et al., 2015), diferentes regiões do genoma ou de forma aleatória (GELVIN; KIM, 2007). Na comparação apenas entre genótipos, verificou-se que as plantas transgênicas, mesmo sob déficit hídrico, apresentaram maiores teores de fenóis totais do que as plantas controle.

Desta forma é possível afirmar que a hipótese formulada neste trabalho correlacionando os maiores teores de prolina endógena nos eventos de tabaco transgênico com o aumento na produção de compostos fenólicos por estas plantas foi confirmada. Essa associação entre prolina e fenóis ocorreu tanto em condições normais de hidratação (para o evento E2) como na presença de estresse hídrico (para ambos os eventos transgênicos). Porém, de acordo com os resultados observados na atividade da enzima G6PDH, não foi possível estabelecer o vínculo da VPF com esta cadeia de eventos (mais prolina, mais fenóis). Possivelmente o

metabolismo de prolina endógena na planta pode estar associado a outras vias metabólicas e não exclusivamente à VPF. Uma destas vias poderia ser a da glicólise, a qual fornece o precursor fosfoenolpiruvato (LIU et al., 2015).

É interessante ressaltar que na presença de estresse hídrico houve diminuição dos teores de fenóis, tanto nas plantas controle como nas transgênicas, apesar da maior atividade da enzima FAL. A relação entre os estresses abióticos e a variação no teor dos compostos fenólicos nas diferentes espécies de plantas não está clara. Chung et al. (2006) relataram menores teores de compostos fenólicos na planta medicinal *Rehmannia glutinosa* em resposta ao estresse hídrico, enquanto que em pepino (*Cucumis sativus*), o teor de fenóis aumentou e em rabanete (*Raphanus sativus*) não houve alteração sob condições de estresse hídrico (TEVINI; IWANZIK; TERAMURA, 1983). Alterações quantitativas (fenólicos pré-existent) e qualitativas (fenólicos induzidos, síntese de novo) na composição fenólica conferem às plantas várias funções fisiológicas que são úteis para a adaptação aos estresses bióticos e abióticos (LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006; BENNETT; WALLSGROVE, 1994). Destaca-se que o aumento da produção de fenóis provém do aumento da atividade das enzimas envolvidas na via dos compostos fenólicos, incluindo a FAL e a chalcona sintase (CS). Além disso, a atividade da enzima PEP (fosfoenolpiruvato-carboxilase) é reforçada, o que sugere uma realocação da produção de sacarose para produção de metabólitos defensivos (LATTANZIO; CARDINALI; LINSALATA, 2012; MATYSSEK et al., 2012).

Uma possível explicação para o fato das plantas controle e transgênicas terem apresentado alta atividade da FAL e menor teor de fenóis totais na presença de estresse hídrico, é o aumento verificado na concentração de lignina nas folhas. A lignina é também um composto fenólico e por ser um polímero, possui uma estrutura mais complexa do que os fenóis simples e os ácidos fenólicos. Foram observados aumentos significativos na lignina foliar em resposta ao estresse hídrico, para todos os genótipos. Desta forma, embora todos os genótipos tenham apresentado redução no teor de fenóis na presença de estresse hídrico, a maior atividade da FAL esteve relacionada à síntese de lignina. Tem sido bem documentado que estresses bióticos e abióticos são responsáveis pelo aumento de lignificação da parede celular (CHAZEN; NEUMANN, 1994; POLLE et al., 1994; KATERJI et al., 1997). A lignificação estaria associada a uma diminuição no crescimento de plantas, conteúdo de nutrientes e digestibilidade (GUENNI et al.,

2002). De fato, a associação de compostos fenólicos livres com a parede celular pode ser um indicador da resistência da planta ao estresse à seca. A introdução de compostos fenólicos ligados à matriz da parede celular pode gerar um endurecimento da mesma, o que pode alterar seu alongamento após a reidratação da planta. A parede torna-se assim mais compacta, resistente e menos permeável à água. Isto poderia permitir que a planta mantenha o turgor da folha ou da raiz sob um potencial de água baixo devido às propriedades de estabilização destas moléculas, impedindo assim a perda de água ao apoplasto (HURA et al., 2012; FAN, 2006; HURA et al., 2013). Em contraste com os compostos fenólicos livres, a lignina pode desencadear a rigidez da parede e a parada do crescimento na fase posterior do estresse, o que pode levar a uma perda de produtividade, especialmente para as culturas (YANG et al., 2006).

