



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

VIVIANE CACEFO

**PROLINA ENDÓGENA E EXÓGENA EM PLANTAS DE TABACO SUBMETIDAS À
DEFICIÊNCIA HÍDRICA: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS,
MOLECULARES E NO PERFIL IONÔMICO**

Presidente Prudente - SP
2020

VIVIANE CACEFO

**PROLINA ENDÓGENA E EXÓGENA EM PLANTAS DE TABACO SUBMETIDAS À
DEFICIÊNCIA HÍDRICA: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS,
MOLECULARES E NO PERFIL IONÔMICO**

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

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

Coorientadora:

Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas

571.2
C118p

Cacefo, Viviane.

Prolina endógena e exógena em plantas de tabaco submetidas à deficiência hídrica: respostas fisiológicas, bioquímicas, moleculares e no perfil ionômico / Viviane Cacefo. – Presidente Prudente, 2020.

(129)f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira.

Coorientadora: Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas.

1. *Nicotiana tabacum*. 2. Déficit hídrico. 3. Osmorregulador. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "PROLINA ENDÓGENA E EXÓGENA EM PLANTAS DE TABACO
SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS,
BIOQUÍMICAS, MOLECULARES E NO PERFIL IONÔMICO"

AUTOR(A): VIVIANE CACEFO

ORIENTADOR(A): LUIZ GONZAGA ESTEVES VIEIRA

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

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Alexandrius de Moraes Barbosa



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

Prof. Dr. Tiago Benedito dos Santos



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

Profa. Dra. Ilara Gabriela Frasson Budzinski



UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho / Rio Claro (SP)

Prof. Dr. João Carlos Bernaldo Filho



UFPR – Universidade Federal do Paraná / Curitiba (PR)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira

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



Presidente Prudente, 09 de Novembro de 2020.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais Ademir e Leandra, minha base e principais incentivadores dessa minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por me guiar a cada escolha.

“Sois meu refúgio e minha fortaleza, meu Deus, eu confio em ti!” (Salmo 91).

Aos meus pais Ademir e Leandra, pelo apoio incondicional, amor, confiança e paciência. Obrigada mãe, especialmente pelas suas orações! À minha irmã Vanessa e minha sobrinha Emanuelle, que trouxe tanta alegria e amor para nossa família.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Esteves Vieira (Santista), pela orientação desde o mestrado, confiança, paciência e amizade. Aqui deixo meu agradecimento e admiração!

À Profa. Dra. Alessandra Ferreira Ribas, pela co-orientação também desde o mestrado, por não ter medido esforços para me auxiliar, principalmente nas análises no laboratório, pela paciência e amizade.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos: “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela infraestrutura. A todos os professores, em especial: ao Prof. Dr. Fábio Fernando de Araújo, que me incentivou e me auxiliou a ingressar na pós-graduação; ao Prof. Dr. Alexandrius de Moraes Barbosa, pela ajuda, sugestões e amizade; ao Prof. Dr. William Takata, pela recomendação da análise estatística; à pós-doc Kézia Guidorizzi, pela ajuda e amizade. A todos os funcionários, especialmente as técnicas de laboratório Cristiane Aparecida e Mayara Vidotto.

Ao Centro de Estudos em Ecofisiologia Vegetal do Oeste Paulista (CEVOP), grupo de pesquisa do qual fiz parte durante a pós-graduação. Obrigada a todos os membros, pelo conhecimento adquirido, uso dos equipamentos, auxílio durante o experimento, amizade e por todos os momentos de descontração.

A todas as pessoas incríveis que a pós-graduação me proporcionou conhecer e criar laços de amizades. Foram várias e por isso não citarei nomes, pois seria injusto esquecer alguém. Obrigada por todo auxílio, seja através de ideias, na execução do experimento, nas análises, nas conversas, preocupações, desabafos e nas alegrias compartilhadas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho e ao longo da minha trajetória acadêmica: **MUITO OBRIGADA!**

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você
estará fazendo o impossível.”
(São Francisco de Assis)*

RESUMO

Prolina endógena e exógena em plantas de tabaco submetidas à deficiência hídrica: respostas fisiológicas, bioquímicas, moleculares e no perfil ionômico

A fim de mitigar os efeitos dos estresses ambientais, as plantas sintetizam e acumulam solutos orgânicos, chamados osmoprotetores, como a prolina. O uso de plantas transgênicas com alto acúmulo endógeno de prolina e também a aplicação exógena desse aminoácido têm se demonstrado benéficos em plantas sob estresses abióticos. Por atuar no balanço redox, a biossíntese de prolina poderia substituir/complementar as vias de dissipação de energia, válvula de malato e oxidase alternativa, pela regeneração do aceptor de elétrons NADP^+ , reduzindo os efeitos dos estresses. Também, por seu efeito no aumento da tolerância à deficiência hídrica, os mecanismos responsáveis pelo aumento de prolina tem o potencial de auxiliar na absorção de elementos minerais em plantas submetidas a este estresse. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas, bioquímicas, moleculares e no perfil ionômico de plantas de tabaco selvagens e geneticamente modificadas para a superprodução de prolina submetidas a aplicações exógenas desse osmólito sob deficiência hídrica. O experimento foi realizado em casa de vegetação, utilizando um evento transgênico com expressão constitutiva do gene *VaP5CSF129A* e o controle não transformado (selvagem), duas doses de prolina: 0 e 10 mM e dois regimes hídricos: irrigado e deficiência hídrica. Aos trinta dias após o transplante das mudas para os vasos foram realizadas três aplicações foliares de prolina e três dias após a última aplicação a irrigação foi suspensa por nove dias. Após este período, as plantas foram reidratadas, avaliando-se a recuperação destas 48 h após a reidratação. Foram realizadas análises fisiológicas do conteúdo relativo de água, trocas gasosas foliares e biomassa, avaliações bioquímicas do conteúdo de prolina, peroxidação de lipídeos, conteúdo de proteínas solúveis totais e de clorofila total. Foram avaliadas a expressão dos genes *P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR*, *ProDH1*, *ProDH2*, *P5CDH*, *NADP-MDH*, *NAD-MDH*, *AOX* e o transgene *VaP5CSF129A*, as atividades das enzimas *NADP-MDH* e *ProDH* e as razões $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ e NAD^+/NADH . Também foi determinado o conteúdo de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn no nono dia após a suspensão da irrigação. As plantas transgênicas acumularam maior conteúdo de prolina sob deficiência hídrica e na recuperação do que as selvagens, sendo isto ainda maior com a aplicação exógena. Este acúmulo é relacionado com o aumento na expressão dos genes responsáveis pela biossíntese de prolina, principalmente *NtP5CS1*, e pela redução da expressão daqueles relacionados na sua via catabólica, especialmente *NtProDH2*. As plantas transgênicas foram menos afetadas pelo déficit hídrico e exibiram maior poder de recuperação. *NADP-MDH* e *AOX* foram menos ativas nas plantas transgênicas, principalmente com a aplicação exógena de prolina, sendo que este aminoácido atuou como um mecanismo complementar/compensatório para as vias de dissipação de energia. Com poucas exceções, o conteúdo dos elementos minerais foi maior com a suplementação de prolina tanto nas plantas irrigadas e como nas estressadas, mostrando que este tratamento influenciou mais o perfil ionômico das plantas de tabaco do que os regimes hídricos aplicados.

Palavras-chave: *Nicotiana tabacum*. Déficit hídrico. Osmorregulador.

ABSTRACT

Endogenous and exogenous proline in tobacco plants subjected to water deficiency: physiological, biochemical, molecular and ionic profile responses

In order to mitigate the effects of environmental stresses, plants synthesize and accumulate organic solutes, called osmoprotectors, such as proline. The use of transgenic plants with a high endogenous accumulation of proline and also the exogenous application of this amino acid has been shown to benefit plants under various stresses. By acting on the redox balance, proline biosynthesis might replace/complement the energy dissipation, malate valve and alternative oxidase pathways, by regenerating the NADP^+ electron acceptor, reducing the effects of stress. Also, the biochemical mechanisms involved in the accumulation of this amino acid, due to its effect in increasing the tolerance to water deficiency, might assist in the absorption of mineral elements in plants under water deficit. The objective of this study was to evaluate the physiological, biochemical, molecular and ionic profile responses of wild and genetically modified tobacco plants for overproduction of proline submitted to exogenous applications of this osmolyte under water deficiency. The experiment was carried out in a greenhouse, using a transgenic event with constitutive expression of the *VaP5CSF129A* gene and the untransformed (wild) control, two exogenous proline concentrations: 0 and 10 mM and two water regimes: irrigated and deficiency water. Thirty days after transplanting the seedlings into pots, three foliar applications of proline were performed and irrigation was suspended three days after the last application for nine days. After this period, the plants were rehydrated, evaluating the recovery of these 48 h after rehydration. Physiological analyzes of relative water content, leaf gas exchange and biomass, biochemical evaluations of proline content, lipid peroxidation, total soluble protein content and total chlorophyll content were performed. The expression of the *P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR*, *ProDH1*, *ProDH2*, *P5CDH*, *NADP-MDH*, *NAD-MDH*, *AOX* and *VaP5CSF129A* transgene, the activity of the enzymes *NADP-MDH* and *ProDH* and the ratios $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ and NAD^+/NADH were performed. The content of N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn and Zn was also determined on the ninth day of irrigation suspension. Transgenic plants accumulated a higher content of proline under water deficiency and after recovery than wild plants, which was even greater with exogenous application. The higher content of proline was caused by the increase in the expression of the genes responsible for its biosynthesis, mainly *NtP5CS1*, and by the reduction of the expression of those related to the catabolic pathway, especially *NtProDH2*. Transgenic plants were less affected by the water deficit and exhibited greater recovery ability. *NADP-MDH* and *AOX* were less active in transgenic plants, mainly when exogenous application of proline was used, suggesting that this amino acid acted as a complementary/compensatory mechanism for the energy dissipation pathways. With few exceptions, the content of mineral elements was higher with proline supplementation in both irrigated and stressed plants, showing that this treatment had greater effect in the ionic profile of tobacco plants compared to the applied water deficit.

Keywords: *Nicotiana tabacum*. Water deficit. Osmoregulators.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

A	– Assimilação líquida de CO ₂
ACP	– Análise de componentes principais
AOX	– Oxidase alternativa
B	– Boro
BSA	– Albumina de soro bovino
Ca	– Cálcio
CaMV 35S	– Promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor
Chl	– Clorofila
<i>C_i</i>	– Conteúdo intracelular de CO ₂
CRA	– Conteúdo relativo de água
Cu	– Cobre
DAT	– Dias após o transplante das mudas para os vasos
DH	– Deficiência hídrica
DTT	– Ditioneitol
<i>E</i>	– Transpiração
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROS	– Espécies reativas de oxigênio
ESTs	– Etiquetas de sequências expressas
EUA	– Eficiência do uso da água
Fe	– Ferro
Gs	– Condutância estomática
GSA	– Glutamato semi-aldeído
<i>GUS</i>	– β -glucuronidase
G6P	– Glicose-6-fosfato
G6PDH	– Glicose-6-fosfato desidrogenase
HCl	– Ácido clorídrico
HEPES-KOH	– Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanolssulfônico hidróxido de potássio
Irr	– Irrigado
K	– Potássio
KCl	– Cloreto de potássio
KOH	– Hidróxido de potássio
MDA	– Malondialdeído
Mg	– Magnésio
MgCl ₂	– Cloreto de magnésio
Mn	– Manganês
MSPA	– Massa seca da parte aérea
MSR	– Massa seca da raiz
MST	– Massa seca total
MTT	– Brometo de metiltiazolildifenil-tetrazólio
N	– Nitrogênio
Na-acetato	– Acetato de sódio
Na ₂ CO ₃ -HCl	– Carbonato de sódio hidrocloreto
NAD ⁺	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
<i>NAD-MDH</i>	– Malato desidrogenase dependente de NAD ⁺
NADP ⁺	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH	– Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
<i>NADP-MDH</i>	– Malato desidrogenase dependente de NADP ⁺
<i>nptII</i>	– Neomicina fosfotransferase II
OAT	– Ornitina aminotransferase
P	– Fósforo
PAR	– Radiação fotossinteticamente ativa
pb	– Pares de base
PCR	– Reação em cadeia da polimerase
PC1	– Componente principal 1
PC2	– Componente principal 2
PES	– Etossulfato de fenazina
PMSF	– Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PNOS	– Promotor do gene da nopalina sintase
<i>ProDH</i>	– Prolina desidrogenase
PVP	– Polivinilpirrolidona
P5C	– Pirrolina-5-carboxilato
<i>P5CDH</i>	– Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase
<i>P5CR</i>	– Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase
<i>P5CS</i>	– Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase
Rec	– Recuperação
RT-qPCR	– PCR quantitativo em tempo real
S	– Enxofre
SOD	– Superóxido dismutase
TBA	– Ácido tiobarbitúrico
TCA	– Ácido tricloroacético
TCA	– Ciclo do ácido tricarboxílico
Tris-HCl	– Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreídrico
Triton X-100	– 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol
VpdL	– Déficit de pressão de vapor
<i>VaP5CSF129A</i>	– <i>P5CS</i> de <i>Vigna aconitifolia</i> mutado
Zn	– Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Biossíntese e catabolismo da prolina em plantas.....	19
Figura 2 -	Válvula de malato e oxidase alternativa (AOX) como vias de dissipação de energia na cadeia de transporte de elétrons no cloroplasto e na mitocôndria, respectivamente.....	32
Figura 3 -	Temperaturas máxima, média e mínima do ar (°C) durante o período do experimento.....	41
Figura 4 -	Conteúdo de prolina nas folhas, nas raízes e conteúdo de malondialdeído (MDA) em dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	53
Figura 5 -	Conteúdo de prolina nas folhas, nas raízes e conteúdo de malondialdeído (MDA) em dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	54
Figura 6 -	Conteúdo relativo de água (CRA) de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	55
Figura 7 -	Conteúdo relativo de água (CRA) de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	56
Figura 8 -	Trocas gasosas foliares de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	58
Figura 9 -	Trocas gasosas foliares de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	59
Figura 10 -	Biomassa de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	61
Figura 11 -	Expressão relativa de genes em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	64

Figura 12 -	Expressão relativa de genes em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	67
Figura 13 -	Atividade das enzimas NADP-MDH e ProDH em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	69
Figura 14 -	Atividade das enzimas NADP-MDH e ProDH em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	70
Figura 15 -	Nucleotídeos de piridina em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	71
Figura 16 -	Nucleotídeos de piridina em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	72
Figura 17 -	Conteúdo dos elementos minerais nas folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	103
Figura 18 -	<i>Heatmap</i> dos elementos minerais nas folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	104
Figura 19 -	Análise de componentes principais (ACP) dos elementos minerais nas folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Descrição dos genes e sequências dos iniciadores utilizados para o RT-qPCR.....	49
------------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Metabolismo de prolina	18
2.2	Prolina e deficiência hídrica	20
2.3	Prolina exógena	22
2.4	Plantas transgênicas visando o metabolismo de prolina para tolerância ao estresse	25
2.5	Vias de dissipação de energia contra o estresse oxidativo	27
2.5.1	Válvula de malato.....	27
2.5.2	Oxidase alternativa (AOX).....	29
2.6	Ionômica	33
3	CAPÍTULO 1: Prolina complementa as vias de dissipação do estresse oxidativo - válvula de malato e oxidase alternativa - em plantas de tabaco submetidas à deficiência hídrica	36
3.1	Introdução	38
3.2	Objetivo	39
3.2.1	Objetivo geral.....	39
3.2.2	Objetivos específicos.....	39
3.3	Material e Métodos	39
3.3.1	Delineamento experimental.....	39
3.3.2	Materiais vegetais e preparo dos vasos.....	40
3.3.3	Aplicação de prolina.....	41
3.3.4	Imposição da deficiência hídrica.....	42
3.3.5	Avaliações fisiológicas.....	42
3.3.5.1	Conteúdo relativo de água (CRA).....	42
3.3.5.2	Trocas gasosas foliares.....	43
3.3.6	Biomassa.....	43
3.3.7	Avaliações bioquímicas.....	44
3.3.7.1	Conteúdo de prolina.....	44
3.3.7.2	Peroxidação de lipídeos.....	44
3.3.7.3	Conteúdo de proteínas solúveis totais.....	45
3.3.7.4	Conteúdo de clorofila total.....	45
3.3.8	Seleção de genes.....	46
3.3.9	Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	46
3.3.10	PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR).....	47
3.3.10.1	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	47
3.3.10.2	RT-qPCR.....	47
3.3.11	Atividades enzimáticas.....	50
3.3.12	Conteúdos de nucleotídeos de piridina.....	51
3.3.13	Análise estatística.....	51

3.4	Resultados	52
3.4.1	Avaliações bioquímicas.....	52
3.4.2	Avaliações fisiológicas.....	55
3.4.3	Biomassa.....	60
3.4.4	Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	61
3.4.5	Atividades enzimáticas.....	68
3.4.6	Nucleotídeos de piridina.....	70
3.5	Discussão	73
3.6	Considerações Finais	91
3.7	Conclusão	94
4	CAPÍTULO 2: Efeitos da prolina no perfil ionômico foliar de plantas de tabaco submetidas à deficiência hídrica	95
4.1	Introdução	97
4.2	Objetivo	98
4.3	Material e Métodos	98
4.3.1	Condução do experimento.....	98
4.3.2	Análise de elementos minerais.....	99
4.3.3	Análise estatística.....	99
4.4	Resultados	99
4.5	Discussão	106
4.6	Conclusão	113
	REFERÊNCIAS	114

1 INTRODUÇÃO

As plantas são frequentemente expostas a condições ambientais adversas, ocasionando vários tipos de estresses abióticos devido ao excesso e/ou redução da disponibilidade de água, nutrientes, luz, temperatura alta ou muito baixa, salinidade, excesso de íons, metais pesados, entre outros (GOLLDACK *et al.*, 2014). Esses fatores interferem no metabolismo das plantas e afetam a produtividade e o rendimento das culturas. Assim, com o intuito de adaptar-se e mitigar os efeitos do estresse, as plantas sintetizam alguns compostos, conhecidos como osmólitos ou osmoprotetores. Estes, são solutos que se acumulam sob condições estressantes, sem alterar o metabolismo celular e desempenham importante papel no ajuste osmótico, na manutenção da integridade das membranas, além de atuar na eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (ALI; BANO; FAZAL, 2017).

A prolina é um aminoácido que atua como osmoprotetor protegendo as plantas do estresse ambiental, além de participar de diversos processos fisiológicos, como por exemplo, ser um dos componentes na síntese proteica (BIANCUCCI *et al.*, 2015). Sua biossíntese nas plantas ocorre através de duas vias: glutamato e ornitina, no citosol, e o catabolismo acontece nas mitocôndrias (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014).

O uso de plantas geneticamente modificadas para se obter maior acúmulo endógeno de prolina tem sido alvo de várias pesquisas. Com esse objetivo, uma mutação no gene Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (*P5CS*) de *Vigna aconitifolia* foi realizada pela substituição de uma fenilalanina na posição 129 por uma alanina (*VaP5CSF129A*), a fim de se reduzir a inibição do *feedback* do *P5CS* pela prolina (ZHANG; LU; VERMA, 1995). A inserção desse gene mutado pode então, contribuir para tolerância das plantas aos diversos tipos de estresse, como a deficiência hídrica.

A aplicação de prolina de forma exógena também tem demonstrado beneficiar as plantas por reduzir as consequências dos estresses ambientais. Isso ocorre através do aumento do conteúdo desse osmoprotetor endógeno por mudanças na expressão de genes e na atividade de enzimas responsáveis pelo seu metabolismo (YAN *et al.*, 2011; HASANUZZAMAN *et al.*, 2014). Entretanto, há a necessidade de avaliar se a aplicação exógena fornece este aminoácido para atuar diretamente na mitigação dos efeitos deletérios dos estresses ou ativa

predominantemente a via de catabolismo da prolina, ocasionando o aumento da produção *de novo* desse aminoácido através da maior disponibilidade de glutamato formado a partir da sua oxidação.

Além disso, quando as plantas passam por estresses onde o transporte de elétrons é afetado, um sistema conhecido como válvula de malato atua na regeneração do acceptor de elétrons NADP^+ nos cloroplastos através da conversão do oxaloacetato em malato pela enzima malato desidrogenase dependente de NADP^+ (NADP-MDH) (SCHEIBE, 2004). O malato é transportado para a mitocôndria para ser reconvertido em oxaloacetato pela malato desidrogenase dependente de NAD^+ (NAD-MDH) produzindo NADH que é útil na cadeia respiratória e ativa a via da oxidase alternativa (AOX) (WANG; VANLERBERGHE, 2013). Assim como esses sistemas, o metabolismo de prolina também auxilia na manutenção dos níveis adequados de $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$, sendo que níveis suficientes de NADP^+ mantém o transporte de elétrons evitando danos no sistema fotossintético sob estresse (LIANG *et al.*, 2013). Sendo assim, pode ocorrer um sistema de compensação e/ou complementariedade da biossíntese de prolina e válvula de malato em plantas sob estresse, atenuando os efeitos do mesmo.

Ainda, a deficiência hídrica também pode modificar o perfil ionômico das plantas através da redução da absorção, translocação e armazenamento de elementos minerais, ocasionada principalmente pela diminuição das taxas de transpiração e da permeabilidade das membranas (AHANGER *et al.*, 2016). Apesar da escassa informação disponível na literatura, tem sido demonstrado que a prolina pode influenciar em uma maior absorção de nutrientes em plantas estressadas, especialmente quando aplicada de forma exógena (ALI *et al.*, 2008; PER *et al.*, 2017; MERWAD; DESOKY; RADY, 2018).

Diante da relevância desse osmólito, torna-se importante a realização de trabalhos que avaliem plantas com alto acúmulo de prolina endógena comparativamente com plantas submetidas à aplicação exógena deste aminoácido para aumentar a nossa compreensão do papel da prolina em plantas em condições de deficiência hídrica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabolismo da prolina

As plantas quando sofrem algum tipo de estresse desenvolvem adaptações fenotípicas e fisiológicas como respostas para mitigar os efeitos do estresse. Uma das respostas trata-se da síntese e acúmulo de solutos orgânicos conhecidos como osmoprotetores ou solutos compatíveis, como prolina, glicina betaína, açúcares, entre outros (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; GOLLDACK *et al.*, 2014; KHAN; ASGHER; KHAN, 2014). Um nível significativo de prolina em plantas expostas a diferentes tipos de estresses abióticos, como deficiência hídrica, salinidade, frio, calor, metais pesados já foi relatado, além desse soluto regular alguns genes tolerantes a seca e a salinidade (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; IQBAL *et al.*, 2014; TEH *et al.*, 2015).

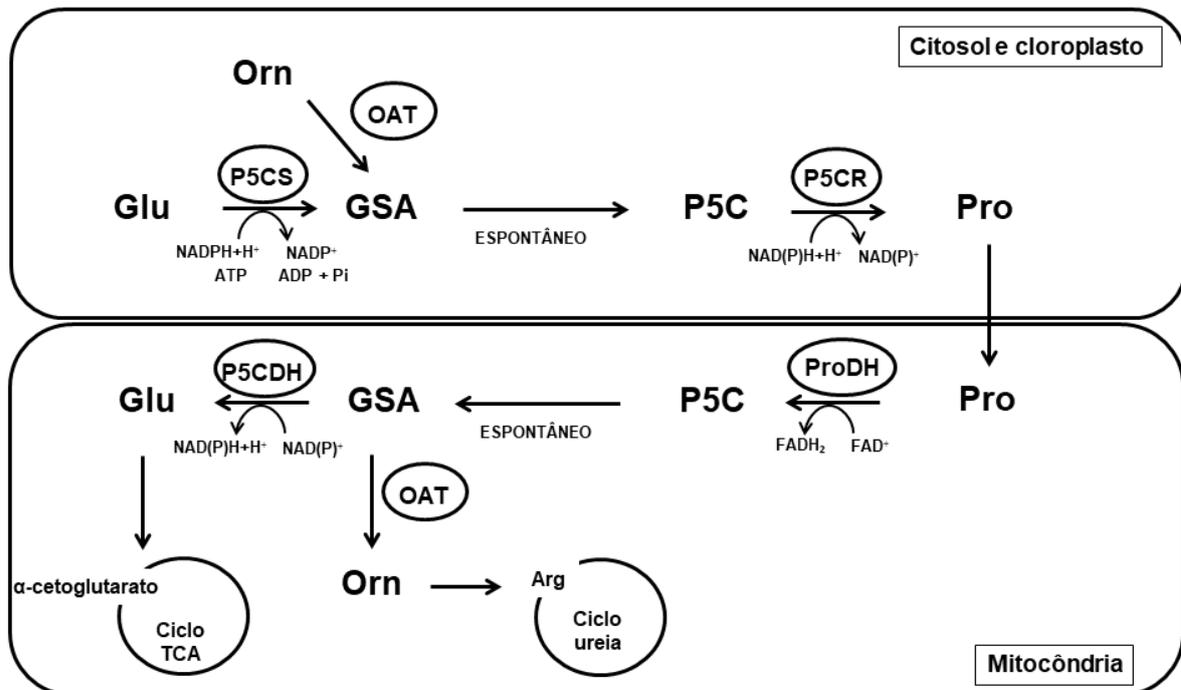
A prolina é um aminoácido que além de ser um constituinte das proteínas, também é importante para uma série de processos fisiológicos envolvendo proteção contra estresse e controle redox, diminuindo os efeitos das EROS e da relação $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010; KAUR; ASTHIR, 2015). Desempenha um papel importante regulando o ajuste osmótico, trabalhando como uma chaperona molecular e protegendo a integridade de proteínas e enzimas (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Este aminoácido funciona como um soluto que permite que o citoplasma permaneça hidratado em condições de alta osmolaridade externa (FICHMAN *et al.*, 2015).