7 CONCLUSÃO

As plantas de tabaco transgênicas com alto acúmulo de prolina do evento E2 apresentaram maior atividade da enzima FAL e maior teor de compostos fenólicos em comparação às plantas controle, tanto em condições de boa hidratação como na presença de estresse hídrico. Porém, não foi possível confirmar a hipótese de que o aumento na síntese de fenóis ocorreria devido ao fato de que o metabolismo de prolina estaria vinculado à via pentose fosfato, desde que as plantas transgênicas - eventos E1 e E2 – apresentaram menor atividade da enzima G6PDH tanto em condições de boa hidratação como na presença de estresse hídrico.

Houve diminuição de biomassa em todos os genótipos avaliados (controle e transgênicas) em resposta ao estresse hídrico, embora tenham sido verificadas menores reduções nas plantas transgênicas. Todos os genótipos apresentaram aumento na atividade da enzima FAL na presença de estresse hídrico, resultando em aumento na síntese de lignina em detrimento dos demais compostos fenólicos.

Desta forma, os resultados dessa pesquisa levam-nos a afirmar a existência de respostas distintas entre a aplicação exógena de prolina e o metabolismo endógeno celular. Sugere-se que os precursores para a via dos compostos fenólicos ligados à prolina podem ser fornecidos por outras vias metabólicas que não a via pentose fosfato, tais como a glicólise e o ciclo de Calvin. Estudos mais aprofundados serão necessários para esclarecer esta questão.

REFERÊNCIAS

- ARUOMA, O.I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 8, n. 1, p. 53–63, 1999.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, 206-216, Mar. 2007.
- BATES, L.; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205-207, Aug. 1973.
- BENNETT, R.N.; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, v.127, n. 4, p. 617–633, Aug. 1994.
- BOHNERT, H. J.; JENSEN, R.G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 89-97, Mar. 1996.
- BOHNERT, H.J.; NELSON, D.E.; JENSEN, R.G. Adaptation to environmental stresses. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1099- 1111, Jul. 1995.
- BORGO, L.; MARUR, C.J.; VIEIRA, L.G.E. Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 37, n. 2, p. 191-199, Apr/Jun. 2015.
- BOURRAS, S.; ROUXEL, T.; MEYER, M. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: How a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. **Phytopathology**, v. 105, n. 10, p.1288-1301, Oct. 2015.
- BOWLER, C. et al. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.13, n. 3, p. 199–218, 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.
- BUCKERIDGE, M. S. et al. Respiração. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia Vegetal. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2008. cap. 7, p.198-216.
- CAMPOS, M. K. F. et al. Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic ‘Swingle’ citrumelo plants over-accumulating proline. **Environmental and Experimental Botany**, v.72, n. 2, p. 242-250, Sept. 2011.
- CARETTO, S. et al. Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n. 11, p. 26378–26394, Nov. 2015.

CASTIGLIA, D. et al. Expression and characterization of a cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase isoform from barley (*Hordeum vulgare*) roots. **Protein Expression and Purification**, v. 112, p. 8-14, Aug. 2015.

CECCHINI, N.M.; MONTEOLIVA, M.I.; ALVAREZ, M.E. Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 155, n.4, p. 1947–1959, Apr. 2011.

HAZEN, O.; NEUMANN, P. M. Hydraulic signals from roots and rapid cell-wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficits. **Plant Physiology**, v. 104, n.4, p. 1385–1392, 1994.

CHEN, C.; DICKMAN, M. B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.102, n. 9, p. 3459–3464, 2005.

CHUNG, I. M. et al. Comparison of resveratrol, SOD activity, phenolic compounds and free amino acids in *Rehmannia glutinosa* under temperature and water stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.56, n.1, p. 44-53, May. 2006.

CLOSE, D.C.; MCARTHUR, C. Rethinking the role of many plant phenolics—protection from photodamage not herbivores? **Oikos**, v. 99, n.1, p.166-172, 2002.

CREISSEN, G.P.; EDWARDS, E.A.; MULLINEAUX, P.M. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: FOYER, C.H.; MULLINEAUX, P.M. (eds.). **Causes of Photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. p. 343-364.

CSONKA, L.N.; HANSON, A.D. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 45, p. 569-606, 1991.

DELAUNEY, A.; VERMA, D. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, v. 4, p.215-223, 1993.