A biossíntese de prolina nas plantas ocorre no citosol através de duas vias: glutamato e ornitina (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014). Na via glutamato, a biossíntese de prolina tem início com a fosforilação do glutamato para formar γ -glutamil fosfato pela enzima γ -glutamil quinase, que é reduzido a glutamato semi-aldeído (GSA) pela ação da enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), utilizando NADPH, formando espontaneamente pirrolina-5-carboxilato (P5C). Este P5C é reduzido a prolina pela catálise enzimática da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) consumindo NAD(P)H. Na via ornitina, a enzima ornitina aminotransferase (OAT) catalisa a reação de ornitina em GSA, e posteriormente, é convertido em prolina via P5C (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Porém, alguns estudos mostram que em plantas, a biossíntese de prolina ocorre exclusivamente

através da via glutamato, principalmente sob estresse osmótico (FUNCK; STADELHOFER; KOCH, 2008; REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014). Sob condições estressantes essa biossíntese também pode ocorrer nos cloroplastos (KISHOR; SREENIVASULU, 2014).

O catabolismo da prolina ocorre nas mitocôndrias e é realizado por duas enzimas. A prolina desidrogenase (ProDH) catalisa a conversão de prolina em P5C, utilizando FAD^+ como cofator. P5C é então convertido a glutamato pela Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH), usando preferencialmente NAD^+ , mas também pode consumir $NADP^+$ (FICHMAN *et al.*, 2015). O glutamato pode ser exportado ou convertido dentro das mitocôndrias em α -cetoglutarato pela enzima glutamato desidrogenase. Por fim, o α -cetoglutarato pode ser introduzido no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e, dessa forma, a prolina representa um substrato para a cadeia respiratória (SCHERTL *et al.*, 2014). Pela via da ornitina, o P5C formado a partir da ação da ProDH é convertido em ornitina pela ação da OAT. A ornitina é direcionada para formação de arginina para ser introduzida no ciclo da ureia (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010) (Figura 1).

Figura 1 - Biossíntese e catabolismo da prolina em plantas.



Abreviações: Glu, glutamato; GSA, glutamato semi-aldeído; P5C, pirrolina-5-carboxilato; Pro, prolina; P5CS, Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase; P5CR, Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase; ProDH, prolina desidrogenase; P5CDH, Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase; Orn, ornitina; OAT, ornitina aminotransferase; Arg, arginina; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico.

Fonte: Autor. Adaptado de Per *et al.* (2017).

Em *Arabidopsis thaliana*, duas isoformas do gene chave da biossíntese de prolina foram identificadas e são consideradas as principais em plantas: *P5CS1*, que é responsável pela biossíntese de prolina sob estresse abiótico e *P5CS2*, que funciona como gene de manutenção inicial no desenvolvimento das plantas (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Essas duas isoformas de *P5CS* também foram identificadas em tabaco (*Nicotiana tabacum*) com as mesmas funções (DOBRÁ *et al.*, 2011). A *P5CS* é uma enzima limitante da via biossintética e está sujeita à inibição por *feedback* pela prolina (ZHANG; LU; VERMA, 1995). Para a segunda enzima, *P5CR*, duas isoformas foram também identificadas bioquimicamente, embora não esteja claro se as duas isoformas são originárias de um único gene (MURAHAMA *et al.*, 2001).

Com relação ao catabolismo da prolina, dois genes homólogos foram identificados para codificar a ProDH (*ProDH1* e *ProDH2*) em *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum*, enquanto os dados de outras espécies de plantas ainda são escassos. Em contraste, a enzima que catalisa o segundo passo da degradação da prolina (*P5CDH*) é codificada por um gene de cópia única, embora atividades de *P5CDH* com características diferentes em *Nicotiana plumbaginifolia* e milho (*Zea mays*) foram identificadas, não ficando claro se ambas as atividades surgem de um único gene ou de um segundo gene *P5CDH* presente nessas espécies (FORLANI; SCAINELLI; NIELSEN, 1997; MITCHELL *et al.*, 2006; VERBRUGGEN; HERMANS, 2008).

2.2 Prolina e deficiência hídrica

Nas plantas sob condições de estresse ambiental, o metabolismo de prolina é regulado através de um equilíbrio entre seu anabolismo e catabolismo. A biossíntese é promovida e o seu catabolismo é suprimido durante o estresse (WANG *et al.*, 2015). A maioria dos mecanismos reguladores do metabolismo da prolina age no nível transcricional e consegue distinguir entre condições fisiológicas normais e estresse. A chave para essa distinção é a capacidade de detectar e responder a diferentes entradas por várias vias de sinalização que resultam na expressão ou ativação de fatores de transcrição específicos (FICHMAN *et al.*, 2015).

Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, foram identificados alguns genes envolvidos no metabolismo desse soluto, como *P5CS1* que foi induzido por estresse

hídrico e salino, e duas isoformas de *ProDH*, onde *ProDH1* é considerada a principal isoforma envolvida na degradação desse osmólito, sendo sua expressão reduzida sob deficiência hídrica (FUNCK; ECKARD; MÜLLER, 2010). Em diferentes genótipos de algodão (*Gossypium hirsutum*) submetidos à seca, observou-se um aumento significativo nos níveis de prolina e na atividade da P5CS em folhas dos genótipos tolerantes e sensíveis à seca, enquanto que a atividade de ProDH diminuiu. Na recuperação, a atividade de P5CR e OAT aumentou minimamente e os níveis de prolina e a atividade de P5CS e P5CR diminuíram quase que iguais aos seus respectivos controles, ao passo que a atividade da ProDH aumentou (PARIDA *et al.*, 2008). Um maior número de transcritos de *P5CS* foi encontrado nas primeiras horas de estresse por déficit hídrico em folhas de *Arabidopsis thaliana* e foi sendo reduzido conforme um tempo maior de exposição ao estresse, sendo que essa expressão foi baixa no tecido radicular (PER *et al.*, 2017). Isso indica que os perfis de expressão diferencial desse gene sob estresse e em diferentes tecidos sugerem fortemente que os genes desempenham papéis distintos com base na resposta e desenvolvimento do estresse. Além disso, a expressão dos genes envolvidos no metabolismo de prolina também sofre interferência de fatores de transcrição e promotores induzidos ou não por determinado estresse (FICHMAN *et al.*, 2015).

Por se tratar de um osmorregulador vital nas plantas, o transporte de prolina deve influenciar a tolerância das plantas contra as condições de estresse (SHARMA; VILLAMOR; VERSLUES, 2011). A distribuição de prolina entre os diferentes compartimentos da célula não é uniforme e esse aminoácido é distribuído dentro da planta por transporte de longa distância ao longo de feixes vasculares e localmente por transporte através da membrana plasmática ou dos plasmodesmas (PER *et al.*, 2017). O ProT, transportador específico de prolina, pertence a superfamília de transportadores de aminoácidos, encontra-se na membrana plasmática e provavelmente está envolvido no transporte desse soluto intercelular e de longa distância (RENTSCH; SCHMIDT; TEGEDER, 2007; SHARMA; VILLAMOR; VERSLUES, 2011). O transporte inter e intracelular de prolina é crítico para manter a homeostase celular, mas o movimento intracelular desse aminoácido desempenha um papel importante no aumento da resistência ao estresse. Em milho (*Zea mays*) sob deficiência hídrica, por exemplo, a deposição de prolina na zona de alongamento das raízes não ocorreu devido ao aumento da sua biossíntese, mas devido à melhora no seu transporte (VERSLUES; SHARP, 1999). Em videira (*Vitis*

vinifera), o acúmulo de prolina ocorreu pelo aumento do transporte ou maior atividade das enzimas da via biossintética, pois não se observou aumento na expressão do gene *P5CS* (STINES *et al.*, 1999).

Outro fator que atua no acúmulo de prolina e pode atenuar os efeitos dos estresses abióticos são os fitohormônios. Em trigo (*Triticum aestivum*) sob estresse hídrico e salino, a aplicação exógena de ácido indolacético induziu o acúmulo de prolina (SADIQOV; AKBULUT; EHMEDOV, 2002). Em tabaco (*Nicotiana tabacum*), os níveis de citocinina foram reduzidos com a deficiência hídrica, porém, essa redução foi menor em plantas transformadas para superexpressão do gene *P5CS* que apresentaram um aumento na tolerância ao estresse (DOBRÁ *et al.*, 2010). O etileno também vem sendo estudado e há relatos de que este interage com outras moléculas de sinalização e regula o acúmulo de prolina, realizando o ajuste osmótico sobre estresse (CUI *et al.*, 2015). O ácido abscísico é outro fitohormônio que pode influenciar na produção de prolina, regulando a expressão de *P5CS* e *P5CR* em plantas durante o estresse abiótico (VERSLUES; BRAY, 2006). O ácido salicílico também demonstrou induzir o metabolismo de prolina e confere tolerância às plantas contra a seca. Em *Brassica juncea* sob deficiência hídrica, a aplicação de ácido salicílico aumentou o acúmulo de prolina, as características fotossintéticas foram melhoradas (fotossíntese líquida, condutância estomática, concentração de CO₂ intercelular e atividade da Rubisco), além do aumento da área foliar, massa seca e diminuição do estresse oxidativo (NAZAR *et al.*, 2015).

Enquanto a prolina compreende menos de 5% do total de aminoácidos livres em plantas em condições regulares, a sua concentração pode aumentar em até 80% sob diferentes tipos de estresse (MEENA *et al.*, 2019). Dessa forma, há diversos fatores, como aqui mencionados, que agem no acúmulo da prolina para que esse aminoácido possa mitigar os efeitos da deficiência hídrica ao desempenhar suas várias funções protetoras, como osmoprotetor, estabilizando estruturas celulares, enzimas, eliminando EROS, mantendo o equilíbrio redox, além de auxiliar no desenvolvimento das plantas (MEENA *et al.*, 2019).

2.3 Prolina exógena

Em situações estressantes, o acúmulo de prolina nas plantas varia de espécie para espécie e pode ser cem vezes maior do que na situação controle.

Assim, a aplicação de prolina de forma exógena é considerada uma técnica simples que pode beneficiar as plantas, provocando tolerância e atenuando os efeitos causados pelo estresse (ZOUARI *et al.*, 2019). Há relatos que esta aplicação pode promover aumento dos níveis endógenos de prolina, transcrição dos genes *P5CS* e *P5CR* e redução na atividade das enzimas antioxidantes (NOUNJAN; NGHIA; THEERAKULPISUT, 2012; HASANUZZAMAN *et al.*, 2014).

A aplicação exógena de prolina na concentração de 30 mM em milho (*Zea mays*) sob déficit hídrico aumentou o teor de açúcar, óleo, proteínas, fibras, as concentrações de compostos antioxidantes e eliminou radicais livres (ALI *et al.*, 2013). Em ervilha (*Pisum sativum*), a suplementação com prolina (4 mM) proporcionou aumento no rendimento e na concentração de proteínas solúveis, aumentou o sistema de defesa antioxidante não-enzimático, melhorou a produção e translocação de fotoassimilados em plantas submetidas à seca (OSMAN, 2015). A pulverização foliar com 6 mM de prolina em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) auxiliou no crescimento e rendimento, aumentou o conteúdo de clorofila, carotenóides, nutrientes da parte aérea e das sementes, conteúdo relativo de água, atividade de enzimas antioxidantes e conteúdo de prolina quando as plantas foram expostas à deficiência hídrica (MERWAD; DESOKY; RADY, 2018).

Em melão (*Cucumis melo*) sob estresse salino, a aplicação de prolina exógena manteve a integridade das membranas celulares, reduziu o teor de peróxido de hidrogênio e malondialdeído, aumentou o peso fresco e seco, teor de clorofila, fotossíntese líquida e eficiência do fotossistema II (YAN *et al.*, 2011). Kaya *et al.* (2007) verificaram nessa mesma cultura que a aplicação de prolina na concentração de 10 mM proporcionou aumento no crescimento e na produtividade, sendo esse desempenho creditado à maior absorção e acúmulo de potássio, cálcio e nitrogênio e a redução de sódio na parte aérea sob condições de estresse salino. Também em melão, a concentração de 12 mM foi eficiente em reduzir o efeito estressante causado pela salinidade da água de irrigação, resultando em um aumento na produção (LACERDA *et al.*, 2012).

Em petúnia (*Petunia hybrida*) transformada com a inserção do gene *P5CS* de *Arabidopsis thaliana* (*AtP5CS*), a aplicação de prolina resultou em aumento do acúmulo desse aminoácido em plantas selvagens e transgênicas, sendo que as plantas transgênicas mostraram um acúmulo 18 vezes maior (YAMADA *et al.*, 2005). Já em feijão (*Phaseolus vulgaris*), a aplicação exógena de prolina (50 µM) foi efetiva

na redução dos efeitos inibitórios do selênio, levando a uma melhoria significativa no crescimento de plântulas, sugerindo que este aminoácido faz parte de um dos mecanismos que regem o crescimento. Além disso, o dano da membrana foi significativamente reduzido, acompanhado por aumento no teor de água foliar e de clorofila (AGGARWAL *et al.*, 2011). Em milho, houve proteção das mudas contra choque-térmico, aumentando a porcentagem de sobrevivência das mesmas (LI; DING; DU, 2013). Pequenas concentrações de prolina exógena (20 μM) promoveram o crescimento radicular, sendo que esse aminoácido foi capaz de modular o tamanho da zona meristemática da raiz em *Arabidopsis thaliana*, modulando a relação entre divisão celular e diferenciação celular (BIANCUCCI *et al.*, 2015). A forma exógena de adição desse soluto também mostrou efeitos positivos em meio de cultura (JAIN *et al.*, 2001) e no tratamento de sementes de trigo (KAMRAN *et al.*, 2009).

Entretanto, há dúvidas se essa aplicação exógena fornece este aminoácido para atuar diretamente na mitigação dos efeitos deletérios dos estresses ou ativa a via de catabolismo da prolina, ocasionando o aumento da produção *de novo* desse aminoácido através da maior disponibilidade de glutamato formado a partir da sua oxidação. Além disso, cada molécula de prolina oxidada pode produzir 30 equivalentes de ATP (ATKINSON, 1977) contribuindo para a fosforilação oxidativa, além de doar elétrons para a cadeia de transporte de elétrons respiratórios (HARE; CRESS, 1997).

Apesar da função essencial da prolina no metabolismo das plantas, o acúmulo demasiado desse aminoácido nos tecidos vegetais e/ou seu fornecimento exógeno em doses excessivas pode causar efeitos tóxicos (MEENA *et al.*, 2019). Essa toxicidade pode ser devida à repressão de genes envolvidos em funções-chave do metabolismo da planta, como a fotossíntese ou síntese de proteínas associadas à parede celular (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008). Os sintomas da intoxicação incluem alteração na ultraestrutura dos cloroplastos e mitocôndrias, inibição do crescimento e divisão celular, bem como morte celular programada (HARE; CRESS; VAN STADEN, 2002; DEUSCHLE *et al.*, 2004).

Portanto, é essencial determinar concentrações ideais de prolina que proporcionem efeitos benéficos às plantas, sendo que concentrações ótimas desse aminoácido podem ser dependentes de espécies ou genótipos (ZOUARI *et al.*, 2019).

2.4 Plantas transgênicas visando o metabolismo de prolina para tolerância ao estresse

Plantas transgênicas contêm um ou mais genes de outra espécie introduzidos por meio da técnica de transformação genética. A sequência do gene inserido é conhecida como transgene. Através desta técnica, uma nova característica pode ser inserida na planta e transmitida para seus descendentes (RANI; USHA, 2013).

A engenharia genética tem desenvolvido plantas geneticamente modificadas visando o metabolismo de prolina que permitem melhorar o conhecimento dos fatores moleculares que modulam essas vias biológicas. Além disso, permitem entender o papel desse aminoácido na tolerância das plantas a estresses abióticos visando maior produtividade das culturas (KISHOR; SREENIVASULU, 2014).

A utilização dessas plantas transgênicas e sua contribuição na tolerância ao estresse tem sido o foco de muitos pesquisadores. Há vários relatos de plantas que foram transformadas com a inserção de genes da via metabólica da prolina de outras espécies, conferindo maior acúmulo do osmólito e tolerância a estresses abióticos: soja (*Glycine max*) com o gene *P5CR* de *Arabidopsis thaliana* (*AtP5CR*) resultando em maior resistência ao calor e seca (RONDE *et al.*, 2004); batata (*Solanum tuberosum*) com *P5CS* de *Arabidopsis thaliana* (*AtP5CS*) (HMIDA-SAYARI *et al.*, 2005); *Arabidopsis thaliana* com *P5CS* de *Phaseolus vulgaris* (*PvP5CS*) (CHEN *et al.*, 2013); soja com o gene *P5CS* de *Solanum torvum* (*StP5CS*) (ZHANG *et al.*, 2015); *Panicum virgatum* com inserção do gene *P5CS* de *Puccinellia chinampoensis* (*PcP5CS*) (GUAN *et al.*, 2018).

Com o objetivo de se obter maior acúmulo endógeno de prolina em plantas, uma mutação no gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* foi realizada pela substituição de uma fenilalanina na posição 129 por uma alanina (*VaP5CSF129A*), a fim de se reduzir a inibição do *feedback* do *P5CS* pela prolina (ZHANG; LU; VERMA, 1995). Esse gene foi inserido em algumas plantas que mostraram a eficácia da mutação. Em laranja (*Citrus sinensis*), a inserção desse gene mutado resultou em maior acúmulo de prolina, ajuste osmótico, maior taxa fotossintética e melhor tolerância ao déficit hídrico (MOLINARI *et al.*, 2004). Em trigo (*Triticum aestivum*) observou-se redução da peroxidação lipídica da membrana e nos danos gerados por EROS durante deficiência hídrica (VENDRUSCOLO *et al.*, 2007). Já em sorgo (*Sorghum*

bicolor), as plantas transgênicas foram capazes de lidar melhor com o estresse salino do que os controles não transformados, protegendo as atividades das enzimas da via fotossintética e antioxidantes (REDDY *et al.*, 2015). O mutante *VaP5CSF129A* também foi inserido em tabaco (*Nicotiana tabacum*) sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S, onde as plantas transgênicas acumularam mais prolina e exibiram maior tolerância ao déficit hídrico (CVIKROVÁ *et al.*, 2013; BORGIO; MARUR; VIEIRA, 2015).

O tabaco é uma das plantas mais transformadas geneticamente e serve como organismo modelo para outras espécies (RANI; USHA, 2013). É um alotetraploide com um grande genoma. Como espécie, *Nicotiana tabacum* ($2n=4x=48$) evoluiu através da hibridação dos ancestrais de *Nicotiana sylvestris* ($2n=24$, doadora materna) e *Nicotiana tomentosiformis* ($2n=24$, doadora paterna) (SIERRO *et al.*, 2014). Vários são os fatores que levaram essa planta a tornar-se um organismo modelo. Há anos atrás, e até nos dias atuais, o tabaco é uma cultura histórica e economicamente importante e isso fez com que se tornasse muito conhecida e estudada, tornando-se um modelo na ciência das plantas (DHINGRA *et al.*, 2009).

Com relação a sua importância econômica, o Brasil lidera o *ranking* de exportação mundial de tabaco, mantendo-se nessa posição há anos. Também o país é destaque na produtividade, onde a cultura mostra sua magnitude para a geração de renda e emprego nas regiões do Brasil, especialmente no sul, com cerca de 150 mil produtores envolvidos no cultivo do tabaco, com uma produção total de 632 mil toneladas, resultando em uma renda de R\$ 6,28 bilhões aos produtores na safra 2017/2018 (SINDITABACO, 2019). O cultivo é realizado em uma grande amplitude de climas, entretanto, não tolera geada e necessita de temperatura média diária entre 20 e 30°C para um bom desenvolvimento. A cultura é sensível ao encharcamento e exige solos bem arejados, drenados e férteis (OLIVEIRA; COSTA, 2012). Apesar ser uma planta classificada com metabolismo fotossintético C3, o tabaco apresenta altas taxas fotossintéticas e elevadas atividades das enzimas descarboxilases necessárias para a fotossíntese C4 (BROWN *et al.*, 2010).

É uma planta de ciclo curto, cerca de três a quatro meses, e produz milhares de sementes (SIERRO *et al.*, 2014). O tabaco possui alta capacidade de regeneração quando cultivado *in vitro* e por esse motivo é tão utilizado na cultura de tecidos (DHINGRA *et al.*, 2009). Devido a métodos de transformação bem

estabelecidos, possui fácil propagação, além de ter o genoma sequenciado (RANI; USHA, 2013). Em virtude, principalmente de seu protocolo de regeneração eficaz, o tabaco foi a primeira planta a ser transformada. Essa planta deu início a uma era de pesquisa e tornou-se uma hospedeira para estudar e testar genes para projetar resistência a várias formas de estresse (DHINGRA *et al.*, 2009).

2.5 Vias de dissipação de energia contra o estresse oxidativo

2.5.1 Válvula de malato

Os diversos tipos de estresses abióticos, como a deficiência hídrica, afetam o sistema fotossintético das plantas. A fotossíntese é um processo dividido em duas etapas: fotoquímica e bioquímica. A etapa fotoquímica, conhecida também como fase clara, é responsável pela produção de ATP e NADPH que serão utilizados na etapa seguinte – a bioquímica, onde ocorre a síntese dos carboidratos. Na fase clara, quando a luz solar é absorvida pelos pigmentos fotossintéticos, como a clorofila, ocorre a excitação e inicia-se o transporte de elétrons energizados do fotossistema II para o fotossistema I através de transportadores de elétrons. O transporte de elétrons e a oxidação da água causam acúmulo de prótons que ativam a enzima ATP sintase resultando na produção de ATP e, no fotossistema I são gerados equivalentes redutores via fotorredução de NADP^+ catalisada pela ferredoxina redutase (TAIZ; ZEIGER, 2013).

O déficit hídrico ocasiona desestruturação das membranas e um acúmulo de equivalentes redutores no cloroplasto, impedindo o transporte de elétrons. Isso pode acarretar estresse oxidativo celular a partir da formação de EROS. As plantas possuem vários mecanismos para a dissipação do excesso de elétrons para proteger o aparato fotossintético, sendo que esses equivalentes redutores podem ser transferidos para a mitocôndria através de processos que operam entre os dois compartimentos (DINAKAR *et al.*, 2016). A válvula de malato é um exemplo desse sistema que utiliza os equivalentes redutores e, o excesso de elétrons dos cloroplastos é exportado para as mitocôndrias, onde são oxidados pela cadeia transportadora de elétrons da respiração, permitindo a manutenção das altas taxas fotossintéticas, além de equilibrar a relação ATP/NADPH para evitar fotoinibição sob

vários tipos de estresse (SCHEIBE, 2004; NOCTOR; PAEPE; FOYER, 2007) (Figura 2).

O malato e o oxaloacetato são os dois metabólitos mais importantes envolvidos no transporte redox entre os cloroplastos, as mitocôndrias e o citosol (DINAKAR *et al.*, 2016). A enzima malato desidrogenase dependente de NADP^+ (NADP-MDH) é a enzima chave da válvula de malato, onde ela realiza a conversão do oxaloacetato em malato usando NADPH, facilitando a regeneração do acceptor de elétrons NADP^+ nos cloroplastos, particularmente quando a assimilação de CO_2 é restrita. O malato é transportado para a mitocôndria para ser reconvertido em oxaloacetato pela NAD-MDH produzindo NADH^+ que é útil na cadeia respiratória (SCHEIBE, 2004).

Quando NADP^+ ou outros aceptores de elétrons estão indisponíveis, o superóxido é o primeiro radical livre a ser formado através da redução do oxigênio molecular. Com isso, o excesso de prótons e elétrons e a indisponibilidade dos aceptores faz com que ocorra a formação de outros radicais a partir do superóxido. Assim, a reoxidação de NADPH para NADP^+ realizada pela válvula de malato é importante para equilibrar a relação ATP/NADPH e manter a homeostase redox, pois com a regeneração do acceptor NADP^+ , este realizará a drenagem do excesso de prótons e elétrons acumulados sob estresse reduzindo o estresse oxidativo (STRAND *et al.*, 2015). A ativação de NADP-MDH e, conseqüentemente, da válvula de malato são altas somente quando há escassez de NADP^+ (SCHEIBE, 2004).

Outro mecanismo que pode complementar a ação da válvula de malato pelo aumento da disponibilidade de NADP^+ como acceptor final da cadeia de transporte de elétrons fotossintético é a via biossintética de prolina (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Ronde *et al.* (2004) mostraram que plantas transgênicas com superexpressão de *P5CS* apresentaram maiores quantidades de NADP^+ . Como já mencionado, muitas condições estressantes fazem com que as plantas apresentem baixa disponibilidade de NADP^+ aumentando o acúmulo de prótons e elétrons, levando a formação de EROS. Com isso, a grande quantidade de prolina acumulada nas folhas pode ser consequência da necessidade da regeneração do NADP^+ . O glutamato é reduzido à prolina para reoxidar o NADP^+ , evitando a interrupção do fluxo de elétrons e a produção dessas espécies reativas de oxigênio. A prolina pode ser oxidada para glutamato nas mitocôndrias auxiliando na produção de ATP e o

excesso desse aminoácido pode ser enviado para outros órgãos, como as raízes (SIGNORELLI, 2016).

Assim, a prolina pode atuar como um mecanismo complementar/compensatório para a válvula de malato. A análise de plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes com nocaute do gene *NADP-MDH* revelou outros mecanismos para lidar com o excesso de equivalentes redutores, dentre eles a biossíntese de prolina (HEBBELMANN *et al.*, 2012). Entretanto, a contribuição da prolina em comparação com a válvula de malato na regeneração do NADP^+ no cloroplasto é algo que precisa de uma investigação mais aprofundada (SIGNORELLI, 2016).