DIXON, R.A. et al. Molecular biology of stress-induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. In: STAFFORD, H.A.; IBRAHIM, R.K. (eds.). **Phenolic metabolism in plants**. New York: Plenum Press, 1992. p. 91–138.

DOBRA, J. et al. Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 16, p. 1360-1370, 2010.

DUNG, T. et al. Agrobacterium-mediated transformation of CRY1Ac gene to tobacco (*Nicotiana tabacum*) and evaluation of *Heliothis armigera* resistance. **Journal of Agriculture**, v. 22, n. 2, p. 161-169, 2006.

DUTT, M. et al. Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. **Horticulture Research**, v. 1, n. 47, p. 1-17, 2014.

FAN, L. Progressive inhibition by water deficit of cell wall extensibility and growth along the elongation zone of maize roots is related to increased lignin metabolism and progressive stelar accumulation of wall phenolics. **Plant Physiology**, v. 140, n.2, p. 603-612, 2006.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, Nov. 2000.

FOTI, M. et al. Antioxidant activity of phenolic meroditerpenoids from marine algae. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 26, n. 2, p.159-164, 1994.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and SODs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 97-112, 1995.

GELVIN, S. B.; KIM, S. I. Effect of chromatin upon *Agrobacterium* T-DNA integration and transgene expression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1769, n. 5/6, p.410-421, May. 2007.

GITZ, D.C. et al. Effects of PAL inhibitor on phenolic accumulation and UV-B tolerance in *Spirodela intermedia* (Koch.). **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 919-927, 2004.

GUENNI, O.; DOUGLAS, M.; BARUCH, Z. Responses to drought of five *Brachiaria* species. I. Biomass production, leaf growth, root distribution, water use and forage quality. **Plant and Soil**, v. 243, n.2, p. 229-241, 2002.

HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VANSTADEN, J. Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Arabidopsis* leaves. **South Africa Journal of Botany**, v. 68, n. 3, p. 393-396, 2001.

HARE, P.; CRESS, W. Metabolic implications of stress induced proline accumulation in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 21, n. 2, p. 79-102, Feb. 1997.

HARE, P.D.; CRESS, W.A.; STADEN, J.V. Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, n.333, p. 413-434, Apr. 1999.

HAYAT, S. et al. Role of proline under changing environments. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 11, p. 1-11, Nov. 2012.

HONG, Z. et al. Removal of feedback inhibition of δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. **Plant Physiology**, v. 122, n.4, p. 1129-1136, Apr. 2000.

HOQUE, M.A. et al. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. **Journal of Plant Physiology**, v.165, n.8, p. 813-824, 2008.

HURA, T. et al. An increase in the content of cell wall-bound phenolics correlates with the productivity of triticale under soil drought. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n.17 p.1728-1736, Nov. 2012.

HURA, T. et al. The cell wall-bound phenolics as a biochemical indicator of soil drought resistance in winter triticale. **Plant Soil Environ**, v. 59, p. 189-195, 2013.

ISLAM, M.M. et al. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p. 1587-1597, 2009.

JOYCE, P. et al. Field performance of transgenic sugarcane produced using *Agrobacterium* and biolistics methods. **Plant Biotechnology Journal**, v.12, n.4, p.411-424, May 2014.

KATERJI, N. et al. Osmotic adjustment of sugar beets in response to soil salinity and its influence on stomatal conductance, growth and yields. **Agricultural Water Management**, v. 34, n.1, p.57-69, Jul. 1997.

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. et al. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.

KAVI KISHOR, P. B. et al. Overexpression of D 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. **Plant Physiology**, v. 108, n.4, p. 1387-1394, Aug. 1995.

KELES, Y.; ONCEL, I. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. **Plant Science**, v. 163, n. 4, p. 783-790, Oct. 2002.

KOHL, D.H. et al. Proline metabolism in N₂-fixing root nodules: energy transfer and regulation of purine synthesis. **Proceedings of National Academic Sciences of USA**, v. 85, n. 7, p. 2036-2040, Apr. 1988.

KUMAR, T.K. et al. The role of proline in the prevention of aggregation during protein folding in vitro. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 46, n. 3, p. 509-517, Oct. 1998.

KWOK, D.; SHETTY, K. Effect of proline and proline analogs on total phenolic and rosmarinic acid levels in shoot clones of thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Journal of food biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 37-51, Feb. 1998.

LANDI, S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a central role in the response of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants to short and long-term drought. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, p. 79-89, Aug. 2016.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: ; IMPERATO, F. (ed.). **Phytochemistry: advances in research**. Trivandrum, India: Research Signpost, 2006. p. 23-67.