2.5.2 Oxidase alternativa (AOX)

A respiração mitocondrial pode atuar como um mecanismo que permite com que a planta enfrente as variações no metabolismo sob déficit hídrico (BHARGAVA; SAWANT, 2013). As mitocôndrias são responsáveis pela respiração celular que gera a energia necessária para as atividades celulares. Neste processo, a glicose produzida na fotossíntese é degradada no citosol formando piruvato através da glicólise. O piruvato é transportado para a mitocôndria para que ocorra a segunda etapa da respiração: o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), onde o piruvato será oxidado formando gás carbônico (CO_2), água (H_2O), FADH_2 e NADH . Por fim, FADH_2 e NADH liberarão elétrons na cadeia de transporte de elétrons para sintetizar ATP, reduzindo o oxigênio (O_2) a H_2O (VANLERBERGHE, 2013).

O transporte de elétrons é realizado por quatro complexos proteicos: complexo I - desidrogenase do NADH , que oxida os elétrons de NADH e os transfere para a ubiquinona; complexo II - desidrogenase do succinato, onde os elétrons gerados pela oxidação do succinato são transferidos via FADH_2 para o pool de ubiquinona; complexo III - oxidoreductase do citocromo c, que vai oxidar a ubiquinona reduzida (ubiquinol) e transferir elétrons para o complexo IV, que se trata da oxidase terminal, reduzindo O_2 a H_2O . A cadeia de transporte de elétrons é acoplada a translocação de prótons e, a partir da energia liberada nesse processo ocorre a fosforilação oxidativa, que é a síntese de ATP (complexo V – ATP sintase) (VANLERBERGHE, 2013) (Figura 2).

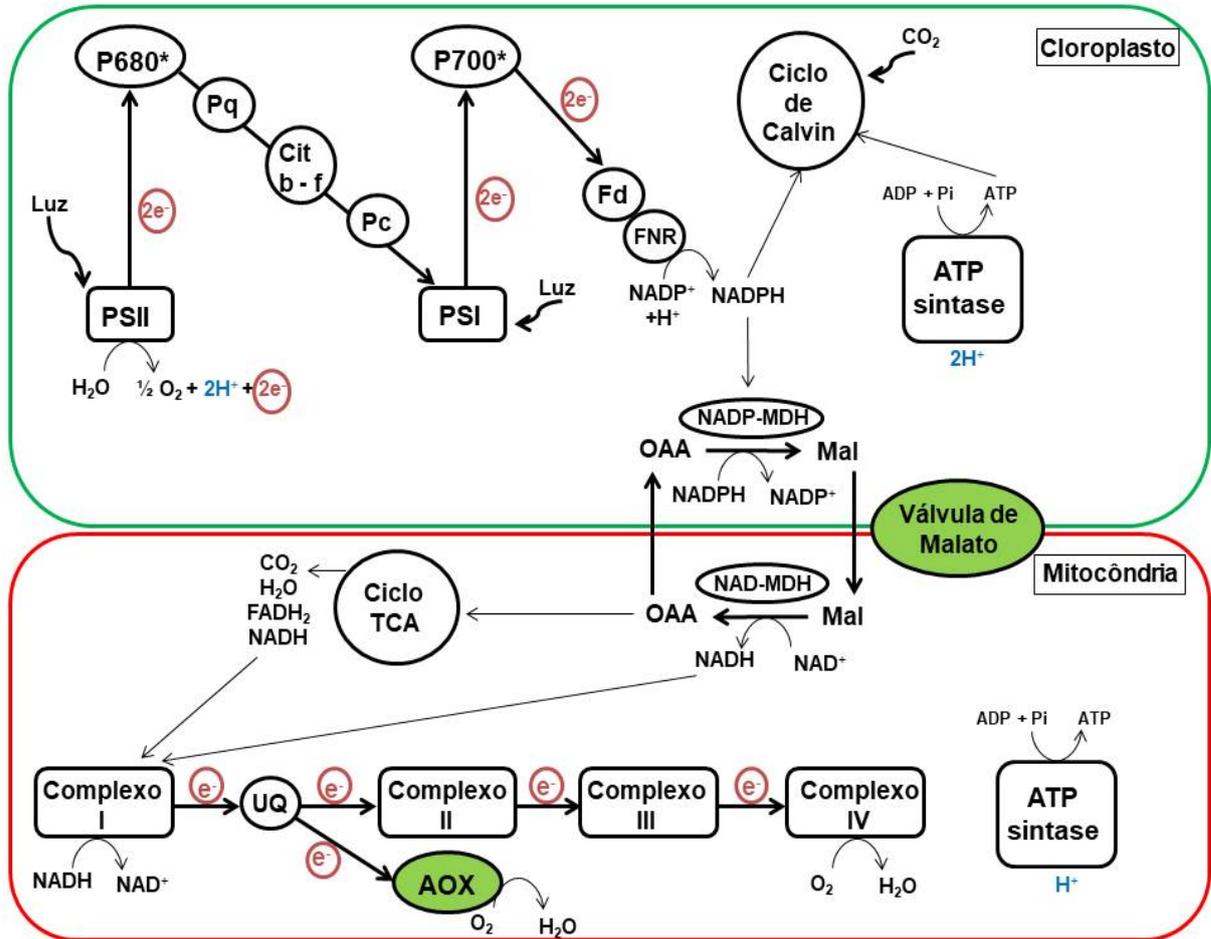
Outra oxidase terminal está presente nas mitocôndrias além do complexo IV – a oxidase alternativa (AOX). Quando a via AOX é utilizada, os complexos III e IV da cadeia de transporte de elétrons são ignorados e os elétrons são diretamente transferidos para o oxigênio (BHARGAVA; SAWANT, 2013). Neste processo, a AOX é capaz de oxidar diretamente o ubiquinol e reduzir O_2 a H_2O . Quando acontece esse fluxo de elétrons do ubiquinol para AOX não ocorre bombeamento de prótons, pois os complexos III e IV responsáveis por esse bombeamento são ignorados, reduzindo drasticamente o rendimento de energia (ATP) (VANLERBERGHE, 2013). Dessa forma, a AOX é considerada um sistema dissipador de energia, pois é um caminho não fosforilativo, sendo um processo importante para as plantas sob diferentes estresses ambientais. Ela é um marcador de estresse oxidativo celular, impede a geração de EROS nas mitocôndrias, pois atua para prevenir a redução excessiva dos componentes da cadeia de transporte de elétrons que leva ao desemparelhamento de elétrons (BHARGAVA; SAWANT, 2013).

AOX é codificada por uma pequena família de genes, composta por duas subfamílias distintas denominadas *AOX1* e *AOX2*. A expressão do gene *AOX1a* em tabaco e *Arabidopsis thaliana* é altamente responsiva ao estresse abiótico e biótico, bem como a disfunções no metabolismo respiratório (CLIFTON; MILLAR; WHELAN, 2006).

Estresses abióticos, como a deficiência hídrica, são conhecidos por elevar a quantidade de AOX, apoiando a ideia de que tais estresses afetam a função mitocondrial e que a AOX pode representar uma importante resposta de aclimação. Em *Nicotiana sylvestris*, houve um pequeno aumento da quantidade da proteína AOX, sendo que a respiração total diminuiu sob seca, de modo que a AOX foi responsável por uma maior porcentagem do fluxo total de elétrons (GALLE *et al.*, 2010). Plantas de tabaco selvagem submetidas ao déficit hídrico resultaram em aumento progressivo da quantidade de transcritos de *AOX1a* e de proteína conforme aumento da intensidade do estresse. Já as plantas transgênicas com nocaute do gene *AOX*, sofreram mais danos celulares do que as selvagens, além de apresentarem menor poder de recuperação quando reidratadas (WANG; VANLERBERGHE, 2013). Esses autores também observaram um aumento na atividade de NAD-MDH. Isso pode ser explicado pelo fato dessa enzima servir de suporte para importação do excesso de poder redutor do citosol para a mitocôndria (WANG; VANLERBERGHE, 2013).

Quando a assimilação de CO₂ é impedida pelo estresse, a mitocôndria pode desempenhar um papel importante na oxidação do excesso de redutores do cloroplasto, via malato/oxaloacetato (válvula de malato) para posterior oxidação por AOX (WANG; VANLERBERGHE, 2013) (Figura 2). Dessa forma, foi proposto que AOX faça parte de um mecanismo fotoprotetor, permitindo desempenho fotossintético eficiente (ARAÚJO; NUNES-NESE; FERNIE, 2014). Além disso, as plantas têm saídas diferentes para descartar equivalentes redutores em excesso dos cloroplastos para evitar ou minimizar os danos causados às membranas dos tilacóides por fotoinibição (DINAKAR; RAGHAVENDRA; PADMASREE, 2010).

Figura 2 - Válvula de malato e oxidase alternativa (AOX) como vias de dissipação de energia na cadeia de transporte de elétrons no cloroplasto e na mitocôndria, respectivamente.



Abreviações: PSII, fotossistema II; Pq, plastoquinona; Cit b-f, citocromo; Pc, plastocianina; PSI, fotossistema I; Fd, ferredoxina; FNR, ferredoxina NADP-redutase; OAA, oxaloacetato; Mal, malato; NADP-MDH, NADP-malato desidrogenase; NAD-MDH, NAD-malato desidrogenase; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico; UQ, ubiquinona; AOX, oxidase alternativa; e⁻, elétron.

Fonte: Autor. Adaptado de Zhang *et al.* (2017).

Como mencionado, a prolina pode compensar/complementar as vias de dissipação de energia, principalmente a válvula de malato, evitando estresse oxidativo pela liberação de aceptores de elétrons em sua via biossintética. Em contraste, o fluxo de elétrons gerado a partir da oxidação da prolina no seu catabolismo nas mitocôndrias é principalmente direcionado para a via AOX e não contribuem eficientemente para síntese de ATP (LAUNAY *et al.*, 2019). Além disso, a aplicação de prolina exógena pode aumentar o catabolismo desse aminoácido produzindo glutamato, o qual poderá passar por um processo de transaminação,

formando piruvato que irá alimentar o ciclo TCA. Neste ciclo, são gerados equivalentes redutores que podem ser dissipados pela AOX (SIGNORELLI, 2016). Por fim, o processo de degradação da prolina pode ativar a via AOX também como de forma de atenuar os efeitos dos estresses ambientais, fato este que necessita de maiores estudos.

2.6 Ionômica

Os sistemas biológicos são regidos pelo genoma através do transcriptoma, que estabelecerá as proteínas que serão produzidas - o proteoma. Este, por sua vez, irá definir o metaboloma e o ionoma do sistema, resultando na expressão de genes e proteínas, metabólitos e elementos minerais de um organismo em condições ambientais específicas, seja sob estresse ou não (SALT *et al.*, 2008).

A ionômica é definida como uma medição quantitativa da composição elementar de organismos vivos e as mudanças nesta composição em resposta a estímulos fisiológicos, ao estágio de desenvolvimento e modificações genéticas. Sendo assim, a ionômica busca compreender a conexão fisiológica e genética entre um elemento e sua absorção, transporte e acúmulo nas plantas submetidas a diferentes condições ambientais (ARDINI *et al.*, 2013).

Os nutrientes minerais, os quais são avaliados através da análise ionômica, são elementos que podem minimizar os efeitos negativos do estresse através do seu envolvimento em várias atividades metabólicas, desempenhando um papel na modulação dos componentes de várias vias de sinalização (ANJUM; LOPEZ-LAURI, 2011). Os elementos minerais considerados essenciais para as plantas são divididos em macronutrientes e micronutrientes. Nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) são os macronutrientes e considerados componentes celulares cruciais, necessários em grandes quantidades. Os micronutrientes, como boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) são necessários em quantidades menores (MORGAN; CONNOLLY, 2013). O N é um dos principais macroelementos necessário para o crescimento e desenvolvimento adequado das plantas, sendo o principal componente estrutural das proteínas, coenzimas, clorofila, pirimidinas, purinas e ácidos nucleicos (AHANGER *et al.*, 2016). O P é indispensável para o crescimento, pois tem um papel importante na preservação e transferência de energia no metabolismo da planta por

ser um dos componentes da molécula adenosina trifosfato (ATP), responsável pelo armazenamento de energia (WANG *et al.*, 2015). O K desempenha um papel vital na manutenção do estado hídrico da planta, movimentos estomáticos, osmorregulação e estabilidade de membranas (EREL *et al.*, 2015). O Ca está envolvido no desenvolvimento da parede celular, membrana plasmática, crescimento celular, ativação de enzimas e atua como molécula de sinalização de fatores ambientais e hormônios (LISUMA; MBEGA; NDAKIDEMI, 2020). A principal função do Mg é como um componente da molécula de clorofila, sendo essencial para manutenção da atividade fotossintética das plantas, além de ser cofator para muitas enzimas (WANG *et al.*, 2020). O S é outro elemento essencial necessário para a formação de clorofila, enzimas, proteínas e aminoácidos (RIFFAT; AHMAD, 2018). Dentre os micronutrientes, o B é constituinte da parede celular, regula a biossíntese de lignina, diferenciação do xilema e integridade das membranas (SILVA *et al.*, 2010). O Cu atua nas cadeias de transporte de elétrons fotossintética e respiratória, detecção de etileno, parede celular, assimilação de N e proteção contra o estresse oxidativo, sendo cofator de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), uma das principais enzimas antioxidantes (CuZn-SOD) (SUN *et al.*, 2017). O Fe está envolvido na produção de clorofila e é um componente e cofator de muitas enzimas associadas à transferência de energia, redução de nitrogênio, formação de lignina e antioxidantes, como a Fe-SOD (AHANGER *et al.*, 2016). O Mn é cofator de várias enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e da via do ácido chiquímico que levam ao processo biossintético de metabólitos secundários. Também está envolvido na atividade fotossintética, transporte de elétrons e na atividade antioxidante pela Mn-SOD (UPADHYAYA *et al.*, 2012). O Zn atua como um componente metálico funcional, estrutural ou cofator de um grande número de enzimas, como CuZn-SOD, anidrase carbônica, RNA polimerase, e ainda participa do metabolismo de carboidratos, auxinas e síntese de proteínas (SILVA *et al.*, 2010).

Os elementos minerais são normalmente obtidos do solo através das raízes das plantas, mas muitos fatores podem afetar a absorção desses nutrientes. Dentre esses fatores pode-se citar a química e a composição dos solos, a disponibilidade dos nutrientes, conteúdo de água, pH, compactação e diversas perturbações ambientais (MORGAN; CONNOLLY, 2013). O déficit hídrico reduz a absorção e transporte de nutrientes minerais basicamente pela diminuição das taxas de

transpiração e alteração da função dos transportadores de membrana (AHANGER *et al.*, 2016).

A prolina, além de atuar como uma molécula osmoprotetora e mitigar os efeitos de vários tipos de estresse, como a deficiência hídrica, também pode auxiliar no aumento do conteúdo de elementos minerais nas plantas (MERWAD; DESOKY; RADY, 2018). Esses autores observaram que o déficit hídrico em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) reduziu os teores dos nutrientes N, P e K em relação às plantas irrigadas, sendo que a aplicação de prolina exógena na concentração de 6 mM auxiliou na absorção desses macronutrientes sob estresse hídrico. Ainda, plantas de milho (*Zea mays*) submetidas à deficiência hídrica apresentaram uma diminuição nos teores de N, P, K, Ca e Mg, tendo a aplicação de 30 e 60 mM de prolina aumentado a quantidade endógena desse aminoácido e promovido a absorção de todos os macronutrientes em condições de estresse hídrico (ALI *et al.*, 2008). Neste caso, estes autores sugeriram que a prolina influenciou no aumento da taxa de transpiração das folhas, criando uma tensão da água necessária para a absorção radicular dos nutrientes essenciais da solução do solo.

Dessa forma, é importante compreender se o acúmulo de prolina pode modificar a absorção, transporte e disponibilidade de elementos minerais nas plantas, e auxiliar no entendimento de processos metabólicos dos vegetais em diferentes condições ambientais.

3 CAPÍTULO 1

Prolina complementa as vias de dissipação do estresse oxidativo - válvula de malato e oxidase alternativa - em plantas de tabaco submetidas à deficiência hídrica

RESUMO

O acúmulo de prolina é uma resposta das plantas com o intuito de aliviar os efeitos prejudiciais da deficiência hídrica. Por esse motivo, plantas transgênicas que acumulam altos níveis endógenos de prolina e a aplicação exógena desse aminoácido têm sido estudadas. A fim de evitar o estresse oxidativo ocasionado pelo déficit hídrico, as plantas utilizam vias de dissipação de energia, como a válvula de malato e oxidase alternativa; e a prolina pode vir a compensar/complementar essas vias por atuar no equilíbrio redox das células. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de plantas de tabaco selvagens e geneticamente modificadas para a superprodução de prolina submetidas a aplicações exógenas desse osmólito sob deficiência hídrica. O experimento foi realizado em casa de vegetação, utilizando um evento transgênico com expressão constitutiva do gene *VaP5CSF129A* e o controle não transformado (selvagem), duas doses de prolina: 0 e 10 mM e dois regimes hídricos: irrigado e deficiência hídrica. Aos trinta dias após o transplante das mudas para os vasos foram realizadas três aplicações foliares de prolina e três dias após a última aplicação a irrigação foi suspensa por nove dias. Após o período de déficit hídrico, as plantas foram reidratadas e 48 h após a reidratação avaliou-se também a recuperação. Foram realizadas análises fisiológicas do conteúdo relativo de água, trocas gasosas foliares e biomassa, avaliações bioquímicas do conteúdo de prolina, peroxidação de lipídeos, conteúdo de proteínas solúveis totais e de clorofila total. Foram avaliadas a expressão dos genes *P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR*, *ProDH1*, *ProDH2*, *P5CDH*, *NADP-MDH*, *NAD-MDH*, *AOX* e o transgene *VaP5CSF129A*, as atividades das enzimas *NADP-MDH* e *ProDH* e as razões $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ e NAD^+/NADH . As plantas transgênicas acumularam maior conteúdo de prolina sob deficiência hídrica e na recuperação do que as selvagens, sendo este ainda maior com a aplicação exógena. Isto foi causado pelo aumento na expressão dos genes responsáveis pela biossíntese de prolina, principalmente *P5CS1*, e a redução dos genes da via catabólica, especialmente *ProDH2*. A aplicação de prolina exógena reduziu os efeitos negativos do déficit hídrico na atividade fotossintética e proporcionou maior acúmulo de biomassa em ambos os genótipos, sendo que as plantas transgênicas foram ainda menos afetadas e exibiram maior recuperação. A prolina atuou como um mecanismo complementar/compensatório para as vias de dissipação de energia que foram menos utilizadas na deficiência hídrica pelo acúmulo deste aminoácido nas plantas. *NADP-MDH* e *AOX* foram menos ativas nas plantas transgênicas com alto acúmulo endógeno de prolina do que nas selvagens, e a aplicação exógena de prolina reduziu ainda mais a expressão desses genes e a atividade de *NADP-MDH*.

Palavras-chave: Osmoprotetor. Estresse. *NADP-MDH*. *AOX*.

ABSTRACT

Proline complements the dissipation pathways of oxidative stress - malate valve and alternative oxidase - in tobacco plants subjected to water deficiency

The accumulation of proline is a response of plants in order to alleviate the injurious effects of water deficiency. For this reason, transgenic plants that accumulate high endogenous levels of proline and the exogenous application of this amino acid have been studied. In order to avoid oxidative stress caused by water deficit, plants use energy dissipation pathways, such as the malate valve and alternative oxidase; and proline can compensate/complement these pathways by acting on the redox balance of cells. In this context, the objective of this work was to evaluate the physiological, biochemical and molecular responses of wild and genetically modified tobacco plants for overproduction of proline submitted to exogenous applications of this osmolyte under water deficiency. The experiment was carried out in a greenhouse, using a transgenic event with constitutive expression of the *VaP5CSF129A* gene and the untransformed (wild) control, two exogenous proline concentrations: 0 and 10 mM and two water regimes: irrigated and deficiency water. Thirty days after transplanting the seedlings into pots, three foliar applications of proline were performed and irrigation was suspended three days after the last application for nine days. After the water deficit period, the plants were rehydrated and 48 h after rehydration recovery was also evaluated. Physiological analyzes of relative water content, leaf gas exchange and biomass, biochemical evaluations of proline content, lipid peroxidation, total soluble protein content and total chlorophyll content were performed. The expression of the *P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR*, *ProDH1*, *ProDH2*, *P5CDH*, *NADP-MDH*, *NAD-MDH*, *AOX* and *VaP5CSF129A* transgene, the activity of the enzymes *NADP-MDH* and *ProDH* and the ratios $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ and NAD^+/NADH were performed. Transgenic plants accumulated a higher content of proline under water deficiency and in recovery than wild plants, which was even greater with exogenous application. This was caused by the increase in the expression of the genes responsible for the proline biosynthesis, mainly *P5CS1*, and the reduction of genes in the catabolic pathway, especially *ProDH2*. The application of exogenous proline reduced the negative effects of water deficit on photosynthetic activity and provided greater biomass accumulation in both genotypes, with transgenic plants being even less affected and showing greater recovery. The proline acted as a complementary/compensatory mechanism for the energy dissipation pathways that were less used in water deficiency due to the accumulation of this amino acid in plants. *NADP-MDH* and *AOX* were less active in transgenic plants with high endogenous proline accumulation than in wild plants, and the exogenous application of proline further reduced the expression of these genes and the activity of *NADP-MDH*.

Keywords: Osmoprotector. Stress. *NADP-MDH*. *AOX*.

3.1 Introdução

A deficiência hídrica é um dos principais fatores ambientais que acarreta a redução do crescimento e a produtividade das culturas, interferindo no metabolismo vegetal através, principalmente, da diminuição da atividade fotossintética, respiração e absorção de nutrientes, resultando em menor produção de biomassa (FURLAN *et al.*, 2020).

Uma das principais respostas das plantas ao déficit hídrico envolve a manutenção do equilíbrio osmótico para compensar a perda de pressão de turgor. O turgor é mantido por meio do ajuste da elasticidade da parede celular e/ou do potencial osmótico por meio do acúmulo de solutos, como a prolina (BERGER; PALTA; VADEZ, 2016). A prolina é um aminoácido que, dentre várias funções, atua como osmoprotetor (PER *et al.*, 2017). A prolina acumulada durante a deficiência hídrica aumenta a resistência ao estresse por meio do alívio da desidratação dos tecidos pelo ajuste osmótico celular, bem como a proteção das membranas celulares proteínas e enzimas do efeito prejudicial da redução de água nas células (BANDURSKA *et al.*, 2017). O acúmulo de prolina nas plantas pode ocorrer de forma mais expressiva através do uso de plantas geneticamente modificadas para superprodução endógena desse aminoácido ou pela aplicação de prolina exógena, e ambas as formas podem aumentar a tolerância das culturas à seca (PER *et al.*, 2017).

Como efeito da deficiência hídrica, a redução da fotossíntese acarreta o acúmulo de equivalentes redutores (NAD(P)H) no cloroplasto. Uma forma pela qual o cloroplasto pode dissipar equivalentes redutores é por meio da válvula de malato. Através da ação da enzima NADP-MDH, o malato é exportado do cloroplasto para que seja oxidado na mitocôndria, ativando a via da oxidase alternativa (AOX). Neste mecanismo, também ocorre a regeneração de aceptores de elétrons (NA(D)P⁺) que irão manter o transporte de elétrons evitando danos no sistema fotossintético sob estresse (ZHAO *et al.*, 2020). A via biossintética de prolina utiliza equivalentes redutores e libera aceptores de elétrons, enquanto seu catabolismo fornece esses equivalentes (FORLANI *et al.*, 2019). Dessa forma, uma hipótese a ser testada é verificar se o metabolismo de prolina pode compensar e/ou complementar vias de dissipação de energia, como a válvula de malato, mantendo o equilíbrio redox entre os compartimentos celulares.

Finalmente, é de grande relevância avaliar plantas com alto acúmulo endógeno de prolina e plantas submetidas à aplicação exógena deste aminoácido para compreender os vários mecanismos pelo qual a prolina pode influenciar na tolerância a deficiência hídrica.

3.2 Objetivo

3.2.1 Objetivo geral

Avaliar as respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares de plantas de tabaco selvagens e geneticamente modificadas para a superprodução endógena de prolina submetidas a aplicações exógenas desse osmólito sob deficiência hídrica.

3.2.2 Objetivos específicos

Caracterizar o efeito do déficit hídrico em plantas de tabaco selvagens e transgênicas, sem e com aplicação exógena de prolina, através do conteúdo de prolina, MDA, CRA, trocas gasosas foliares e acúmulo de biomassa.

Avaliar o perfil transcricional dos genes envolvidos na biossíntese e catabolismo da prolina (*P5CS*, *P5CR*, *ProDH* e *P5CDH*), válvula de malato (*NADP-MDH*), *NAD-MDH*, oxidase alternativa (*AOX*) e o transgene *VaP5CSF129A*, as atividades das enzimas *NADP-MDH* e *ProDH* e as razões $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ em função do aumento da produção endógena e da aplicação exógena de prolina em plantas submetidas à deficiência hídrica.

Verificar a influência da prolina endógena e exógena nas vias de dissipação de energia - válvula de malato e oxidase alternativa - durante o déficit hídrico em comparação com plantas irrigadas.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Delineamento experimental

O experimento foi realizado no Campus II da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), em Presidente Prudente - SP, no período de janeiro a abril de 2018,

em condições de casa de vegetação, localizada a 22°06'59"S, 51°27'02"W e altitude de 475 m.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por dois materiais vegetais: um evento transgênico e o controle não transformado (selvagem), duas doses de prolina: 0 e 10 mM, e dois regimes hídricos: irrigado (condições normais de suprimento de água, mantendo o solo nos vasos com 100% da capacidade de campo) e suspensão da irrigação por nove dias (deficiência hídrica), resultando em oito tratamentos com dez repetições cada, totalizando oitenta parcelas. Cada parcela foi representada por um vaso plástico contendo 5 kg de terra vegetal (Bioterra) com uma planta por vaso.

3.3.2 Materiais vegetais e preparo dos vasos

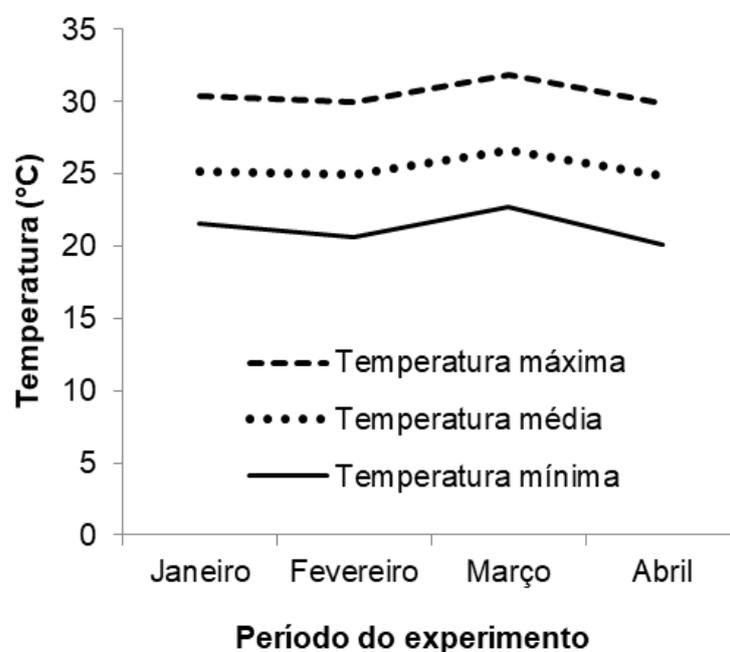
Foram utilizadas sementes da quarta geração do evento transgênico de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivar Petit Havana SR1, obtidas por transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, estirpe EHA 105, realizada por Borgo, Marur e Vieira (2015). O vetor binário utilizado foi o *pBI121-P5CSF129A* (ZHANG; LU; VERMA, 1995) contendo o gene *P5CS* de *Vigna aconitifolia* (*VaP5CSF129A*) mutado na posição 129 com a substituição de uma fenilalanina por uma alanina para reduzir a inibição do *feedback* do *P5CS* pela prolina, sob controle do promotor constitutivo CaMV 35S, o gene repórter da β -glucuronidase (*GUS*) também sob controle do promotor CaMV 35S, e o gene *nptII*, o qual confere resistência na planta ao antibiótico canamicina, sob controle do promotor PNOS, além do controle não transformado.

As sementes foram submetidas a tratamento de quebra de dormência por hipóxia, ficando submersas durante 72 h em água destilada, no escuro e a 6°C. Após esse período, foram semeadas em bandeja plástica com substrato Bioplant, composto por turfa de *sphagnum*, fibra de coco, casca de arroz, casca de *Pinus*, vermiculita e nutrientes. As mudas foram transplantadas para vasos plásticos com 5 kg de terra vegetal (Bioterra) cinquenta dias após a semeadura (duas mudas por vaso). A terra vegetal apresentou as seguintes características químicas: pH 6,6 (CaCl₂); 50,1 g dm⁻³ de matéria orgânica; 380 mg dm⁻³ de P resina; 218,1 mg dm⁻³ de S-SO₄²⁻; 10,2 mmol_c dm⁻³ de H+Al; 19,9 mmol_c dm⁻³ de K; 228,5 mmol_c dm⁻³ de Ca; 47,3 mmol_c dm⁻³ de Mg; SB (soma de bases) de 292,1 mmol_c dm⁻³; CTC

(capacidade de troca de cátions) de $302,4 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$; 96,6% de saturação por bases (V); $1,13 \text{ mg dm}^{-3}$ de B; $2,80 \text{ mg dm}^{-3}$ de Cu; $56,00 \text{ mg dm}^{-3}$ de Fe; $3,90 \text{ mg dm}^{-3}$ de Mn e $11,10 \text{ mg dm}^{-3}$ de Zn.

Após estabelecimento das mudas, realizou-se o desbaste deixando apenas uma planta por vaso. A reposição da água nos vasos foi diária, mantendo em 100% da capacidade de campo todos os vasos até o momento da imposição do déficit hídrico. Os valores das temperaturas máxima, média e mínima do ar durante o período do experimento estão apresentados na figura a seguir (Figura 3).

Figura 3 - Temperaturas máxima, média e mínima do ar ($^{\circ}\text{C}$) durante o período do experimento.



As temperaturas estão apresentadas como a média de cada mês durante o período do experimento. Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia (INMET).

3.3.3 Aplicação de prolina

Aos trinta dias após o transplante das mudas para os vasos (30 DAT), foram realizadas três aplicações foliares de solução aquosa de prolina (L-Proline, Sigma-Aldrich) na dose de 10 mM, sendo uma aplicação por dia durante três dias consecutivos (MOUSTAKAS *et al.*, 2011). Cada planta foi pulverizada com 25 mL de solução e as plantas que não receberam prolina foram pulverizadas com a mesma

quantidade de água destilada. As aplicações foram realizadas com pulverizador costal à bateria (PJB-20, Jacto), sempre no final da tarde de cada dia.

3.3.4 Imposição da deficiência hídrica

A imposição da deficiência hídrica foi iniciada três dias após a última aplicação de prolina (35 DAT), onde os vasos dos tratamentos irrigados foram mantidos com 100% da capacidade de campo e nos tratamentos com deficiência hídrica a irrigação foi suspensa por nove dias. A umidade do solo foi monitorada diariamente a partir do início do déficit hídrico utilizando um sensor (Em50G, Decagon Devices) e foi progressivamente reduzida.

Nove dias após a suspensão da irrigação (44 DAT), o solo apresentou 20% de umidade em relação aos vasos irrigados. Neste dia, foram realizadas avaliações fisiológicas (item 4.5) entre às 9 h e 11 h da manhã, e logo após, a coleta do material vegetal para posteriores análises moleculares e bioquímicas (três repetições por tratamento). Para essa coleta, a terceira folha totalmente expandida de cada planta (do ápice para a base) foi retirada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer a -80°C . As raízes foram separadas da parte aérea, lavadas em água corrente até que toda a terra vegetal fosse retirada, foram congeladas em nitrogênio líquido e também armazenadas a -80°C .

Após as coletas, restaram sete plantas por tratamento. Essas plantas foram reidratadas para avaliação da recuperação. Após 48 h da reidratação (46 DAT), foram realizadas nas plantas reidratadas e nas que permaneceram irrigadas durante todo o experimento avaliações fisiológicas (item 4.5) entre às 9 h e 11 h da manhã, e logo após, a coleta do material vegetal para posteriores análises, como descrito acima (três repetições por tratamento). Após a recuperação, as quatro plantas por tratamento restantes foram coletadas para análise de biomassa (item 4.6).

3.3.5 Avaliações fisiológicas

3.3.5.1 Conteúdo relativo de água (CRA)

O conteúdo relativo de água (CRA) foi avaliado para determinar a porcentagem de água na folha. Cinco discos foliares de 9 mm de diâmetro foram

coletados da sexta folha (do ápice para a base) de cada planta e pesados imediatamente após a coleta, correspondendo a massa fresca da amostra (Mf). Em seguida, os discos foliares foram colocados em tubos de ensaio com 10 mL de água destilada, permanecendo submersos por 24 h e pesados para obtenção da massa da folha sob saturação de água (Msat). Por fim, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar a 60°C durante 24 h, resultando na massa seca (Ms). O CRA foi calculado segundo Larcher (2000): $CRA = (Mf - Ms) / (Msat - Ms) \times 100 (\%)$.

3.3.5.2 Trocas gasosas foliares

As análises de trocas gasosas foliares foram realizadas na terceira folha totalmente expandida, entre às 9 h e 11 h da manhã, avaliando medidas pontuais de fotossíntese (A – assimilação líquida de CO_2 , $\mu mol CO_2 m^{-2}s^{-1}$), condutância estomática (G_s , $mol H_2O m^{-2}s^{-1}$), conteúdo intracelular de CO_2 (C_i , ppm), transpiração (E , $mmol H_2O m^{-2}s^{-1}$) e eficiência do uso da água ($EUA = A/E$, $\mu mol CO_2 mmol H_2O m^{-2}s^{-1}$). Para estas avaliações foi utilizado um analisador de gases por infravermelho (Li-6400XTR, Li-Cor), sob irradiação de $1000 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ e concentração de CO_2 de 400 ppm. As condições ambientais durante as análises no nono dia de suspensão da irrigação foram PAR (radiação fotossinteticamente ativa) $800 \mu mol m^{-2}s^{-1}$, temperatura do ar entre 27 e 28°C, temperatura da folha $27,94 \pm 0,9^\circ C$, umidade $67,59 \pm 3,3\%$ e déficit de pressão de vapor (VpdL) $1,14 \pm 0,4 kPa$. Durante as análises de recuperação (48 h após a reidratação) as condições ambientais foram PAR (radiação fotossinteticamente ativa) $800 \mu mol m^{-2}s^{-1}$, temperatura do ar entre 27 e 28°C, temperatura da folha $27,87 \pm 0,4^\circ C$, umidade $70,32 \pm 2,9\%$ e déficit de pressão de vapor (VpdL) $0,58 \pm 0,3 kPa$.

3.3.6 Biomassa

Ao final do experimento (46 DAT) realizou-se a coleta das plantas restantes (quatro repetições por tratamento) para avaliação da massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca da raiz (MSR, g) e massa seca total (MST = MSPA + MSR). A parte aérea foi separada das raízes e, em seguida, as raízes foram lavadas em água corrente até que toda terra vegetal fosse retirada. Para a obtenção da massa seca, as folhas e raízes foram armazenadas em sacos de papel e mantidas em

estufa com circulação de ar a 60°C até obtenção de massa constante, utilizando uma balança de precisão para a pesagem do material posterior a secagem.

3.3.7 Avaliações bioquímicas

3.3.7.1 Conteúdo de prolina

A determinação de prolina nas folhas e raízes foi feita de acordo com a metodologia descrita por Bates, Waldren e Teare (1973). Foram macerados 50 mg de tecido vegetal em nitrogênio líquido, adicionados 5 mL de ácido sulfosalicílico (3%), agitados vigorosamente em vórtex e permaneceram 15 min em repouso. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm por 3 min. Foram retirados 2 mL do sobrenadante e acrescentados 2 mL de ninidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial. As amostras foram então incubadas a 100°C em banho-maria por 1 h e, em seguida, transferidas para gelo. Após o resfriamento, foram acrescentados 4 mL de tolueno e agitados em vórtex por 20 s. As amostras permaneceram em repouso por 5 min para separação das fases e o cromóforo contendo tolueno foi retirado da fase aquosa e realizada a leitura por espectrofotometria a 520 nm. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de prolina foi determinada usando curva padrão (0 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e expressa em micromol de prolina por grama de massa fresca ($\mu\text{mol gMF}^{-1}$).

3.3.7.2 Peroxidação de lipídeos

O nível de peroxidação de lipídeos foi medido em termos de conteúdo de malondialdeído (MDA), segundo metodologia de Heath e Packer (1968). Duzentas miligramas de tecido foliar (sem a nervura central) macerados em nitrogênio líquido, foram homogeneizados em solução de etanol 80% com 6 mL de volume final, seguido de centrifugação a 3000 x g por 10 min. Do extrato, 1 mL foi misturado a mais 1 mL de solução de TCA 20% (p/v) (ácido tricloroacético) e 0,65% (p/v) de TBA (ácido tiobarbitúrico). As amostras foram então misturadas vigorosamente em vórtex e incubadas a 100°C por 25 min, e em seguida transferidas para gelo e centrifugadas a 3000 x g por 10 min. As absorbâncias foram lidas nos comprimentos de onda 532 nm e 600 nm.

Equivalentes de malondialdeído foram calculados pela seguinte fórmula: Equivalentes de MDA (nmol mL^{-1}) = $[(A_{532}-A_{600}) / 155000] \times 10^6$, onde A_{532} indica a absorbância máxima do complexo MDA-TBA a 532 nm; A_{600} é a absorbância a 600 nm, que corrige interferentes não-específicos e 155000 é o coeficiente de extinção molar para o MDA. O ensaio foi realizado em triplicata e os valores expressos em nanomol de MDA por grama de massa fresca (nmol gMF^{-1}).

3.3.7.3 Conteúdo de proteínas solúveis totais

O conteúdo de proteínas solúveis totais foi realizado de acordo com a metodologia de Bradford (1976). Para extração, 250 mg de tecido foliar foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,7). A mistura foi centrifugada por 10 min a 7500 rpm e o sobrenadante retirado. Em tubos de ensaio, foram colocados 50 μL do extrato proteico com 5 mL do reagente de Bradford (100 mg de Comassie Brilliant Blue G-250 dissolvidos em 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico 85%, diluído até o volume final de 1 L e filtrado duas vezes). Em seguida, os tubos foram homogeneizados, mantidos em repouso por 15 min e após esse período procedeu-se com a leitura das soluções em espectrofotômetro a 595 nm, sendo as análises realizadas em triplicata. O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado utilizando curva padrão com albumina de soro bovino (BSA 0 - 100 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), expresso em miligramas por grama de massa fresca (mg gMF^{-1}) e foi utilizado para calcular a atividade da enzima prolina desidrogenase (ProDH).

3.3.7.4 Conteúdo de clorofila total

O conteúdo de clorofila total foi determinado a partir de 20 mg de tecido foliar mantidos em 6 mL de solução de acetona 80% por 72 h a 4°C e protegidos da luz. Ao final das 72 h, a mistura foi agitada em vórtex e a determinação foi realizada por espectrofotometria a 645 nm e 663 nm, em triplicata, segundo cálculos propostos por Arnon (1949). O conteúdo de clorofila total foi expresso em miligramas por grama de massa fresca (mg gMF^{-1}) e foi utilizado para calcular a atividade da enzima malato desidrogenase dependente de NADP^+ (NADP-MDH).

3.3.8 Seleção de genes

Foram avaliados os perfis transcricionais dos genes codificadores das enzimas da via da prolina: Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase (*P5CS*), Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (*P5CR*), prolina desidrogenase (*ProDH*) e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (*P5CDH*), da enzima chave da válvula de malato - malato desidrogenase dependente de NADP^+ (*NADP-MDH*), malato desidrogenase dependente de NAD^+ (*NAD-MDH*) mitocondrial, oxidase alternativa (*AOX*) e o transgene *VaP5CSF129A*. A busca de sequências dos genes foi realizada no genoma do tabaco (*Nicotiana tabacum*) e do transgene no genoma da *Vigna aconitifolia* depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.3.9 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores dos genes *P5CR* e *P5CDH* foram cedidos por Lucélia Borgo, pós-doutoranda no CENA/USP, Piracicaba - SP. Para os genes *P5CS* e *ProDH* duas isoformas foram avaliadas. Para *P5CS1* e *P5CS2* foram utilizadas as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores publicadas por Dobrá *et al.* (2011). As sequências dos genes *ProDH1* e *ProDH2* foram alinhadas através do programa *Clustal W* (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) para identificar regiões não conservadas e desenhar iniciadores específicos para cada isoforma. Para os outros genes foram desenhados iniciadores para que amplificassem a cópia única de cada gene. Para o desenho foi utilizado o programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (UNTERGASSER *et al.*, 2007) com os parâmetros: iniciadores com temperatura de anelamento de 57 a 60°C, *amplicons* de 80 a 120 pares de bases, comprimento de 20 a 23 pares de bases e conteúdo GC de 40 a 80%. Todos os pares de iniciadores foram confrontados com sequências de *Nicotiana* spp. depositadas no *GenBank* para confirmar sua especificidade através do programa *PrimerBlast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Os iniciadores foram avaliados utilizando o *Multiple Primer Analyzer* (<https://www.thermofisher.com/multiple-primer-analyzer.html>) para verificar a formação de dímeros e *hairpins* (Tabela 1).

3.3.10 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

3.3.10.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído a partir de 100 mg de tecido foliar utilizando o reagente PureLink® Plant RNA Reagent (Invitrogen) conforme protocolo da empresa fabricante. As amostras foram tratadas com a enzima Turbo™ DNase (Ambion) para eliminar contaminação com DNA genômico, seguindo o protocolo do fabricante. A concentração do RNA total extraído foi mensurada por espectrofotometria a 260 nm, sua qualidade estimada na razão 260/280 nm e a integridade por eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v).

A síntese de cDNA foi realizada seguindo o protocolo do Kit SuperScript® IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction (Invitrogen) partindo de 2 µg de RNA total extraído das folhas. Este cDNA foi submetido a duas reações de PCR: uma com o gene de referência *β-actin* (JI *et al.*, 2018) para verificar se todas as amostras de cDNA amplificavam este gene, e outra com os iniciadores específicos de cada gene para verificar se estes amplificavam unicamente o fragmento esperado para cada gene. Para as reações de PCR seguiu-se o protocolo do Kit GoTaq® Green Master Mix (Promega) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 60°C por 30 s, extensão a 72°C por 45 s e extensão final a 72°C por 5 min. Para a segunda PCR, foi utilizado um *pool* de todas as amostras de cDNA. Ao final, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v).

3.3.10.2 RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas em placas, em triplicata, utilizando o reagente PowerUp SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) e analisadas pelo equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primeiramente foi analisada a eficiência de amplificação dos iniciadores, usando um *pool* das amostras de cDNA (diluído 1:5) das plantas transgênicas irrigadas e sem aplicação de prolina exógena, seguindo as seguintes condições: 95°C por 2 min, 95°C por 30 s e 60°C por 30 s, ciclo este repetido 40 vezes. Ao término da reação, a curva de *melting* foi determinada para cada par de iniciadores visando verificar a

presença de somente um pico gene-específico e ausência de dímeros, e a eficiência de amplificação foi calculada utilizando o programa *LinRegPCR* (RAMAKERS *et al.*, 2003).

Para a análise da expressão gênica, a amplificação foi conduzida seguindo as seguintes condições: 40 ciclos a 95°C por 2 min, 95°C por 30 s e 60°C por 30 s. Para os cálculos da quantificação relativa da expressão de cada gene foi utilizado o método $(1+E)^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Como normalizador foi utilizado o gene da *β -actin* (JI *et al.*, 2018) e como calibrador o genótipo selvagem, irrigado e sem aplicação de prolina. Para o transgene (*VaP5CSF129A*), o calibrador foi o genótipo transgênico, irrigado e sem aplicação de prolina.

Tabela 1 – Descrição dos genes e sequências dos iniciadores utilizados para o RT-qPCR.

Gene	Descrição	ESTs	Iniciador senso (S) e antiseno (AS) (5'-3')	Amplicon (pb)	Eficiência (%)
<i>P5CS1</i>	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase	SGN-U447290 ¹	S_CTGGAGGCTCGAGTGTAATG AS_TAGTTGTCCTGCCCTTGTCC	198	100
<i>P5CS2</i>	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase	SGN-U449141 ¹	S_GTGCAGAGGTTGGGATTAGC AS_TCACCGTCAACAATTTGTCC	111	99,5
<i>P5CR</i>	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase	XM_016610055.1 ^{2,3}	S_GGGAGCTTGCACTTGGACTA AS_CAGCCTTCTCCAACCTCGTGA	171	88,5
<i>ProDH1</i>	Prolina desidrogenase	AY639145.1 ²	S_TTGATCAGGCAAACCAAGTG AS_GAGGCTACGCACATAGCTTATT	97	90,5
<i>ProDH2</i>	Prolina desidrogenase	AY639146.1 ²	S_TTGATCAGGCAAACCATCTG AS_AGACCTAAAAATCGCATAGGG	84	90,0
<i>P5CDH</i>	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase	XM_016599940.1 ^{2,3}	S_CAACAGGGGCTCCACAGAAT AS_GGCACGGGACCAACATCATA	148	86,0
<i>NADP-MDH</i>	Malato desidrogenase dependente de NADP ⁺	XM_016588399.1 ²	S_CCAAAGAAGAAACCAGAGTGC AS_AGCAGCACCAGAGACAGAAA	111	85,0
<i>NAD-MDH</i>	Malato desidrogenase dependente de NAD ⁺	XM_016601332.1 ²	S_CTGAATGGGGTTCCAGATGT AS_TTCCTCCACACCATTTTTCC	108	97,5
<i>AOX</i>	Oxidase alternativa	S71335.1 ²	S_TATTGGGGTGTTTCAGCCTTC AS_GTACGTCTCCCATGGCCTAA	84	100
<i>VaP5CSF129A</i>	<i>P5CS</i> de <i>Vigna aconitifolia</i> mutado	M92276.1 ²	S_TGAGTCACGTCCTGATGCTC AS_AGCTTCTTTGCCACCTTTCA	88	97,5
<i>β-actin</i>	Gene normalizador	U60491.1 ⁴	S_TTAAAGAGAAACTGGCATATGTTG AS_GCCCATCTGGTAACTCATAGC	102	86,0

¹(DOBRA *et al.*, 2011); ²(GenBank ESTs); ³(Cedido por Lucélia Borgo); ⁴(JI *et al.*, 2018).

Fonte: Autor.

3.3.11 Atividades enzimáticas

Os ensaios de atividades enzimáticas foram realizados para as enzimas malato desidrogenase dependente de NADP⁺ (NADP-MDH) (EC 1.1.1.82) e prolina desidrogenase (ProDH) (EC 1.5.5.2).

Para a enzima NADP-MDH, 20 mg de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido e acrescentado 1 mL de tampão de extração gelado composto por 50 mM Na-acetato (pH 6,0), 1 mg mL⁻¹ BSA, 0,04 mM PMSF, 4 mM DTT e 0,1% (v/v) Triton X-100. A mistura foi agitada, centrifugada a 12000 x g, a 4°C por 10 min e o sobrenadante foi retirado para análise da atividade enzimática (OMOTO; TANIGUCHI; MIYAKE, 2012). A atividade da NADP-MDH foi determinada conforme a metodologia de Scheibe e Stitt (1988), com modificações, onde a mistura de reação (1 mL) continha 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 7,6), 0,2 mM NADPH, 1 mM DTT, 0,1 mg mL⁻¹ BSA e 50 µL de extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de 40 mM oxaloacetato na solução.

A atividade da enzima ProDH foi determinada de acordo com Lutts, Majerus e Kinet (1999), com modificações. Foram macerados em nitrogênio líquido 20 mg de tecido foliar e acrescentado 1 mL de tampão de extração gelado composto por 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 7 mM MgCl₂, 0,6 M KCl, 3 mM EDTA, 1 mM DTT e 5% (p/v) de PVP. O material foi agitado, centrifugado a 16000 x g, a 4°C durante 10 min e o sobrenadante utilizado para determinar a atividade enzimática. ProDH foi determinada utilizando uma solução de 1 mL contendo 0,15 M Na₂CO₃-HCl (pH 10,3) com 1 mM NAD⁺ e 15 mM L-prolina. A reação foi iniciada pela adição de 100 µL do extrato enzimático.

Em ambos os ensaios enzimáticos, acompanhou-se por espectrofotometria a 340 nm a variação da absorbância por 5 min após a adição do substrato. Foi utilizada a variação média da absorbância de duas réplicas experimentais de cada uma das repetições biológicas utilizando o mesmo extrato foliar. A atividade da enzima NADP-MDH foi baseada no conteúdo de clorofila total, determinado segundo metodologia de Arnon (1949) e expressa em micromol por minuto por miligrama de clorofila (µmol min⁻¹ mg Chl⁻¹). A atividade da ProDH foi calculada pelo conteúdo de proteínas solúveis totais, determinado de acordo com Bradford (1976) e expressa em micromol por minuto por miligrama de proteína (µmol min⁻¹ mg proteína).

3.3.12 Conteúdos de nucleotídeos de piridina

Os nucleotídeos de piridina foram determinados pelo método de ciclagem enzimática de acordo com a metodologia descrita por Tamoi *et al.* (2005). Para obtenção dos extratos foram macerados 100 mg de tecido foliar em nitrogênio líquido e adicionado 1 mL de tampão etanol-água (1:1, v/v) contendo 0,1 M HCl para quantificação de NADP^+ e NAD^+ e 0,1 M KOH para NADPH e NADH. As misturas foram centrifugadas a $20000 \times g$, a 4°C por 20 min e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para determinar os conteúdos de nucleotídeos de piridina.

O conteúdo de NADP^+ e NADPH foi determinado em meio de reação contendo 100 mM HEPES-KOH (pH 8,0), 0,5 mM EDTA, 0,42 mM MTT, 2,5 mM G6P, 1,66 mM PES e 100 μL de extrato em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada adicionando 0,7 unidades de G6PDH. Para a determinação de NAD^+ e NADH, o meio de reação foi o mesmo, exceto G6P que foi substituído por 100 μL de etanol 96%. A reação foi iniciada pela adição de 0,7 unidades de álcool desidrogenase.

Em ambas as análises, a absorbância foi monitorada por espectrofotometria a 570 nm por 5 min após a adição das enzimas. Foram realizadas em duas réplicas de cada uma das repetições biológicas utilizando o mesmo extrato foliar. As quantidades de NADP^+ , NADPH, NAD^+ e NADH foram calculadas a partir de curva padrão para cada solução padrão (0 a 300 pM) usando o mesmo meio de reação e foram expressas em nanomol por grama de matéria fresca (nmol gMF^{-1}). A partir do conteúdo de cada piridina foi calculado a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ e NAD^+/NADH .

3.3.13 Análise estatística

Os dados obtidos nas análises, exceto de RT-qPCR, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e, quando significativas, às médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Os dados de RT-qPCR foram submetidos ao teste *t* para comparação das médias entre os genótipos (selvagem e transgênico) dentro de cada regime hídrico ($*p < 0,05$). Para o transgene (*VaP5CSF129A*), os dados foram submetidos ao teste *t* para comparação das médias entre os regimes hídricos dentro de cada dose de prolina (0 e 10 mM) ($*p < 0,05$).