LATTANZIO, V.; CARDINALI, A.; LINSALATA, V. Plant phenolics: A biochemical and physiological perspective. In: CHEYNIER, V.; SARNI-MANCHADO, P.; QUIDEAU, S. (Eds.). **Recent Advances in Polyphenols Research**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing, 2012, v. 3, p. 1-39.

LIANG, X. et al. Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.19, n.9, p. 998-1011, Sep. 2013.

LIU, W. et al. Proline biosynthesis augments tumor cell growth and aerobic glycolysis: involvement of pyridine nucleotides. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-13, Nov. 2015.

LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J.M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, v.105, n.3, p. 450-458, Mar.1999.

MATYSIK, J.; ALIA BHALU, B.; MOHANTY, P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, v.82, p. 525-532, 2002.

MATYSSEK, R. et al. Growth and Defence in Plants, Ecological Studies. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, 2012. v. 220.

MILLER, G. et al. Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n.39, p. 26482-26492, Sept. 2009.

MOLINARI, H.B.C. et al. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Obs.x*Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v.167, 1375-1381, 2004.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p. 473-497, 1962.

NIYOGI, K. K. PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 333-359, 1999.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-279, 1998.

- OKUMA, E. et al. Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. **Journal Soil Science and Plant Nutrition**, v. 50, p. 1301-1305, 2004.
- PANDEY, A. et al. Identification of extracellular matrix proteins of rice (*Oryza sativa* L.) involved in dehydration-responsive network: A proteomic approach, **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 3443-3464, 2010.
- PASTORI, G.; MULLINEAUX, P.; FOYER, C.H. Post transcriptional regulation prevents accumulation of glutathione reductase protein and activity in the bundle sheath cells of maize. Implication on the sensitivity of maize to low temperatures. **Plant Physiology**, v. 122, p. 667-675, 2000.
- PEREIRA, J.R.A.; ROSSI JR., P. Manual prático de avaliação nutricional de alimentos. Piracicaba: Fundação da Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz", 1995. 25p.
- PERL-TREVES, R.; PERL, A. Oxidative stress: an introduction. In: **Oxidative Stress in Plants**. 2002.
- PHANG, J.M. The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. **Current Topics on Cell Regulation**, v.25, p. 91-132, 1985.
- PINHERO, R.G. et al. Changes in activities of antioxidant enzymes and their seedling relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 114, p. 695-704, 1997.
- POLLE A, OTTER T, SEIFERT F. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). **Plant Physiology**, v. 106, p. 53-60, 1994.
- PORTO, M. S. et al. Plant promoters: an approach of structure and function. **Molecular Biotechnology**, v. 56, p. 38-49, 2014.
- POSPISILOVA, J.; HAISEL, D.; VANKOVA, R. Responses of Transgenic Tobacco Plants with Increased Proline Content to Drought and/or Heat Stress. **American Journal of Plant Sciences**, v. 2, p. 318-324, 2011.
- RAO, M.V.; PALIYATH, G.; ORMROD, D.P. Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, v. 110, p.125–136, 1996.
- RICE-EVANS, C.A. et al. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radicals Research**, v. 22, p. 375-83, 1995.
- RIVERO RM, RUIZ JM, GARCÍA PC, LOPEZ-LEFEBRE LR, SÁNCHEZ E, ROMERO L. Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. **Plant Science**, v. 160, p. 315-321, 2001.

ROMMENS, C. Kanamycin resistance in plants: an unexpected trait controlled by a potentially multifaceted gene. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 7, p. 317-319, 2006.

SAMUEL, D. et al. Proline inhibits aggregation during protein refolding. **Protein Science**, v. 9, p. 344-352, 2000.

SARKAR, D.; SHETTY, K. Metabolic stimulation of plant phenolics for food preservation and health. **Annual Review of Food Science Technology**, v.5, p.395-413, 2014.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T.R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, Cell & Environmental**, v. 25, p. 333-341, 2002.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Biosynthesis, classification, and nomenclature of phenolics in food and nutraceuticals. In: F SHAHIDI, M NACZK (eds). **Phenolics in Food and Nutraceuticals**, Boca Raton, Florida: CRC , 2003, p. 1-15.

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. S.; DIETZ, K.J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 711-726, 2006.

SHARMA, S. S.; SCHAT, H.; VOOIJS, R. In vitro alleviation of heavy metal-induced enzyme inhibition by proline. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1531-1535, 1998.