3.4 Resultados

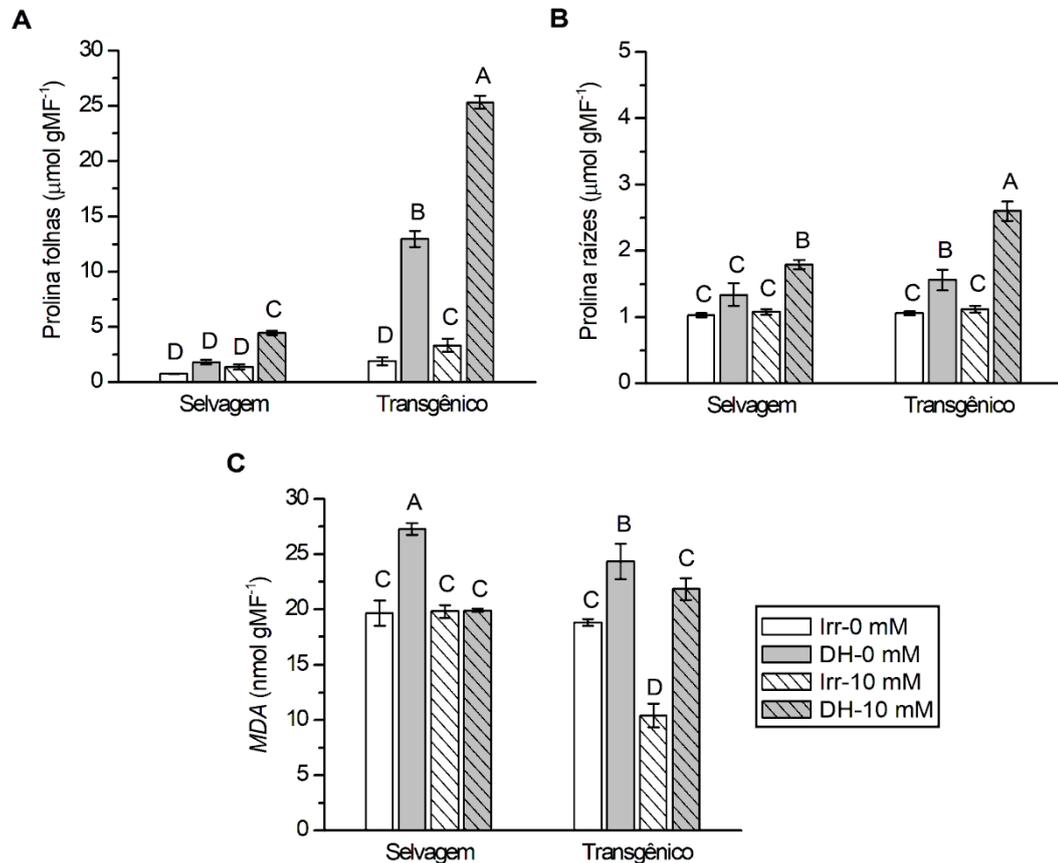
3.4.1 Avaliações bioquímicas

De maneira geral, as folhas das plantas do genótipo selvagem apresentaram maior conteúdo de prolina quando estas foram submetidas ao tratamento de deficiência hídrica com a aplicação de prolina exógena, valores estes similares ao observado nas plantas transgênicas que também receberam esta aplicação, mas sob irrigação. Nestas plantas com alto acúmulo endógeno de prolina, um aumento acentuado deste aminoácido foi verificado nos tratamentos de déficit hídrico, onde o incremento foi cerca de 10 vezes nas plantas sem aplicação de prolina exógena e mais de 20 vezes nas que receberam adição suplementar desse aminoácido (Figura 4A).

Nas raízes (Figura 4B), o conteúdo de prolina foi menor do que o verificado nas folhas em todos os tratamentos. As plantas transgênicas sob deficiência hídrica e suplementadas com prolina exógena apresentaram o maior conteúdo desse aminoácido, da mesma forma que observado nas folhas. Esse aumento, comparativamente às plantas irrigadas deste genótipo, também foi observado no tratamento de suspensão da irrigação e sem prolina exógena ($1,6 \mu\text{mol gMF}^{-1}$), valor semelhante ao verificado no genótipo selvagem sob déficit hídrico com a aplicação de prolina.

Os maiores conteúdos de malondialdeído (MDA) foram observados nas plantas selvagens e transgênicas sob déficit hídrico que não receberam aplicação de prolina, sendo que o genótipo não transformado exibiu valor superior. Não houve diferenças significativas no conteúdo de MDA em plantas do genótipo selvagem (aproximadamente 20 nmol gMF^{-1}) quando estas receberam prolina exógena em ambos regimes hídricos. É interessante notar que as plantas transgênicas com alto acúmulo endógeno de prolina apresentaram metade do conteúdo de MDA comparado ao genótipo selvagem quando mantidas sob irrigação e com adição de prolina, sendo que com a suspensão da irrigação estes valores atingiram o mesmo nível apresentado pelas plantas não transformadas (Figura 4C).

Figura 4 - Conteúdo de prolina nas folhas, nas raízes e conteúdo de malondialdeído (MDA) em dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) Conteúdo de prolina nas folhas ($\mu\text{mol gMF}^{-1}$), B) Conteúdo de prolina nas raízes ($\mu\text{mol gMF}^{-1}$), C) Conteúdo de malondialdeído (MDA) (nmol gMF^{-1}). Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$).

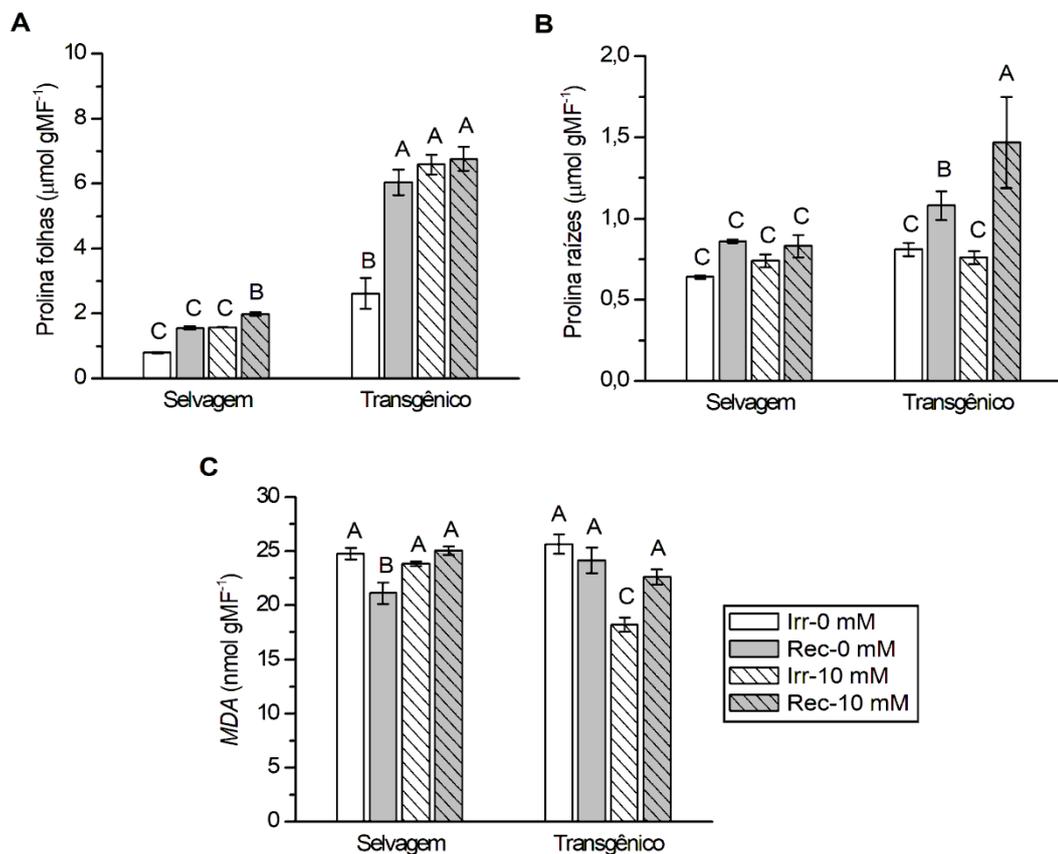
Fonte: Autor.

Após nove dias de suspensão da irrigação as plantas foram irrigadas novamente e, 48 h após a reidratação, foi observado um acréscimo acentuado no conteúdo de prolina nas folhas das plantas transgênicas que receberam aplicação exógena de prolina ($6,59 \mu\text{mol gMF}^{-1}$ em plantas sob condições normais de irrigação e $6,76 \mu\text{mol gMF}^{-1}$ em plantas reidratadas), valores similares ao observado nas plantas recuperadas que não receberam aplicação exógena de prolina ($6,04 \mu\text{mol gMF}^{-1}$) (Figura 5A). O genótipo selvagem somente apresentou aumento no conteúdo de prolina nas folhas após a recuperação do déficit hídrico no tratamento com a aplicação de prolina ($2 \mu\text{mol gMF}^{-1}$). Já nas raízes, enquanto que as plantas selvagens mostraram a mesma quantidade de prolina observada nas irrigadas, a

aplicação de prolina nas plantas transgênicas ocasionou um grande aumento na quantidade do aminoácido (de cerca de 90%) 48 h após a reidratação em comparação às plantas mantidas irrigadas (Figura 5B).

Após a reidratação, as plantas do genótipo selvagem que não tiveram aplicação de prolina reduziram o conteúdo de malondialdeído (MDA) nas folhas, enquanto que as plantas transgênicas mostraram concentrações de MDA equivalentes às plantas sob condições normais de irrigação. As plantas selvagens que receberam o tratamento com 10 mM de prolina exibiram conteúdo de MDA similar ao encontrado naquelas mantidas sempre irrigadas, enquanto que as transgênicas reidratadas com adição de prolina mostraram cerca de quase 28% a mais de MDA em relação àquelas sempre irrigadas (Figura 5C).

Figura 5 - Conteúdo de prolina nas folhas, nas raízes e conteúdo de malondialdeído (MDA) em dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



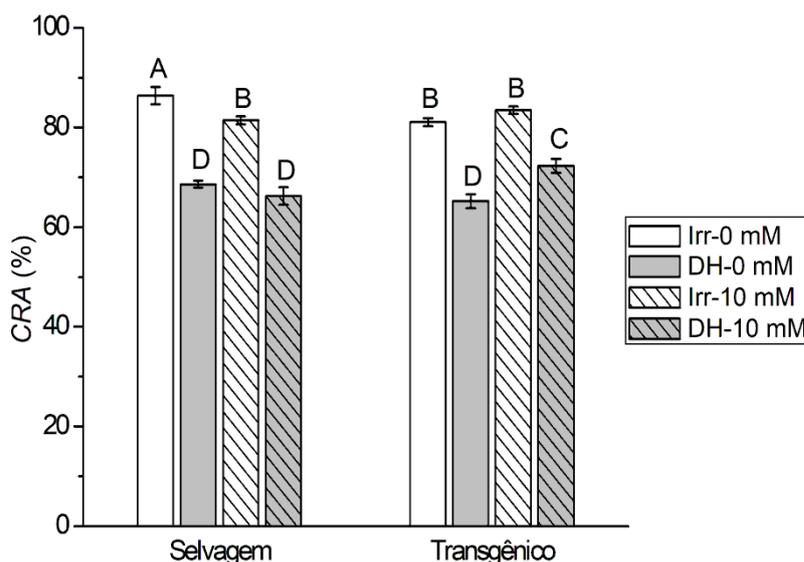
A) Conteúdo de prolina nas folhas ($\mu\text{mol gMF}^{-1}$), B) Conteúdo de prolina nas raízes ($\mu\text{mol gMF}^{-1}$), C) Conteúdo de malondialdeído (MDA) (nmol gMF^{-1}). Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$).

Fonte: Autor.

3.4.2 Avaliações fisiológicas

O conteúdo relativo de água (CRA) em plantas sob condições normais de irrigação sem aplicação exógena de prolina foi maior no genótipo selvagem (86,37%). Quando submetidos à deficiência hídrica, ambos os genótipos reduziram o CRA, exibindo valores similares no tratamento sem aplicação de prolina exógena (0 mM). Com a aplicação desse aminoácido (10 mM), as plantas selvagens irrigadas apresentaram menor CRA em relação às que não receberam prolina, exibindo valores semelhantes às plantas transgênicas irrigadas tanto com e sem a aplicação de prolina exógena. Porém, sob condições de deficiência hídrica, as plantas transgênicas mantiveram maior CRA (72,3%) que as selvagens (66,21%) (Figura 6).

Figura 6 - Conteúdo relativo de água (CRA) de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).

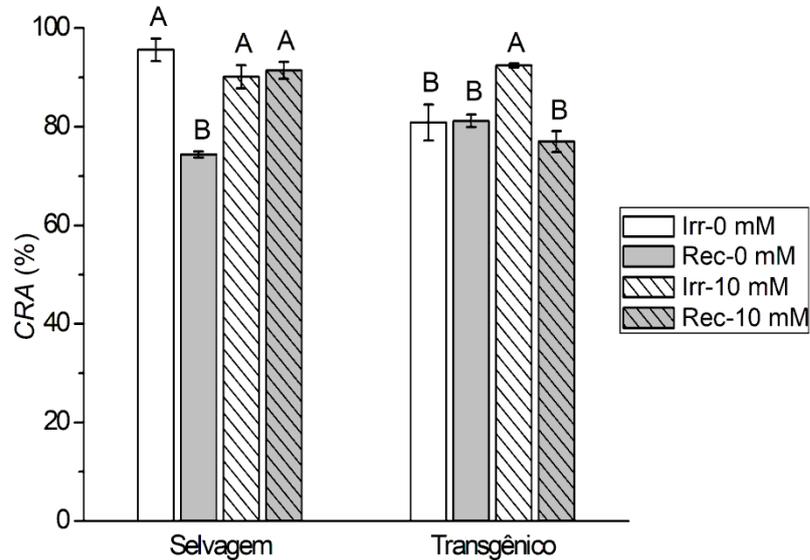


Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$). Valores expressos em porcentagem (%).

Fonte: Autor.

Após 48 h da reidratação, os valores de CRA no genótipo não transformado retornou ao nível das plantas que foram mantidas sob irrigação apenas no tratamento com a aplicação de prolina exógena, sendo que nas plantas transgênicas a suplementação com prolina somente proporcionou maior valor de CRA nas que se mantiveram irrigadas durante todo o período do experimento (Figura 7).

Figura 7 - Conteúdo relativo de água (CRA) de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$). Valores expressos em porcentagem (%).

Fonte: Autor.

As análises de trocas gasosas foliares mostraram que a deficiência hídrica reduziu a assimilação de CO_2 (A) de ambos os genótipos, sendo em menor proporção nas plantas transgênicas. Essas plantas com alto acúmulo endógeno de prolina exibiram maior atividade fotossintética em comparação ao genótipo selvagem quando não houve suplementação de prolina exógena, tanto em plantas irrigadas quanto sob déficit hídrico. A aplicação de prolina exógena aumentou a A nas plantas selvagens, principalmente em condições normais de suprimento de água e reduziu nas transgênicas. Entretanto, quando a irrigação foi suspensa, as plantas transgênicas mantiveram maior fotossíntese ($10,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) do que as selvagens ($5,4 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Figura 8A).

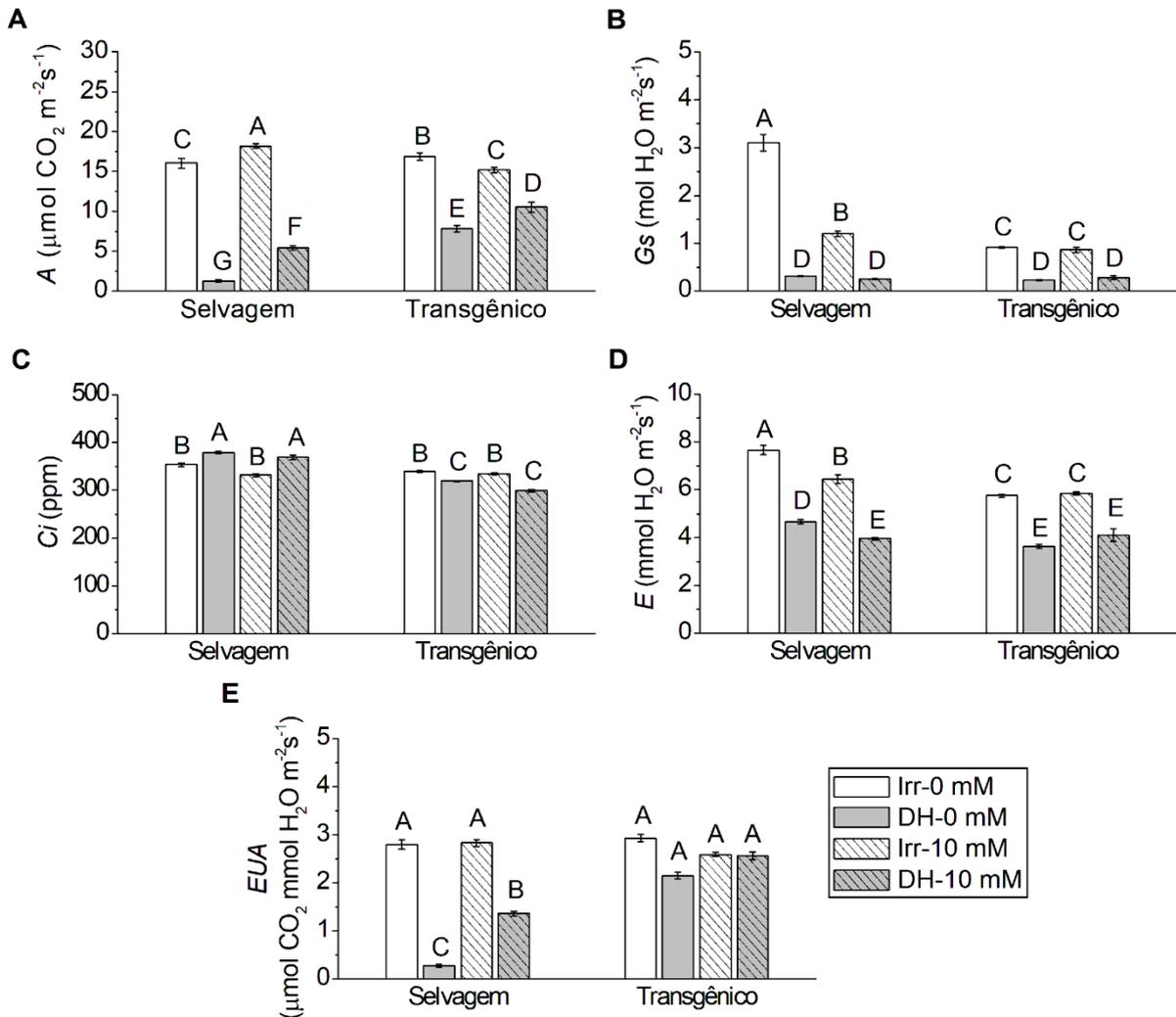
A suspensão da irrigação por nove dias também ocasionou queda na condutância estomática (Gs) dos genótipos estudados, não havendo diferença estatística entre os tratamentos com deficiência hídrica com e sem aplicação de prolina. No entanto, quando sob irrigação, as plantas selvagens exibiram maior Gs ($3,1 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) que as transgênicas ($0,91 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), sendo que ao receber a prolina exógena o genótipo selvagem reduziu mais de 60% sua Gs comparado com as plantas sem aplicação (Figura 8B).

O conteúdo intracelular de CO_2 (C_i) no genótipo selvagem aumentou nas plantas sob déficit hídrico em comparação com as irrigadas, tanto nos tratamentos com 0 mM e 10 mM de prolina, enquanto o contrário foi observado nas plantas do genótipo transgênico que tiveram uma leve redução do C_i na condição estressante (Figura 8C).

Os níveis de transpiração (E) foram menores em ambos os genótipos sob suspensão da irrigação com e sem aplicação de prolina exógena, sendo que as plantas transgênicas apresentaram menor E do que as selvagens mesmo quando irrigadas (Figura 8D).

A eficiência do uso da água (EUA) manteve-se similar em todos os tratamentos nas plantas transgênicas, assim como observado para as plantas selvagens irrigadas. Ao contrário, quando submetido à deficiência hídrica, o genótipo selvagem exibiu queda acentuada de 86% nesse parâmetro, sendo que mesmo as plantas que receberam prolina exógena reduziram pela metade a EUA em relação ao observado nas plantas irrigadas (Figura 8E).

Figura 8 - Trocas gasosas foliares de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) Assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), B) Condutância estomática (G_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), C) Conteúdo intracelular de CO_2 (C_i , ppm), D) Transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), E) Eficiência do uso da água (EUA, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$).

Fonte: Autor.

As plantas transgênicas apresentaram maior recuperação da atividade fotossintética em relação às selvagens, sendo que no tratamento sem aplicação de prolina exógena a assimilação de CO_2 (A) foi maior do que nas plantas irrigadas. Quando houve a aplicação de prolina, essas plantas recuperaram os valores observados no tratamento irrigado (Figura 9A).

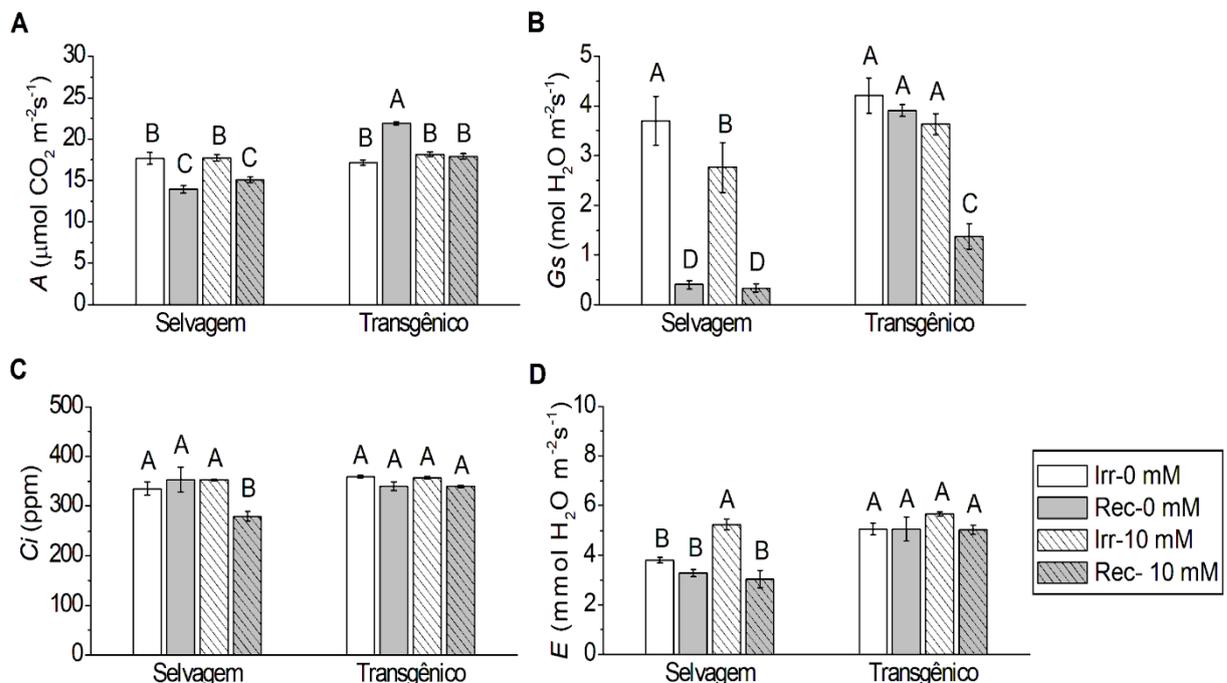
A condutância estomática (G_s) das plantas transgênicas reidratadas e sem aplicação de prolina foi próximo das plantas que permaneceram irrigadas durante

todo o experimento ($3,91 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A aplicação de prolina exógena proporcionou uma melhor recuperação das plantas transgênicas em comparação com as selvagens, sendo que o genótipo selvagem em ambos os tratamentos (0 e 10 mM de prolina) não recuperou a G_s ao nível das plantas irrigadas (Figura 9B).

O conteúdo intracelular de CO_2 (C_i) 48 h após a reidratação das plantas com alto acúmulo endógeno de prolina foi similar nos tratamentos com e sem aplicação de prolina exógena. Nas plantas selvagens, apenas as plantas reidratadas que receberam a adição de prolina exibiram valores mais baixos de C_i (Figura 9C).

Os níveis de transpiração (E) das plantas transgênicas reidratadas retornaram aos valores das plantas sob condições normais de irrigação com e sem prolina exógena, enquanto que nas plantas do genótipo selvagem os maiores valores deste parâmetro foram obtidos naquelas que foram mantidas irrigadas e receberam aplicação de prolina (Figura 9D).

Figura 9 - Trocas gasosas foliares de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) Assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), B) Condutância estomática (G_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), C) Conteúdo intracelular de CO_2 (C_i , ppm), D) Transpiração (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$).

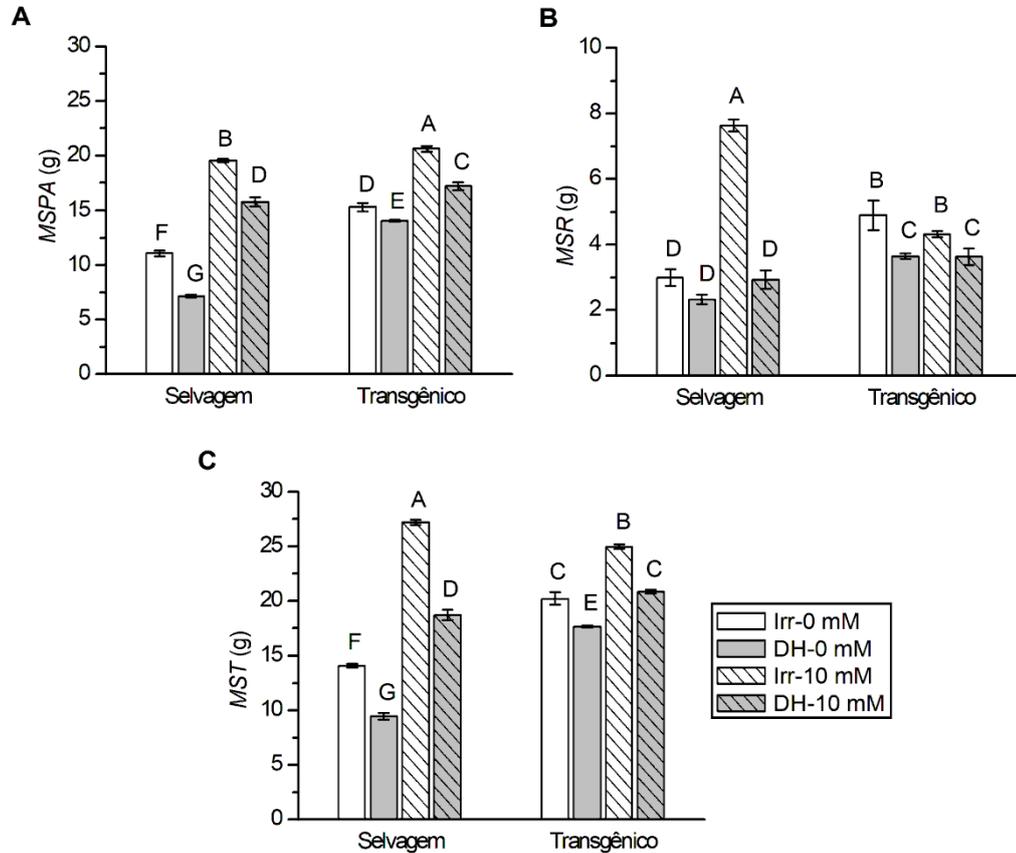
Fonte: Autor.

3.4.3 Biomassa

O déficit hídrico reduziu o acúmulo de biomassa em ambos os genótipos (Figura 10). Em condições normais de irrigação, as plantas transgênicas exibiram maior acúmulo de massa seca da parte aérea (MSPA) em comparação com as do genótipo selvagem, sendo que estas mostraram uma menor redução deste parâmetro quando submetidas à deficiência hídrica (Figura 10A). Já a massa seca de raiz (MSR) das plantas não transformadas sem aplicação de prolina exógena permaneceu como das irrigadas, diferente das do genótipo transgênico que mostraram uma diminuição de 25% na sua MSR. A aplicação de prolina exógena proporcionou alto acúmulo de MSR nas plantas selvagens sob condições normais de irrigação, porém sob déficit hídrico essas plantas mostraram uma maior queda nos valores de MSR do que as transgênicas (61% e 16%, respectivamente) (Figura 10B).

Em geral, sob condições normais de suprimento de água, o acúmulo de massa seca total (MST) foi maior nas plantas que receberam prolina. Ao final dos nove dias de suspensão da irrigação, esse acúmulo foi aproximadamente 31% menor nas plantas selvagens e 16% nas transgênicas em ambos os tratamentos (0 e 10 mM de prolina) (Figura 10C).

Figura 10 - Biomassa de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) Massa seca de parte aérea (MSPA), B) Massa seca de raiz (MSR), C) Massa seca total (MST). Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=4$). Valores expressos em gramas (g).

Fonte: Autor.

3.4.4 Análise da expressão gênica por RT-qPCR

Foram avaliadas duas isoformas do gene *P5CS*, as quais responderam de forma diferente nas folhas de tabaco conforme os tratamentos aplicados, sendo que de modo geral a isoforma *P5CS1* foi mais expressa que a *P5CS2* (Figuras 11A, 11B). *P5CS1* exibiu aumento na expressão em ambos os genótipos sob déficit hídrico, com um incremento ainda maior quando houve a adição de 10 mM de prolina exógena (36 vezes mais expresso nas plantas selvagens e 12 vezes nas transgênicas) (Figura 11A). *P5CS2* reduziu o número de transcritos no genótipo selvagem em condições de suspensão da irrigação sem aplicação de prolina, mas aumentou a sua expressão com a aplicação deste aminoácido, tanto em plantas

irrigadas como nas sob deficiência hídrica. O contrário foi observado no genótipo transgênico que mostrou um aumento da expressão desta isoforma sob déficit hídrico sem aplicação de prolina exógena e redução com a aplicação nas plantas em condição de deficiência hídrica (Figura 11B).

Não foi observado diferenças significativas entre os genótipos dentro de cada regime hídrico para a expressão do gene *P5CR*. Ao analisar a transcrição deste gene comparativamente ao tratamento calibrador (genótipo selvagem, irrigado e sem aplicação de prolina), o maior número de transcritos foi verificado quando os genótipos foram submetidos ao déficit hídrico sem suplementação de prolina exógena, sendo que ambos reduziram a expressão ao receberem a aplicação do aminoácido, com uma queda maior nas plantas transgênicas (Figura 11C).

O gene *P5CDH* exibiu maior expressão nos tratamentos de deficiência hídrica em ambos os genótipos, sendo detectado maior nível transcricional sem a aplicação de prolina e nas plantas selvagens (Figura 11D).

Também foram avaliadas duas isoformas do gene *ProDH* que responderam de forma similar, porém a isoforma *ProDH1* foi levemente mais expressa que a *ProDH2*. Pode-se observar que em ambos os genótipos houve supressão da expressão dessas isoformas quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico em comparação com o tratamento calibrador, sendo mais evidente nas plantas que receberam aplicação de prolina exógena (Figuras 11E, 11F).

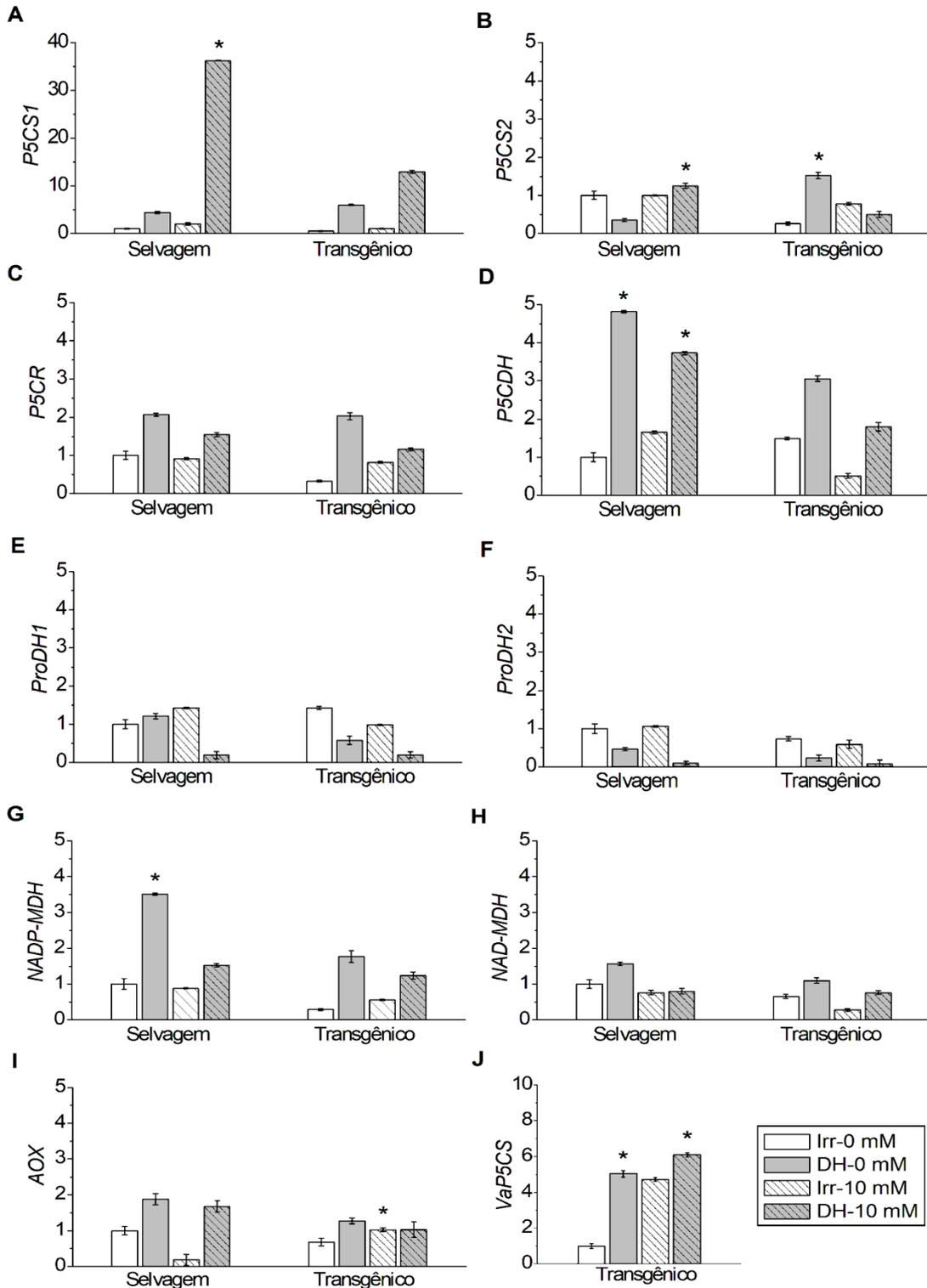
De modo geral, as plantas do genótipo selvagem apresentaram maior número de transcritos do gene *NADP-MDH* que as do transgênico. Os dois genótipos avaliados exibiram maior expressão sob déficit hídrico em comparação com o tratamento irrigado, sendo que este aumento foi menos notável nas plantas que receberam a suplementação de prolina exógena (Figura 11G). Não houve diferença estatística entre os dois genótipos dentro cada regime hídrico para o gene *NAD-MDH*. Em relação ao tratamento calibrador, o maior número de transcritos desse gene foi verificado no déficit hídrico sem aplicação de prolina em ambos os genótipos. A prolina exógena reduziu a expressão de *NAD-MDH* nas plantas selvagens, mantendo o número de transcritos baixo tanto no tratamento irrigado quanto na suspensão da irrigação. Já nas plantas transgênicas, essa redução foi maior nas plantas irrigadas (Figura 11H).

A aplicação exógena de prolina proporcionou uma queda significativa na expressão do gene *AOX* nas plantas selvagens irrigadas em relação às plantas

transgênicas. Essas plantas com alto acúmulo endógeno de prolina apresentaram expressão similar ao calibrador sob déficit hídrico com a aplicação desse aminoácido. No genótipo selvagem, houve incremento do número de transcritos de AOX na deficiência hídrica (0 e 10 mM) (Figura 11I).

O gene *VaP5CSF129A*, inserido nas plantas de tabaco para superprodução endógena de prolina, foi quatro vezes mais expresso nas plantas sob deficiência hídrica em comparação as plantas irrigadas. Valor semelhante foi observado nas plantas irrigadas com aplicação de prolina, sendo que quando estas foram submetidas ao déficit hídrico o número de transcritos desse gene ainda mostrou-se significativamente maior (Figura 11J).

Figura 11 - Expressão relativa de genes em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) *P5CS1*, B) *P5CS2*, C) *P5CR*, D) *P5CDH*, E) *ProDH1*, F) *ProDH2*, G) *NADP-MDH*, H) *NAD-MDH*, I) *AOX*, J) *VaP5CSF129A*. Valores apresentados como média através do método $(1+E)^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para os cálculos foi utilizado o gene normalizador β -actin (JI *et al.*, 2018) e como calibrador o genótipo selvagem, irrigado e sem aplicação de prolina. Para o transgene

(*VaP5CSF129A*), o calibrador foi o genótipo transgênico, irrigado e sem aplicação de prolina. Asteriscos indicam diferença significativa entre os genótipos (selvagem e transgênico) dentro de cada regime hídrico (irrigado e deficiência hídrica) pelo teste *t* (* $p < 0,05$). Para o transgene (*VaP5CSF129A*), os asteriscos indicam diferença significativa entre os regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) dentro de cada dose de prolina (0 e 10 mM). Barra de erros indica o desvio padrão da média ($n=3$).

Fonte: Autor.

De modo geral, maiores diferenças na expressão dos genes estudados neste trabalho foram observadas 48 h após a reidratação das plantas (recuperação). As duas isoformas do gene *P5CS* (*P5CS1* e *P5CS2*) foram mais expressas nas plantas transgênicas (Figuras 12A, 12B). Ambos os genótipos exibiram aumento na expressão de *P5CS1* após a reidratação, sendo que nas plantas transgênicas este gene foi 28 e 15 vezes mais expresso sem e com a aplicação de prolina exógena, respectivamente (Figura 12A). O número de transcritos do gene *P5CS2* também foi maior após a reidratação das plantas que não sofreram aplicação de prolina nos dois genótipos estudados, sendo significativamente maior no genótipo transgênico. Com a aplicação de prolina, as plantas transgênicas reidratadas mantiveram o mesmo nível de expressão observado nas irrigadas, enquanto que as plantas selvagens reduziram a expressão (Figura 12B).

O maior nível transcricional do gene *P5CR* foi observado nas plantas recuperadas do genótipo transgênico que não receberam prolina exógena. A expressão desse gene também foi significativamente maior nas plantas transgênicas em relação às plantas selvagens quando permaneceram irrigadas durante todo o experimento sem prolina exógena e após a reidratação com aplicação desse aminoácido (Figura 12C).

Quando não houve aplicação de prolina, ambos os genótipos aumentaram a expressão de mRNA do gene *P5CDH* após a recuperação do déficit hídrico, sendo que o transgênico apresentou maior expressão. Esse gene também foi mais expresso nas plantas transgênicas com alto acúmulo endógeno de prolina com adição desse aminoácido 48 h após a reidratação em relação às plantas selvagens (Figura 12D).

Em relação ao gene *ProDH*, a isoforma *ProDH1* teve sua expressão aumentada nas plantas selvagens reidratadas nas quais a prolina não foi aplicada. Estas plantas mantiveram essa expressão nas plantas irrigadas que receberam aplicação de prolina, sendo que o número de transcritos foi reduzido 48 h após a reidratação. O contrário ocorreu no genótipo transgênico, onde a isoforma *ProDH1*

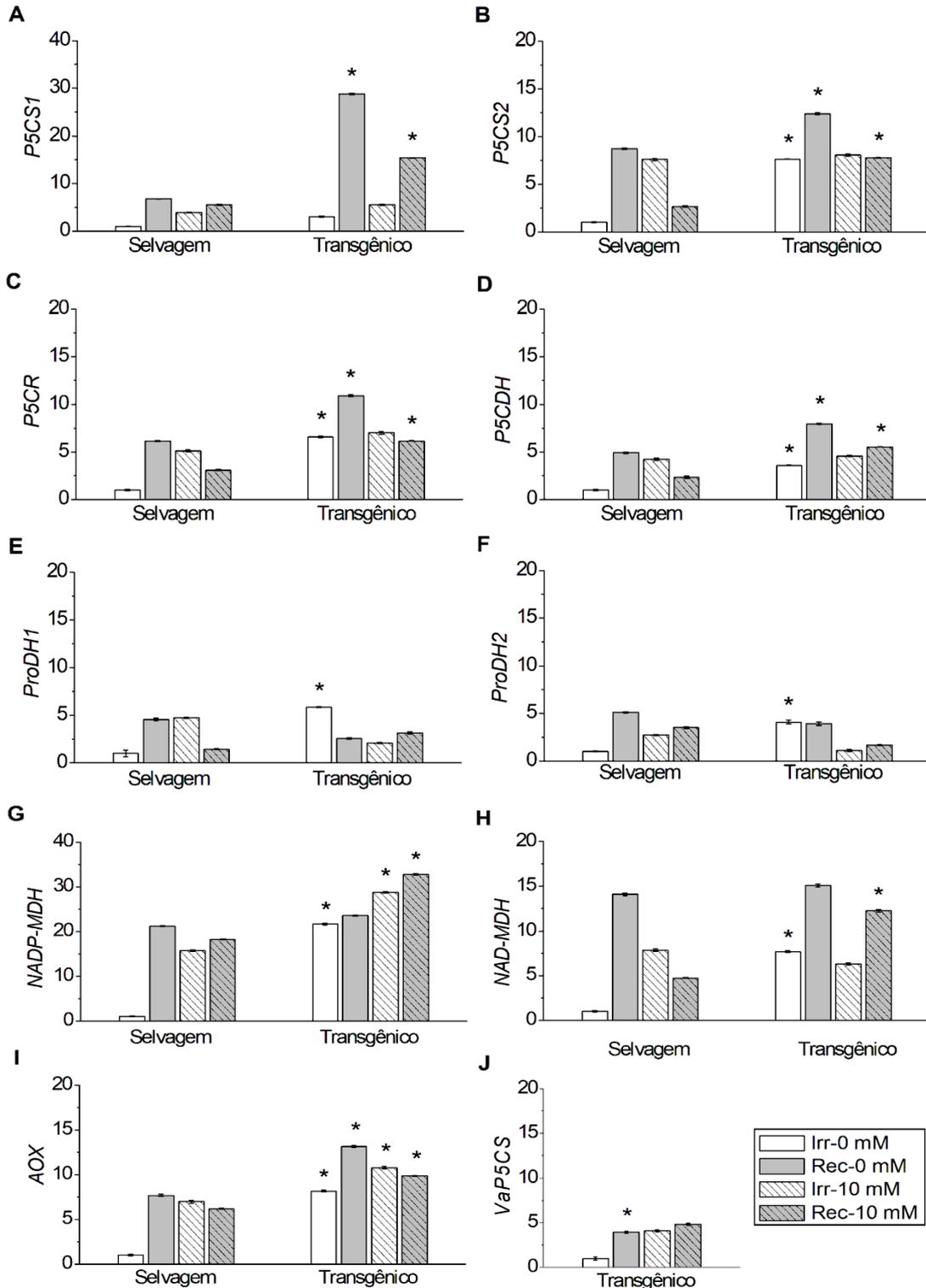
foi mais expressa nas plantas em condições normais de irrigação sem prolina exógena. Esse número de transcritos foi reduzido após a recuperação no tratamento sem a aplicação de prolina, mantendo nível de expressão similar quando a prolina exógena foi usada, tanto nas plantas irrigadas quanto nas recuperadas (Figura 12E). Nas plantas selvagens, a isoforma *ProDH2* apresentou um aumento da expressão de mRNA em ambos os tratamentos de recuperação (0 e 10 mM de prolina) comparados às plantas irrigadas. Já as plantas transgênicas reidratadas que não receberam aplicação de prolina mantiveram um padrão de expressão similar ao das plantas irrigadas, porém essa expressão foi menor nas que receberam prolina exógena (Figuras 12F).

O gene *NADP-MDH* foi altamente expresso em ambos os genótipos após a reidratação das plantas. Em ambos os tratamentos (0 e 10 mM de prolina) as plantas mostraram um aumento da expressão de mRNA quando comparadas com as plantas mantidas irrigadas, sendo que as plantas transgênicas apresentaram maior expressão que as selvagens, exceto na reidratação das plantas que não receberam aplicação de prolina (Figura 12G). O maior número de transcritos do gene *NAD-MDH* foi verificado nas plantas recuperadas sem a aplicação exógena de prolina. Ao receberem este aminoácido, as plantas transgênicas exibiram maior número de transcritos que as selvagens 48 h após a reidratação (Figura 12H).

As plantas transgênicas com alto acúmulo endógeno de prolina exibiram maior expressão do gene *AOX* em todos os tratamentos avaliados. Ambos os genótipos aumentaram a expressão 48 h após a reidratação quando não houve suplementação com prolina, sendo que com a aplicação (10 mM) apresentaram uma leve diminuição em comparação com as plantas irrigadas. Em relação às plantas que permaneceram irrigadas durante todo o experimento, a aplicação de prolina exógena ocasionou um aumento da expressão deste gene em comparação com as plantas que não receberam este tratamento (Figura 12I).

O número de transcritos do transgene (*VaP5CSF129A*) aumentou cerca de 5 vezes nas plantas recuperadas em comparação com as plantas mantidas sob irrigação quando não houve aplicação de prolina exógena. Essa expressão foi similar nas plantas irrigadas e reidratadas quando a suplementação desse aminoácido foi usada (Figura 12J).

Figura 12 - Expressão relativa de genes em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) *P5CS1*, B) *P5CS2*, C) *P5CR*, D) *P5CDH*, E) *ProDH1*, F) *ProDH2*, G) *NADP-MDH*, H) *NAD-MDH*, I) *AOX*, J) *VaP5CSF129A*. Valores apresentados como média através do método $(1+E)^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para os cálculos foi utilizado o gene normalizador β -actin (JI *et al.*, 2018) e como calibrador o genótipo selvagem, irrigado e sem aplicação de prolina. Para o transgene

(*VaP5CSF129A*), o calibrador foi o genótipo transgênico, irrigado e sem aplicação de prolina. Asteriscos indicam diferença significativa entre os genótipos (selvagem e transgênico) dentro de cada regime hídrico (irrigado e recuperação) pelo teste *t* (**p*<0,05). Para o transgene (*VaP5CSF129A*), os asteriscos indicam diferença significativa entre os regimes hídricos (irrigado e recuperação) dentro de cada dose de prolina (0 e 10 mM). Barra de erros indica o desvio padrão da média (n=3).

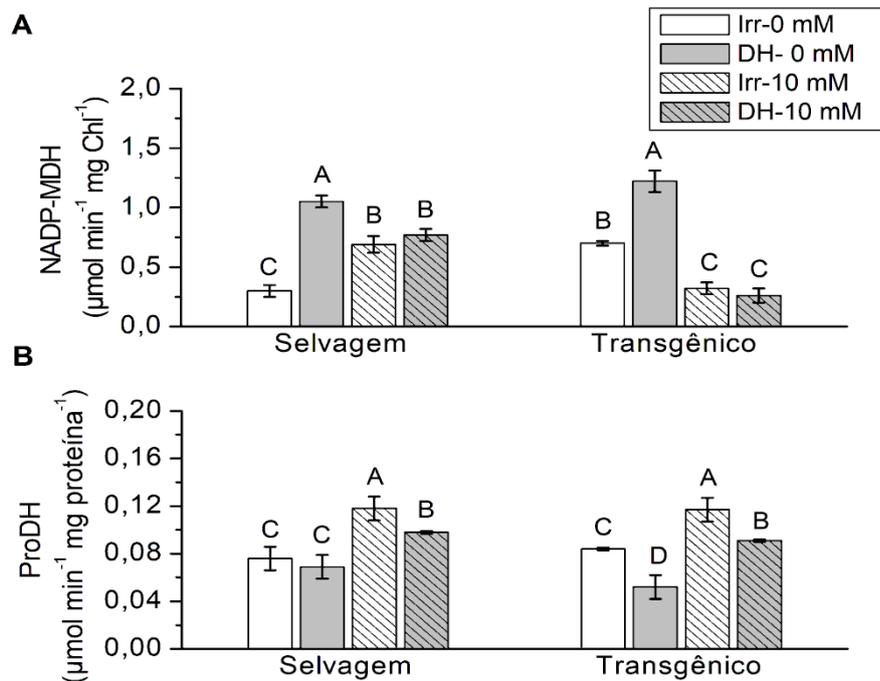
Fonte: Autor.

3.4.5 Atividades enzimáticas

Foram analisadas as atividades das enzimas malato desidrogenase dependente de NADP⁺ (NADP-MDH) e prolina desidrogenase (ProDH) (Figura 13). A atividade da enzima NADP-MDH aumentou em ambos os genótipos com a imposição da deficiência hídrica no tratamento sem aplicação de prolina exógena. Essa atividade foi 4 vezes maior nas plantas selvagens e cerca de 2 vezes maior nas plantas transgênicas em relação às que permaneceram em condições normais de irrigação. Entretanto, a suplementação com prolina exógena reduziu a atividade dessa enzima sob déficit hídrico nos dois genótipos estudados, sendo que nas plantas transgênicas com alto acúmulo de prolina endógena a atividade observada foi ainda menor (Figura 13A).

A aplicação de prolina exógena aumentou a atividade da ProDH em ambos os genótipos, principalmente nas plantas irrigadas, que mostraram os maiores valores da atividade dessa enzima (0,12 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$). A deficiência hídrica ocasionou uma queda na atividade da ProDH (cerca de 25%) nas plantas selvagens e transgênicas, sendo que não houve diferença entre os genótipos quando a prolina foi aplicada (Figura 13B).

Figura 13 - Atividade das enzimas NADP-MDH e ProDH em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) NADP-MDH ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$), B) ProDH ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$). Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$).