SHETTY, K. Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics, focus on Lamiaceae. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 6, p. 162-171, 1997.

SHETTY, K. Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: a review. **Process Biochemistry**, v.39, p. 789-803, 2004.

SHETTY, K.; MCCUE, P. Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: integration of system biology and biotechnological approaches. **Food Biotechnology**, v.17, p.67-97, 2003.

SHETTY, K.; WAHLQVIST, M. A model for the role of the proline-linked pentose phosphate pathway in phenolic phytochemical bio-synthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.13, p.1-24, 2004.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SMIRNOFF, N.; CUMBES, Q. J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**, v. 28, p. 1057-1060, 1989.

SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v.15, p. 89-97, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TEVINI, M., IWANZIK, W., TERAMURA, A.H., Effects of UVB radiation on plants during mild water stress II. Effects on growth, protein and flavonoid content. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 10, p. 459-467, 1983.

TERZI, R.; GÜLER, N.S.; ÇALISKAN, N.; KADIOGLU, A. Lignification response for rolled leaves of *Ctenanthe setosa* under long-term drought stress. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, p. 614-619, 2013.

TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, **Nutrients**, v. 2, p. 1231-1246, 2010.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds: a rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, v.46, p.829-835, 1963.

VAN SOEST, P.J. Development of a comprehensive system of feed analysis and its application to forage. **Journal of Animal Science**, v.26, n.1, p. 119-128, 1967.

VERBRUGGEN, N., HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4 p. 753-759, 2008.

VERSLUES, P.E.; SHARMA, S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. **The Arabidopsis Book**, v.8, p.1-23, 2010.

WANNER, L. A. et al. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 27, p. 327-338, 1995.

WINTERBOURN, C.C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v.4, p. 278-286, 2008.

XU, J.; YIN, H.; LI, X. Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. **Plant Cell Reports**, v. 28, n.2, p. 325-333, Feb. 2009.

YAISH, M. W. Proline accumulation is a general response to abiotic stress in the date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p. 9943-9950, 2015.

YANCEY, P. H. Compatible and counteracting solutes In: STRANGE, K. (ed.). **Cellular and molecular physiology of cell volume regulation**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. p. 81-109.

YANG, L. et al. Differential expression of cell wall related genes in the elongation zone of rice roots under water deficit. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 53, n.3, p. 390-395, 2006.

YANG, R.; SHETTY, K. Stimulation of rosmarinic acid in shoot cultures of oregano (*Origanum vulgare*) clonal line in response to proline, proline analog and proline precursors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n.7, p. 2888-2893, 1998.

ZHANG, C. S.; LU, Q.; VERMA, D. P. S. Removal of feedback inhibition of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps of proline biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n.35, p. 20491-20496, 1995.

ZHENG, Z. et al. A model for the role of the proline-linked pentose phosphate pathway in polymeric dye tolerance in oregano. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 941-946, 2001.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanina deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v.40, n.5, p.779-784, Sep. 1965.

ANEXOS

ANEXO 1 - Caracterização química do solo antes da correção.

pH	MO	P _{resina}	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	M	V
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	-----mmol _c dm ⁻³ -----							%	%
4,2	6,1	6,3	5,7	22,9	1,1	3,3	3,1	7,5	30,4	43,2	24,6

Fonte: Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal. Faculdade de Agronomia – UNOESTE- Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente/SP.

ANEXO 2 - Caracterização química do solo (micronutrientes) antes da correção.

B	Cu	Fe	Mn	Zn
-----mg dm ⁻³ -----				
0,25	0,6	6,4	0,7	0,3

Fonte: Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal. Faculdade de Agronomia – UNOESTE- Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente/SP.

ANEXO 3 - Correção de acidez e adubação do solo utilizado para o preenchimento dos vasos.

Elementos	Fertilizante	Aplicação por vaso (g)
Calagem	Calcário dolomítico	4,5
N	Nitrato de Amônio	3,75
P	Superfosfato Triplo	10
K	Cloreto de Potássio	3,1
S	Enxofre	1,8
B	Ácido Bórico	0,08
Cu	Sulfato de Cobre	0,055
Mn	Sulfato de manganês	0,06
Mo	Molibdato de Sódio	0,035
Zn	Sulfato de Zinco	0,085

Fonte: Laboratório de Análise de Solos e Tecido Vegetal. Faculdade de Agronomia – UNOESTE- Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente/SP.