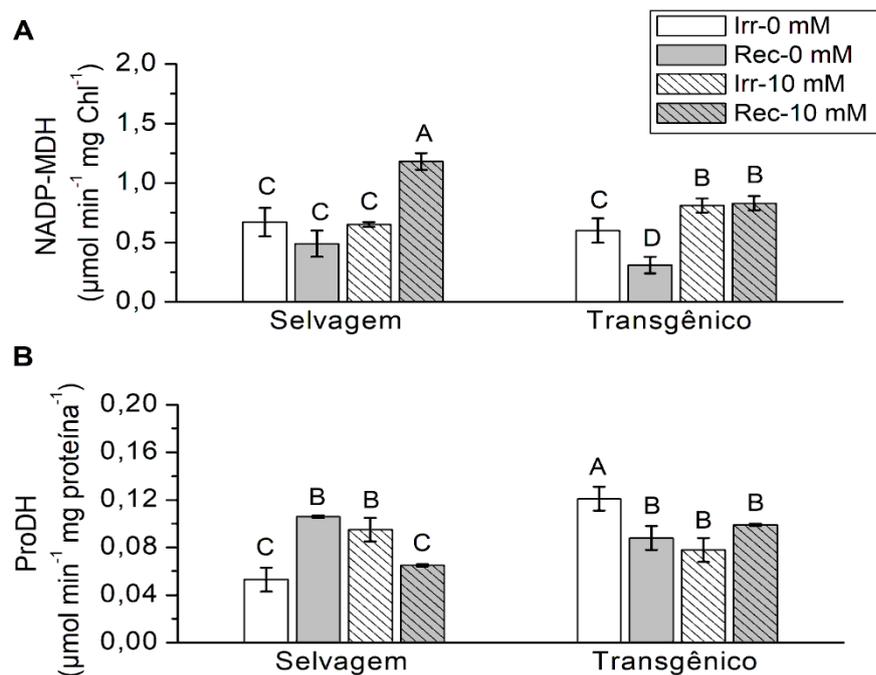
Fonte: Autor.

Ao avaliar a atividade dessas enzimas 48 h após a reidratação, verificou-se menor atividade da NADP-MDH em plantas que não receberam aplicação de prolina exógena em ambos os genótipos estudados, sendo menor nas plantas selvagens. Essas plantas quando suplementadas com prolina exógena exibiram maior atividade dessa enzima após a recuperação ($1,18 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$), sendo que os outros tratamentos neste genótipo não diferiram estatisticamente entre si. Nas plantas transgênicas, não houve diferença significativa entre os dois tratamentos (mantido irrigado e recuperado) com o uso da prolina exógena. Essas plantas reidratadas mantiveram a mesma atividade observada nas plantas irrigadas ($0,8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$) (Figura 14A).

A atividade da enzima ProDH 48 h após a reidratação aumentou nas plantas selvagens que não receberam aplicação de prolina exógena. Essa atividade também foi observada nas plantas transgênicas nos tratamentos com 0 e 10 mM de prolina ($0,1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$, aproximadamente), sendo que neste genótipo as plantas mantidas irrigadas durante todo o experimento exibiram maior atividade

dentre todos os tratamentos avaliados quando não foram tratadas com prolina exógena. Após a recuperação, entretanto, as plantas transgênicas que receberam aplicação de prolina tiveram maior atividade da ProDH em comparação com as plantas selvagens (Figura 14B).

Figura 14 - Atividade das enzimas NADP-MDH e ProDH em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) NADP-MDH ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Chl}^{-1}$), B) ProDH ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$). Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$).

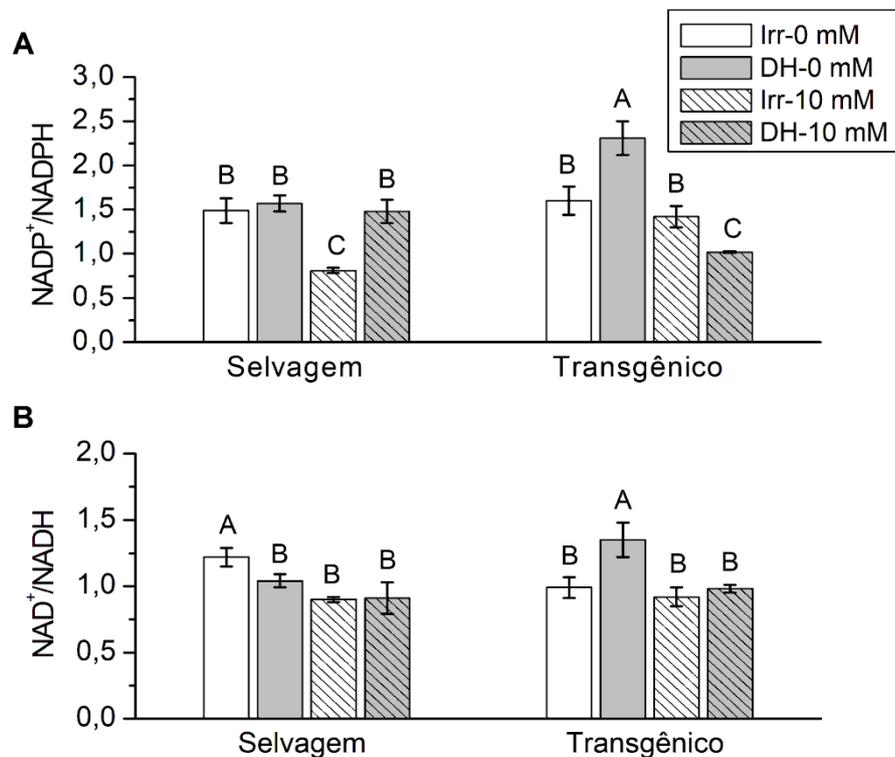
Fonte: Autor.

3.4.6 Nucleotídeos de piridina

Nas plantas selvagens, a aplicação de prolina exógena reduziu a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ quando estas se encontravam em condições normais de suprimento de água, sendo que em condições de déficit hídrico o uso desse aminoácido não apresentou efeito. No genótipo transgênico, a deficiência hídrica aumentou a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ em plantas que não receberam prolina exógena, sendo que a suplementação com esse aminoácido nas plantas transgênicas sob déficit hídrico diminuiu de modo notável esta razão (Figura 15A).

A razão NAD^+/NADH foi reduzida nas plantas selvagens sob deficiência hídrica, não mostrando diferença significativa entre os tratamentos com e sem prolina exógena. Já nas plantas transgênicas, a suspensão da irrigação por nove dias aumentou essa razão, sendo que a razão NAD^+/NADH foi menor e de similar valor com a suplementação da prolina exógena tanto nas plantas irrigadas como nas sob déficit hídrico (Figura 15B).

Figura 15 - Nucleotídeos de piridina em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) Razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, B) Razão NAD^+/NADH . Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$). Valores expressos em nmol gMF^{-1} .

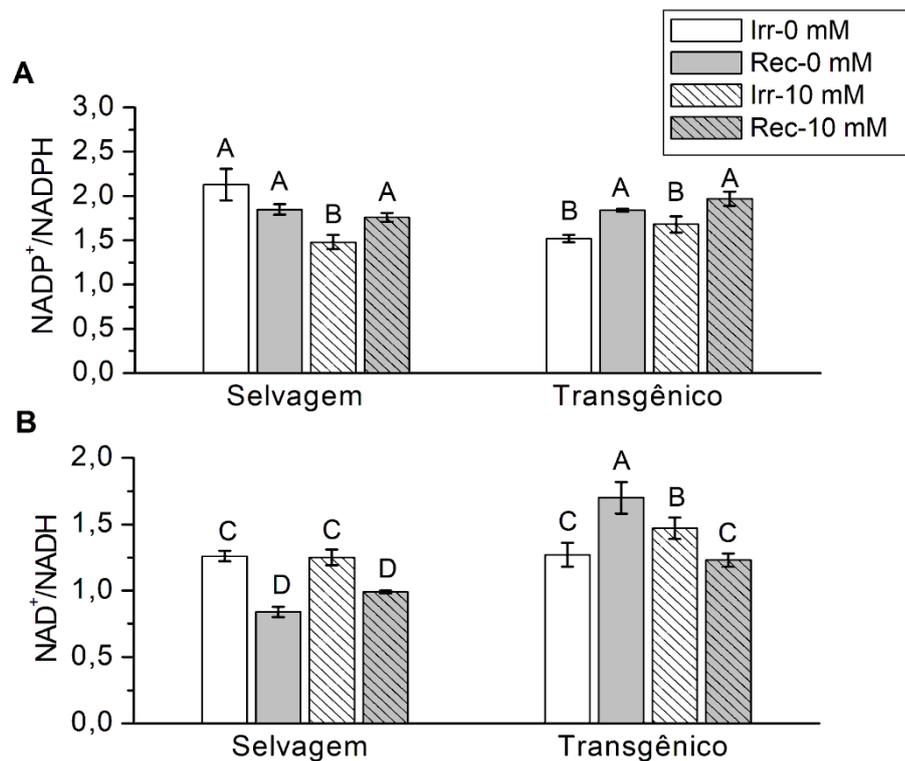
Fonte: Autor.

Após 48 h da reidratação, a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ foi reduzida no genótipo selvagem com a suplementação de prolina exógena nas plantas mantidas irrigadas, tendo apresentado valor significativamente menor do que em todos os outros tratamentos avaliados. Já nas plantas transgênicas, foi observado um aumento nessa razão 48 h após a reidratação, sendo que não houve diferença significativa entre os tratamentos de prolina (0 e 10 mM) tanto em plantas mantidas irrigadas

como nas recuperadas. Dessa forma, não se verificou efeito da adição de prolina nesse genótipo neste parâmetro (Figura 16A).

A razão NAD^+/NADH foi reduzida após a recuperação das plantas selvagens, independentemente da aplicação de prolina exógena. Essa redução também foi observada nas plantas transgênicas que receberam prolina exógena; entretanto, a razão NAD^+/NADH nessas plantas foi significativamente maior do que nas plantas selvagens reidratadas neste mesmo tratamento (10 mM de prolina). O maior valor de NAD^+/NADH após 48 h da reidratação foi detectado nas plantas plantas transgênicas que não receberam prolina exógena (Figura 16B).

Figura 16 - Nucleotídeos de piridina em folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) 48 h após a reidratação (irrigado e recuperação) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) Razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, B) Razão NAD^+/NADH . Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$). Valores expressos em nmol gMF^{-1} .

Fonte: Autor.

3.5 Discussão

O acúmulo de prolina é uma resposta metabólica de plantas sob condições ambientais estressantes, como a deficiência hídrica. Esse aminoácido atua como um osmoprotetor a fim de mitigar os danos causados pelo estresse, contribuindo para o ajuste osmótico, estabilização de estruturas celulares, membranas, proteínas, eliminação de radicais livres e balanço redox (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

Nossos resultados mostraram aumento no conteúdo de prolina em folhas e raízes de tabaco após a suspensão da irrigação por nove dias, sendo este aumento maior nas plantas transgênicas e quando os genótipos receberam aplicação desse aminoácido (Figuras 4A, 4B). Como resposta das plantas para lidar com o estresse, um processo de ativação de genes é iniciado após a percepção celular desse sinal biológico do ambiente. Esses genes podem codificar proteínas com funções enzimáticas, estruturais ou regulatórias. Dentro desse processo de ativação, estão os genes que codificam enzimas chave da biossíntese de solutos orgânicos que atuam como osmoprotetores, como a prolina (PER *et al.*, 2017; SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Esse incremento nos níveis de prolina nas plantas sob déficit hídrico pode ser explicado pelo aumento na expressão dos genes que codificam as enzimas da biossíntese desse aminoácido, *P5CS1* e *P5CR* (Figuras 11A, 11C), e também pela supressão do gene que codifica a enzima responsável pelo catabolismo da prolina (*ProDH*) na deficiência hídrica, principalmente da isoforma *ProDH2* (Figuras 11E, 11F). Além disso, o maior acúmulo de prolina no genótipo transgênico também é ocasionado pelo aumento da expressão do transgene (*VaP5CSF129A*) (Figura 11J) e, quando não houve aplicação de prolina exógena, pela menor atividade da *ProDH* (Figura 13B). Assim como mostrado neste trabalho, plantas de tabaco transgênicas com superexpressão do gene *P5CS* exibiram incremento no conteúdo de prolina quando submetidas à deficiência hídrica (ZHANG *et al.*, 2014). Também, plantas transgênicas de citrumelo 'Swingle' com alta produção endógena de prolina acumularam elevados níveis desse aminoácido nas folhas sob déficit hídrico (CAMPOS *et al.*, 2011). Os autores sugeriram que as plantas transgênicas foram capazes de lidar com o déficit hídrico melhor do que as plantas não transformadas, já que o alto nível de prolina endógena atuou no ajuste osmótico, na manutenção da atividade fotossintética e para melhorar os efeitos deletérios do estresse oxidativo induzido pela seca (CAMPOS *et al.*, 2011).

A aplicação de prolina exógena também proporcionou aumento no conteúdo desse aminoácido nos genótipos estudados (Figuras 4A, 4B). Em *Arabidopsis thaliana*, o déficit hídrico induziu o acúmulo de prolina nas folhas, sendo que a aplicação de 10 mM de prolina aumentou em 3,3 vezes o conteúdo desse aminoácido com o mesmo nível de deficiência hídrica (MOUSTAKAS *et al.*, 2011). A pulverização foliar com 6 mM de prolina em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) submetido à deficiência hídrica também elevou os níveis endógenos de prolina nessas plantas (MERWAD; DESOKY; RADY, 2018).

Neste trabalho, como esperado, o conteúdo de prolina nas raízes foi menor do que o verificado nas folhas (Figuras 4A, 4B). O acúmulo de prolina é mais significativo nos tecidos fotossintéticos do que nas raízes, pois a nível celular, sugere-se que o acúmulo de prolina seja maior no cloroplasto, seguido pelo citoplasma (SIGNORELLI *et al.*, 2013). Dessa forma, as plantas modularam sua composição bioquímica e fisiológica a fim de adaptar-se às condições ambientais a que foram submetidas, sendo que o aumento potencial de prolina possibilita minimizar a toxicidade induzida pelo estresse e manter a homeostase e o funcionamento ideal do metabolismo vegetal (KHATRI; RATHORE, 2019).

Ao final dos nove dias de suspensão da irrigação as plantas foram reidratadas. Após 48 h desta reidratação, as plantas selvagens apresentaram aumento no conteúdo de prolina nas folhas somente no tratamento com a aplicação de prolina (Figura 5A). Ao contrário, as plantas transgênicas exibiram altos níveis desse aminoácido nas folhas quando receberam prolina exógena, tanto nas plantas mantidas irrigadas quanto nas recuperadas, e mesmo nas reidratadas que não foram suplementadas com esse aminoácido (Figura 5A). Esse maior acúmulo de prolina na recuperação das plantas transgênicas pode ser explicado pelo aumento na expressão dos genes responsáveis pela síntese de prolina, *P5CS1*, *P5CS2* e *P5CR*, que foi significativamente maior que nas plantas selvagens (Figuras 12A, 12B, 12C), do transgene (*VaP5CSF129A*) (Figura 12J) e redução na expressão e atividade de ProDH (Figuras 12E, 12F, 14B). O nível de prolina observado após um período de déficit hídrico pode depender da severidade do estresse sofrido pelas plantas. Elevadas concentrações de prolina foram observadas durante a recuperação do estresse por seca severa em tabaco (*Nicotiana tabacum*) (VANKOVÁ; DOBRÁ; STORCHOVÁ, 2012). Mesmo durante a recuperação de uma seca leve, a concentração de prolina aumentou continuamente em *Periploca sepium*,

sendo este aumento ainda mais evidente durante a recuperação de uma seca severa (AN *et al.*, 2013). Esses autores afirmam que as respostas do metabolismo de prolina à seca e à re-irrigação estão estritamente associadas à severidade da deficiência hídrica, sendo que o alto acúmulo desse aminoácido no estágio inicial de reidratação deve ser um mecanismo importante para a recuperação rápida das plantas (AN *et al.*, 2013).

O conteúdo de prolina nas raízes também aumentou após a reidratação das plantas transgênicas, sendo ainda maior quando houve aplicação de prolina exógena, apesar de ser consideravelmente menor do que o observado nas folhas (Figura 5A, Figura 5B). Quando as plantas são irrigadas novamente após um período de deficiência hídrica, o funcionamento das folhas, que são os principais órgãos de fotossíntese e transpiração, é necessário para a recuperação das plantas. Para isto, é importante aumentar a alocação de carbono e nutrientes para esses órgãos. É sugerido então, que o transporte de prolina das raízes para as folhas durante a reidratação aumente os níveis desse aminoácido nas folhas, atuando como fonte de energia, carbono e nitrogênio para aumentar a taxa de recrescimento (AN *et al.*, 2013). Dessa forma, como esperado, as plantas transgênicas apresentaram alto acúmulo endógeno de prolina, o que deve ter contribuído para maiores quantidades desse aminoácido na recuperação destas do que nas plantas selvagens. Além disso, o menor conteúdo desse aminoácido nas plantas selvagens após a reidratação pode ser resultado da sua degradação. É conhecido que o catabolismo da prolina gera grande quantidade de energia em forma de ATP (ATKINSON, 1977), que pode ser utilizado para retomada do crescimento dessas plantas.

A deficiência hídrica pode ocasionar oxidação das membranas celulares gerando o malondialdeído (MDA), que é um produto da peroxidação lipídica, utilizado como indicador de estresse oxidativo (MOUSTAKAS *et al.*, 2011). O déficit hídrico aumentou o conteúdo de MDA nos genótipos sem aplicação de prolina, sendo maior nas plantas selvagens (Figura 4C). O maior conteúdo de prolina nas plantas transgênicas contribuiu para um menor acúmulo de MDA, já que este aminoácido atua na estabilização das estruturas celulares, como as membranas. Inversamente, plantas selvagens que acumularam menos prolina endógena apresentaram níveis mais altos de MDA, o que foi também observado por Guan *et al.* (2018) em plantas de *Panicum virgatum* transformadas com o gene *P5CS* de

Puccinellia chinampoensis (PuP5CS). Também, plantas não transformadas de citrumelo 'Swingle' apresentaram maior conteúdo de MDA que as plantas transgênicas com superexpressão do gene *P5CS* sob estresse hídrico severo (CAMPOS *et al.*, 2011). O aumento de MDA pode acontecer devido ao aumento da geração de EROS que reagem com DNA, lipídeos e proteínas, prejudicando as funções celulares normais (FAROOQ *et al.*, 2017).

No genótipo selvagem foi verificado que, com a aplicação de prolina exógena, o conteúdo de MDA das plantas sob déficit hídrico foi semelhante ao observado nas plantas irrigadas (Figura 4C), evidenciando a proteção proporcionada pelo uso da prolina exógena na integridade das membranas celulares. A manutenção de níveis semelhantes de MDA em plantas irrigadas e estressadas demonstra a eficiência dos mecanismos de defesa das plantas contra danos oxidativos (CVIKROVÁ *et al.*, 2013). Já no genótipo transgênico, a pulverização foliar com prolina diminuiu o conteúdo de MDA mesmo nas plantas mantidas sob irrigação (Figura 4C). Esse resultado indica que a aplicação exógena, juntamente com a alta produção endógena desse aminoácido, diminuiu os processos de geração de EROS que normalmente ocorrem nas plantas e indicados pelo nível de MDA. Quando as plantas foram submetidas à deficiência hídrica, o conteúdo de MDA aumentou e manteve o mesmo nível das plantas irrigadas sem prolina exógena (Figura 4C), indicando que a aplicação suplementar de prolina nestas plantas transgênicas não ajudou a diminuir ainda mais os efeitos do estresse na oxidação de membranas. Isso também pode ser observado 48 h após a reidratação das plantas, onde o conteúdo de MDA nas plantas transgênicas recuperadas que receberam prolina foi semelhante ao obtido naquelas sem a adição desse aminoácido (Figura 5C).

Quando os dois genótipos de tabaco foram submetidos à deficiência hídrica houve redução do conteúdo relativo de água (CRA) (Figura 6). O declínio no CRA devido ao déficit hídrico pode ser explicado pela diminuição da capacidade de ajuste osmótico devido à absorção reduzida de nutrientes, especialmente o potássio (MERWAD; DESOKY; RADY, 2018). Entretanto, com aplicação de prolina exógena, as plantas transgênicas apresentaram maior CRA em comparação com as selvagens quando sob deficiência hídrica (Figura 6). Em *Arabidopsis thaliana*, o CRA diminuiu significativamente sob déficit hídrico, porém em menor proporção quando as plantas receberam aplicação foliar de 10 mM de prolina (MOUSTAKAS *et al.*,

2011). Em manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), plantas que sofreram aplicação de prolina exógena apresentaram menor redução do CRA em condições de deficiência hídrica quando comparadas àquelas que não receberam aplicação do aminoácido, indicando a manutenção do balanço hídrico em resposta ao estresse osmótico induzido pela seca (AGAMI *et al.*, 2016). Neste trabalho, quando as plantas transgênicas foram suplementadas com prolina houve um acréscimo ainda maior dos níveis endógenos desse aminoácido em comparação com o observado nas plantas selvagens (Figura 4A, 4B). Isto sugere que este maior acúmulo de prolina proporcionou um melhor ajustamento osmótico pela diminuição do potencial de água nas células para um nível inferior ao do solo, facilitando a absorção de água pelas raízes e, portanto, manteve um conteúdo de água maior (IQBAL, 2018).

A aplicação de prolina exógena possibilitou que o CRA das plantas selvagens recuperadas retornasse ao nível das plantas que foram mantidas sob irrigação, o que não ocorreu nas plantas transgênicas, onde o CRA das plantas reidratadas foi menor do que o das irrigadas (Figura 7). Além do fato de que o período de 48 h pode não ter sido suficiente para que as plantas transgênicas retornassem ao CRA das plantas mantidas irrigadas durante todo o experimento, a influência do acúmulo da prolina no ajuste osmótico pode ser menor que o esperado e pode variar de acordo com a espécie (BORGO; MARUR; VIEIRA, 2015).

Como amplamente conhecido, a deficiência hídrica reduz a atividade fotossintética, acarretando redução no desenvolvimento e produtividade das culturas. Isso pode ocorrer através da alteração da estrutura celular, absorção de luz, transporte de elétrons, alterações bioquímicas (enzimas, proteínas), entre outros fatores que se dividem em limitações estomáticas e não estomáticas (HU *et al.*, 2018). Neste trabalho, foi observado que o déficit hídrico reduziu a assimilação de CO₂ (A) dos genótipos de tabaco estudados, porém em menor proporção nas plantas que receberam prolina exógena, principalmente nas transgênicas (Figura 8A), tendo o genótipo transgênico também apresentado maior poder de recuperação da atividade fotossintética em relação ao selvagem 48 h após a reidratação (Figura 9A). Isto também foi evidenciado em plantas de citrumelo 'Swingle' com superprodução endógena de prolina que apresentaram maiores taxas fotossintéticas quando comparadas com as plantas não transformadas sob déficit hídrico, sendo que 24 h após a reidratação essas plantas já retornaram aos valores irrigados em ambos os genótipos (CAMPOS *et al.*, 2011). Ainda, o tratamento exógeno de prolina

atenuou a diminuição da fotossíntese em plantas de melão (*Cucumis melo* L.) quando estas foram submetidas a outro tipo de estresse abiótico, a salinidade (YAN *et al.*, 2011). Esse efeito benéfico para a fotossíntese pode estar relacionado ao fato de que a prolina está envolvida na proteção das estruturas do cloroplasto, especialmente do fotossistema II, protegendo o aparato fotossintético (MOUSTAKAS *et al.*, 2011). Além disso, a síntese da prolina envolve a oxidação do NADPH resultando na regeneração de NADP^+ , que pode atuar como acceptor de elétrons ao invés do O_2 , impedindo que ocorra fotoinibição e auxiliando na manutenção da cadeia de transporte de elétrons (HARE; CRESS, 1997; MOUSTAKAS *et al.*, 2011).

Apesar do efeito positivo na atividade fotossintética nas plantas de tabaco sob deficiência hídrica, a aplicação de prolina exógena ocasionou uma pequena, mas significativa, diminuição nos valores deste parâmetro nas plantas transgênicas em condições normais de irrigação, possivelmente devido ao fato de que essas plantas já apresentavam alto acúmulo endógeno desse aminoácido (Figura 8A). Além disso, as plantas transgênicas recuperadas que receberam aplicação de prolina exógena apresentaram menor *A* do que aquelas reidratadas que não foram suplementadas com prolina (Figura 9A). Estudos mostram que a aplicação de prolina pode reduzir a atividade da Rubisco (SIVAKUMAR; SHARMILA; SARADHI, 1998) e aumentar a produção de EROS nos cloroplastos e mitocôndrias (HARE; CRESS; VAN STADEN, 2002).

Com a redução na disponibilidade de água, a condutância estomática (*G_s*) é reduzida a fim de que a planta evite a perda de água pela transpiração (KHATRI; RATHORE, 2019). Ambos os genótipos reduziram a *G_s* sob déficit hídrico, sendo que quando houve aplicação de prolina, mesmo irrigadas, as plantas selvagens exibiram diminuição neste parâmetro (Figura 8B). Após 48 h da reidratação, as plantas selvagens permaneceram com a *G_s* baixa, enquanto que as transgênicas não conseguiram recuperar a *G_s* apenas nas plantas reidratadas que foram suplementadas com prolina (Figura 9B). Isso explica o fato das plantas selvagens exibirem menores taxas de transpiração (*E*) do que as transgênicas na recuperação, devido a menor *G_s* observada nessas plantas (Figura 9D). A aplicação exógena de solutos, como a prolina, pode diminuir a condutância estomática (RAGHAVENDRA; REDDY, 1987). Rajagopal (2006) afirma que o fechamento estomático induzido pela prolina é dependente da concentração e pode ser comparado com o efeito do ácido abscísico. Essa baixa *G_s* verificada nas plantas selvagens reidratadas pode explicar

o fato desse genótipo não ter recuperado a atividade fotossintética 48 h após a reidratação (Figura 9A), visto que o fechamento estomático reduz a difusão de CO₂ na folha, ocasionando queda na fotossíntese (CORNIC, 2000).

Mesmo com a Gs baixa as plantas transgênicas apresentaram maior A que as selvagens sob suspensão da irrigação (Figura 8A), mostrando novamente o efeito benéfico da prolina na fotossíntese de plantas com deficiência hídrica e sugerindo que não houve danos no aparato fotossintético. De modo geral, quando a planta sofre por algum tipo de estresse que acarreta o fechamento estomático, a entrada de CO₂ é reduzida e conseqüentemente, o conteúdo intracelular de CO₂ diminui devido ao consumo de CO₂ pela atividade fotossintética (DALASTRA *et al.*, 2014). Por esse motivo, as plantas transgênicas de tabaco exibiram menor conteúdo intracelular de CO₂ (Ci) no déficit hídrico em comparação as plantas selvagens (Figura 8C), ressaltando sua maior eficiência no uso do CO₂ para sua atividade fotossintética.

A deficiência hídrica induz as plantas a economizarem água diminuindo a perda através dos estômatos pela transpiração (KHATRI; RATHORE, 2019). Ambos os genótipos aqui estudados reduziram a transpiração (E) no déficit hídrico, sendo que as plantas transgênicas mostraram menores valores que as selvagens (Figura 8D). Essas plantas também demonstraram serem mais eficientes no uso água (EUA) ao manterem maior atividade fotossintética sob menor perda de água pela transpiração (A/E) (Figura 8E). Em trigo (*Triticum aestivum*) sob condições de deficiência hídrica, a aplicação foliar de prolina também foi benéfica para a melhoria da eficiência do uso da água, tendo os autores atribuído essa melhoria ao melhor ajuste osmótico ocasionado pela prolina (FAROOQ *et al.*, 2017).

A redução da disponibilidade de água acarreta desidratação foliar, queda da turgescência, inibição do alongamento celular, fechamento estomático e declínio da atividade fotossintética, resultando em menor crescimento das plantas (PINHEIRO; CHAVES, 2011). Como esperado, a suspensão da irrigação ocasionou menor acúmulo de massa seca em ambos os genótipos de tabaco estudados, porém essa redução foi menor nas plantas transgênicas e nos tratamentos com prolina exógena (Figura 10). Em aveia (*Avena sativa*) cultivada em ambiente com limitação de água, a aplicação foliar de prolina (40 mM) também melhorou consideravelmente o crescimento, peso fresco e seco de plantas (GHAFLOOR *et al.*, 2019). A influência da prolina no aumento da biomassa das plantas pode estar relacionada à grande

quantidade de energia (ATP) gerada pelo metabolismo desse aminoácido, sendo que essa energia pode ser direcionada para o crescimento, bem como tolerância ao estresse, protegendo enzimas, proteínas, membranas e organelas vitais (HAYAT *et al.*, 2012). Entretanto, a prolina afetou negativamente o crescimento de mudas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e favoravelmente o crescimento das raízes e da parte aérea de mudas de arroz (*Oryza sativa*), sugerindo que a aplicação de prolina exógena tem efeitos diferentes no crescimento, dependendo da espécie e do estágio de desenvolvimento das plantas (SUEKAWA; FUJIKAWA; ESAKA, 2019).

A aplicação de prolina exógena teve um efeito benéfico sobre o aumento na massa seca de raiz (MSR) das plantas selvagens em condições normais de irrigação. Entretanto, este efeito positivo não foi verificado quando as plantas foram submetidas ao déficit hídrico (Figura 10B). A aplicação de várias concentrações de prolina também não estimulou o alongamento de raiz em *Arabidopsis thaliana* sob deficiência hídrica (SHARMA; VILLAMOR; VERSLUES, 2011). Esses autores verificaram que a prolina foi um forte inibidor do alongamento radicular, e isso provavelmente está relacionado à alteração do equilíbrio metabólico causado por aminoácidos aplicados ou interrupção do transporte de metabólitos nas condições estressantes. Entretanto, esta hipótese é insuficiente para explicar totalmente os efeitos do acúmulo de prolina *per se* nas condições de estresse aqui aplicadas, pois, no geral, as plantas transgênicas com alto acúmulo endógeno de prolina exibiram maior MSR do que as selvagens (Figura 10B). Sob condições estressantes a prolina é sintetizada no citoplasma e no cloroplasto, transportada e catabolizada na mitocôndria radicular. Como a taxa de transporte de prolina da parte aérea para a raiz é elevada quando há deficiência hídrica e a prolina é posteriormente catabolizada na raiz, a energia liberada pela oxidação (ATP e NADPH) pode ser utilizada para auxiliar o acúmulo de biomassa na raiz, permitindo que a planta tenha acesso a umidade mais baixa no perfil do solo (KISHOR; SREENIVASULU, 2014). Como o parâmetro massa seca depende tanto do tamanho como da quantidade de raízes, os maiores valores de MSR pode ser devido, principalmente, ao aumento do número de raízes como já reportado por outros autores (BIANCUCCI *et al.*, 2015; SUEKAWA; FUJIKAWA; ESAKA, 2019).

Assim, de modo geral, nossos dados confirmam os efeitos benéficos da prolina em plantas sob deficiência hídrica. As plantas transgênicas exibiram altos níveis endógenos de prolina (Figura 4A, 4B) e o acúmulo desse aminoácido atuou

na regulação da perda de água. Essas plantas reduziram a condutância estomática (G_s) e a transpiração (E) e conseguiram manter elevada a atividade fotossintética, aumentando a eficiência do uso da água (EUA) (Figura 8) e conseqüentemente o acúmulo de biomassa (Figura 10). Esse efeito positivo da prolina em plantas sob déficit hídrico também foi mostrado quando este aminoácido foi aplicado antes das plantas serem submetidas à suspensão da irrigação, não somente nas plantas transgênicas que já apresentaram altos níveis de prolina endógena, mas também nas plantas selvagens (Figuras 8, 10).

Com relação ao perfil transcricional dos genes da via da prolina em plantas de tabaco, estes apresentam regulação diferencial, o que indica a sua contribuição para o controle do conteúdo de prolina sob déficit hídrico e na reidratação (DROBÁ *et al.*, 2011). Os dados aqui apresentados mostraram aumento do número de transcritos de *P5CS1* na deficiência hídrica, enquanto *P5CS2* foi menos expresso e de forma diferente entre os genótipos (Figuras 11A, 11B). Esses genes também exibiram maior número de transcritos 48 h após a reidratação, sendo essa expressão significativamente maior nas plantas transgênicas recuperadas (Figuras 12A, 12B). Resultados similares foram encontrados também em *Nicotiana tabacum* (DROBÁ *et al.*, 2011), onde o gene *P5CS1* foi altamente expresso seis dias após a suspensão da irrigação, sendo que uma ligeira queda na expressão de *P5CS2* foi observada nessa mesma condição de deficiência hídrica. Estes autores também mostraram que na reidratação, o *P5CS1* permaneceu com maior expressão do que nas plantas irrigadas. Também Vanková, Dobrá e Storchová (2012) demonstraram que o nível de transcrição do gene *P5CS1* permaneceu alto nas folhas de tabaco após a reidratação das plantas. Essa expressão diferencial entre as isoformas de *P5CS* pode ser explicada pelo fato de que a isoforma *P5CS1* foi identificada como sendo responsável pela maior biossíntese de prolina sob estresses abióticos (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010), enquanto a *P5CS2* é considerada como responsável pela manutenção das funções básicas celulares, sendo expressa constitutivamente (SIGNORELLI; MONZA, 2017).

O gene *P5CR* também aumentou a expressão nas plantas sob déficit hídrico e na recuperação comparativamente ao tratamento calibrador (genótipo selvagem, irrigado e sem aplicação de prolina) (Figura 11C, 12C). *P5CS* e *P5CR* formam a via de biossíntese da prolina (PER *et al.*, 2017). Dessa forma, o maior número de transcritos desses genes está em concordância com os níveis elevados de prolina

nas folhas e nas raízes sob deficiência hídrica e 48 h após a reidratação (Figuras 4A, 4B, 5A, 5B), o que evidencia que a principal regulação da produção de prolina está no nível transcricional. Em arroz (*Oryza sativa*) submetido a estresse salino houve aumento na expressão dos genes *P5CS* e *P5CR* e no teor de prolina, sendo esse incremento ainda maior com a aplicação de prolina (NOUNJAN; NGHIA; THEERAKULPISUT, 2012). Em amendoim (*Arachis hypogaea*), a isoforma *P5CS1* foi induzida em plantas tratadas com prolina exógena submetidas à seca, enquanto que a expressão do gene *P5CR* foi reprimida (FURLAN *et al.*, 2020). Isto pode também ser observado neste trabalho, onde a prolina exógena promoveu redução na expressão de *P5CR* em relação às plantas que não receberam aplicação desse aminoácido sob déficit hídrico e 48 h após a reidratação, e aumentou de *P5CS1*, principalmente no genótipo selvagem (Figura 11A). Essa redução no número de transcritos de *P5CR*, mesmo com alto acúmulo de prolina, sugere que outros níveis de regulação, além dos exclusivamente traducionais, podem ter influenciado o aumento da prolina nas folhas de tabaco (FORLANI *et al.*, 2015a). Por exemplo, o acúmulo de prolina em plantas de *Setaria italica* submetidas ao estresse salino foi, em parte, devido ao aumento da atividade tanto da enzima P5CR quanto da glutamina sintetase (VEERANAGAMALLAIAH *et al.*, 2007). Em *Arabidopsis thaliana*, a quantidade da enzima P5CR não se mostrou associada ao número de transcritos desse gene e nem à concentração intracelular de prolina, tendo sido mostrado que esta enzima tem uma regulação complexa de sua atividade em função do estado redox do “pool” de nucleotídeos de piridina, da concentração de prolina e de íons metálicos no citosol (GIBERTI; FUNCK; FORLANI, 2014). O aumento na expressão de *P5CDH* sob déficit hídrico em plantas suplementadas com prolina (Figura 11D) sugere que a adição desse aminoácido também aumentou o seu catabolismo na planta, gerando mais NADH pela ação da enzima P5CDH, como mostrado pela menor razão $NAD^+/NADH$ (Figura 15B). Como o NADH causa inibição por *feedback* da P5CR (GIBERTI; FUNCK; FORLANI, 2014), isto também pode ter interferido na observada menor expressão de *P5CR*.

Assim como o tabaco, *Arabidopsis* possui duas isoformas funcionais de *ProDH*, que possuem funções fisiológicas não redundantes, embora parcialmente sobrepostas, sendo que a expressão dessas duas isoformas diferem em relação à regulação espacial, de desenvolvimento e ambiental (FUNCK; ECKARD; MÜLLER, 2010). O acúmulo de prolina em plantas expostas à seca está associado à

diminuição da expressão dos genes *ProDH*, que são responsáveis pelo catabolismo da prolina, e aumento da expressão de *P5CS*, que atua na biossíntese de prolina (DROBÁ *et al.*, 2011). Esses autores observaram que em tabaco a expressão de *ProDH1* e *ProDH2* caiu rapidamente dentro de um dia após a desidratação e manteve-se baixa com a progressão do estresse. Em amendoim submetido à seca e suplementado com prolina exógena também foi observado redução do número de transcritos de *ProDH1* e *ProDH2* (FURLAN *et al.*, 2020). O mesmo ocorreu com os genótipos aqui estudados, que também na presença de prolina exógena apresentaram queda na expressão desses genes sob suspensão da irrigação (Figuras 11E, 11F). Dessa maneira, a supressão dos genes *ProDH* impede a degradação da prolina e contribui para o acúmulo desse osmoprotetor nas células a fim de atenuar os efeitos do déficit hídrico (PER *et al.*, 2017). Após 48 h da reidratação, a expressão de *ProDH2* continuou baixa nas plantas transgênicas suplementadas com prolina (Figura 12F). Ainda na recuperação, as plantas transgênicas que foram mantidas sob condições normais de irrigação e não receberam aplicação de prolina exógena apresentaram maior expressão de *ProDH1* e *ProDH2* comparado às plantas selvagens (Figuras 12E, 12F) e a maior atividade da enzima ProDH (Figura 14A). Isto pode ser explicado pelo fato de que as plantas transgênicas exibiram alto acúmulo endógeno de prolina que exigiu maior expressão e atividade de *ProDH* para catabolizar este aminoácido.

Apesar do menor número de transcritos dos genes *ProDH* em ambos os genótipos suplementados com prolina exógena e sob deficiência hídrica em relação as plantas que não receberam aplicação (Figuras 11E, 11F), verificou-se aumento na atividade da enzima ProDH nesses mesmos tratamentos (Figura 13B). A atividade da ProDH é induzida ao fim de períodos de estresse ou em tratamentos com prolina (SCHERTL *et al.*, 2014). Esses autores verificaram forte indução da atividade de ProDH após o tratamento com 50 mM de prolina em *Arabidopsis thaliana* (SCHERTL *et al.*, 2014). Assim, a prolina acumulada tende a ser degradada, gerando energia e contribuindo para que as plantas retornem ao seu estado de homeostase original (KISHOR; SREENIVASULU, 2014). A falta de relação entre a expressão dos genes e a atividade da ProDH pode ser resultado de regulações pós-transcricionais e pós-transducionais, estabilidade dos transcritos, disponibilidade de substrato e também devido ao envolvimento de outras isoformas em processos biológicos que ocorrem na planta (CARVALHO *et al.*, 2013; FORLANI

et al., 2015b). Ainda, foi relatado que o número de transcritos de *ProDH* atinge seu máximo entre 10 e 24 h após o tratamento com prolina (KIYOSUE *et al.*, 1996). Como neste trabalho a análise da expressão gênica foi realizada nas folhas coletadas 12 dias após a última aplicação de prolina, isso poderia explicar uma menor expressão de *ProDH* comparativamente ao que poderia ser observado em uma amostragem logo após o tratamento com o aminoácido (Figuras 11E, 11F). Por fim, o aumento da expressão do gene *P5CS1* (Figura 11A) e da atividade da ProDH (Figura 13B) sugere que a prolina exógena provocou o aumento da produção desse aminoácido tanto pela biossíntese como pela ativação da via de catabolismo da prolina, a qual proporciona maior disponibilidade de glutamato formado a partir da oxidação daquele aminoácido. Nossos dados mostram que 48 h após a reidratação, as plantas que foram pulverizadas com prolina exógena exibiram menor número de transcritos dos genes *ProDH*, principalmente nas plantas transgênicas recuperadas (Figuras 12E, 12F). Além disso, não foi verificado aumento na atividade da enzima ProDH na recuperação dos genótipos com aplicação de prolina em relação as plantas mantidas irrigadas (Figura 14B). Entretanto, houve aumento na expressão dos genes responsáveis pela síntese de prolina, *P5CS1*, *P5CS2* e *P5CR*, significativamente maior nas plantas transgênicas (Figuras 12A, 12B, 12C). Dessa forma, esses dados explicam o maior acúmulo de prolina na recuperação das plantas transgênicas (Figuras 5A, 5B), onde a síntese desse aminoácido foi induzida e o catabolismo foi reprimido. Em tabaco, altos níveis de prolina após recuperação de um período de déficit hídrico está relacionado com a resposta tardia dos genes *ProDH* e *P5CS*, o que pode levar à proteção eficiente do aparato fotossintético em folhas (DOBRÁ *et al.*, 2011).

O gene *P5CDH* codifica a segunda enzima da via do catabolismo da prolina, atuando na conversão de P5C em glutamato (RIZZI *et al.*, 2015). Ao contrário do gene *ProDH*, o *P5CDH* exibiu um aumento do número de transcritos sob deficiência hídrica em ambos os genótipos e após a reidratação, sendo que nas plantas transgênicas recuperadas essa expressão foi significativamente maior que nas selvagens (Figura 11D, 12D). Em arroz também foi observado aumento na expressão de *P5CDH* após tratamento com seca induzido por polietilenoglicol (FORLANI *et al.*, 2015b). Nas mitocôndrias, a prolina é catalisada pela ProDH utilizando FAD^+ como cofator e fornece elétrons à cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, produzindo P5C. Este, por sua vez, é oxidado a glutamato pela

P5CDH ou exportado para o citosol e reduzido de volta à prolina pela P5CR (FICHMAN *et al.*, 2015). O acúmulo de P5C é considerado tóxico, pois P5C pode reagir com vários compostos celulares e ocasionar apoptose (HELLMANN *et al.*, 2000). Com o aumento no conteúdo de prolina sob estresse, a expressão do gene *P5CDH* e atividade da enzima que este codifica pode auxiliar na redução dessa toxicidade pelo catabolismo desse aminoácido. A atividade da P5CDH compensa a ciclagem da prolina-P5C, oxidando P5C em glutamato na mitocôndria, fornecendo uma fonte de α -cetoglutarato ao ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Quando *P5CDH* é pouco expresso e tem baixa atividade, níveis mais altos de P5C são acumulados e o excesso de elétrons leva a formação de EROS (MILLER *et al.*, 2009).

Existe uma relação entre o metabolismo de prolina e o estado redox das células. A síntese de prolina requer equivalentes redutores (NAD(P)H), enquanto seu catabolismo fornece esses equivalentes. Dessa forma, o metabolismo desse aminoácido auxilia na regulação das razões $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$, sendo que a interconversão entre glutamato e prolina mantém o balanço entre os compartimentos celulares (FORLANI *et al.*, 2019). Neste trabalho, a aplicação de prolina exógena não afetou a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ nas plantas selvagens sob deficiência hídrica, mas reduziu quando estas plantas foram mantidas sob irrigação (Figura 15A). A prolina que não é usada para síntese de proteínas ou como osmoprotetor, no caso de plantas que não passam por condições estressantes, é degradada (SCHERTL *et al.*, 2014). Neste caso, a adição de prolina diminuiu NADP^+ nas plantas irrigadas, indicando que esta piridina foi usada pela enzima P5CDH, que na degradação desse aminoácido converte NADP^+ em NADPH, reduzindo essa razão (FICHMAN *et al.*, 2015). A redução da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ também foi verificada no genótipo transgênico suplementado com prolina exógena (Figura 15A). Como essas plantas já possuem alto acúmulo de prolina endógena, essa menor razão deve-se a necessidade de usar o NADP^+ na degradação de prolina pela enzima P5CDH, gerando NADPH. As plantas transgênicas submetidas ao déficit hídrico sem aplicação de prolina exibiram a maior razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Figura 15A). Essas plantas, além de possuírem atividade das enzimas nativas da via biossintética da prolina (P5CS e P5CR), apresentam a expressão constitutiva do *P5CS* transgene (*VaP5CSF129A*) para acumularem altos níveis desse aminoácido. A atividade dessas enzimas pode resultar em grandes quantidades de NADP^+ , visto que ambas as enzimas P5CS e P5CR utilizam NADPH e liberam NADP^+ na produção de prolina

(FICHMAN *et al.*, 2015). A P5CR, enzima que catalisa o segundo passo de síntese da prolina, tem também maior afinidade com o NADPH para redução do P5C em prolina (GIBERTI; FUNCK; FORLANI, 2014). Dessa forma, o maior consumo de NADPH e a formação de NADP^+ elevaram a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ nessas plantas.

É interessante notar que a aplicação de prolina exógena não teve efeito nas razões $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ e NAD^+/NADH nas plantas selvagens sob deficiência hídrica, que mantiveram valores similares em ambos os tratamentos de prolina (0 e 10 mM) (Figuras 15A, 15B). Já nas plantas transgênicas estressadas essas razões foram reduzidas com a suplementação com esse aminoácido, provavelmente pela geração de maiores quantidades de NADPH e NADH na via de degradação da grande quantidade de prolina produzida. O equilíbrio entre a síntese de prolina e seu catabolismo é vital para a manutenção do crescimento e um equilíbrio redox das plantas sob estresse (KISHOR; SREENIVASULU, 2014), onde NAD(P)^+ e NAD(P)H são gerados durante, respectivamente, a síntese e a degradação da prolina.

Também, após 48 h da reidratação, não houve diferenças significativas na razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ entre ambos os genótipos nas plantas recuperadas com e sem prolina exógena (Figura 16A), enquanto que as plantas transgênicas reidratadas exibiram maior razão NAD^+/NADH do que as selvagens (Figura 16B). Essa menor razão detectada nas plantas selvagens recuperadas pode ser explicada pela maior quantidade de NADH liberada na degradação da prolina pela enzima P5CDH, visto que essas plantas apresentaram menor conteúdo desse aminoácido na recuperação comparado com as plantas transgênicas (Figuras 5A, 5B).

Durante a fotossíntese, ATP e NADPH são produzidos, sendo os equivalentes redutores gerados a partir da fotorredução de NADP^+ . Porém, a regeneração do NADP^+ é essencial para evitar a produção de EROS, especialmente em situações de estresse, pois ele atua como acceptor de elétrons terminal. A ativação de mecanismos que realizam a regeneração desse acceptor é necessária, permitindo a produção contínua de ATP através da cadeia de transporte de elétrons fotossintética (VISHWAKARMA *et al.*, 2015). Esses mecanismos incluem a via biossintética da prolina e a válvula de malato, esta última através da atividade da enzima NADP-MDH (SCHEIBE, 2004; SZABADOS; SAVOURÉ, 2010). Quando as plantas são submetidas a estresses abióticos, como o déficit hídrico, podem ser observadas mudanças nos níveis de expressão dos genes e atividade da malato desidrogenase (MDH) que desempenha um papel importante na dissipação do

excesso de energia através da válvula de malato (TANIGUCHI; MIYAKE, 2012). Podemos observar que em ambos os genótipos o gene *NADP-MDH*, que codifica a enzima chave da válvula de malato, exibiu maior expressão sob déficit hídrico em comparação com o tratamento irrigado, sendo este aumento maior nas plantas selvagens sem aplicação de prolina exógena (Figura 11G). *NAD-MDH* também apresentou maior número de transcritos em relação ao tratamento calibrador na deficiência hídrica sem suplementação de prolina em ambos os genótipos (Figura 11H). O mesmo padrão de expressão gênica pode ser observado na atividade da enzima *NADP-MDH* que aumentou em ambos os genótipos com a imposição da deficiência hídrica no tratamento sem aplicação de prolina exógena. Essa atividade foi maior nas plantas selvagens em relação às que permaneceram em condições normais de irrigação (Figura 13A). Dessa forma, é notória a ativação dessa via de dissipação de energia, a válvula de malato, nas plantas sob déficit hídrico, principalmente nas plantas selvagens.

A válvula de malato, então, permite que os equivalentes redutores cloroplásticos sejam indiretamente transferidos para o citosol e outros compartimentos subcelulares, como as mitocôndrias, para evitar o estresse oxidativo. A proteína AOX, envolvida na cadeia respiratória nas mitocôndrias, providencia uma rota alternativa no transporte desses equivalentes redutores e, em conjunto com o aumento da atividade das MDH, tem papel na modulação do estado redox celular e no desempenho fotossintético, sendo conhecido o envolvimento desta proteína na tolerância a diferentes estresses ambientais (VANLERBERGHE, 2013; VISHWAKARMA *et al.*, 2015). Em plantas de *Rumex K-1* (*Rumex patientia* × *R. tianschaius*) foi verificado que as atividades de *NADP-MDH* e AOX aumentaram significativamente nas folhas sob luz intensa, indicando que o transporte de malato - oxaloacetato foi ativado para transportar o excesso de equivalentes redutores gerados nos cloroplastos para outras organelas (ZHANG *et al.*, 2012). Estes autores sugerem que os equivalentes transportados dos cloroplastos podem ser oxidados pela cadeia respiratória de transporte de elétrons e que, nessa situação, a via AOX, que é uma via de transporte de elétrons não fosforilante, desempenha um papel na dissipação dos equivalentes redutores derivados dos cloroplastos (ZHANG *et al.*, 2012). Neste trabalho, ficou evidenciado o incremento na expressão do gene AOX sob déficit hídrico no genótipo selvagem (Figuras 11I). Também em tabaco, um aumento progressivo na quantidade de proteína AOX foliar foi verificado com

aumento da severidade da seca (DAHAL; MARTYN; VANLERBERGHE, 2015). Estes autores propõem que a quantidade de AOX influencia a respiração das plantas sob luz, particularmente durante um déficit hídrico severo, quando a respiração via citocromo pode se tornar cada vez mais restrita. Isso afeta o estado redox do cloroplasto, influenciando como o aparato fotossintético responde ao aumento da severidade da seca. Wang e Vanlerberghe (2013) mostraram que transcritos de *AOX1a* e *NAD-MDH* aumentaram gradualmente em resposta a um estresse de seca progressivo em tabaco, sugerindo que AOX e NAD-MDH são capazes de reduzir parcialmente os danos celulares na falta de água. Esses autores afirmam que o aumento do NAD-MDH auxilia a importação do excesso de poder redutor para a mitocôndria via válvula de malato para posterior oxidação pela AOX. Quando a assimilação de CO₂ é impedida pelo estresse, a mitocôndria pode ter um papel na oxidação do excesso de redutor do cloroplasto (GANDIN *et al.*, 2012). Esse fato pode ser confirmado neste trabalho, onde ambos os genótipos reduziram a assimilação de CO₂ sob déficit hídrico, sendo essa queda maior nas plantas selvagens e sem prolina exógena (Figura 8A). Dessa forma, *NADP-MDH*, *NAD-MDH* e *AOX* aumentaram a expressão nos tratamentos de seca, principalmente no genótipo selvagem, ativando esses mecanismos de dissipação de energia.

É importante ressaltar que nossos dados mostram que apesar do aumento no número de transcritos de *NADP-MDH* na deficiência hídrica, as plantas transgênicas exibiram uma significativa menor expressão em relação às selvagens quando não sofreram a adição de prolina exógena. Esse incremento no nível de mRNA do gene *NADP-MDH* foi ainda menos notável nas plantas que receberam a suplementação com esse aminoácido (Figura 11G). A aplicação de prolina exógena também influenciou na atividade da enzima NADP-MDH, que foi reduzida nos dois genótipos, sendo que nas plantas transgênicas a atividade foi ainda menor (Figura 13A). A prolina exógena também reduziu a expressão de *NAD-MDH* nos genótipos avaliados (Figura 11H) e manteve a expressão de *AOX* similar ao calibrador sob déficit hídrico nas plantas transgênicas com alto acúmulo endógeno desse aminoácido (Figura 11I). Estes dados em conjunto indicam que a prolina atuou como um mecanismo complementar/compensatório para as vias de dissipação de energia, válvula de malato e AOX, que foram menos utilizadas pelo acúmulo deste aminoácido. Essa contribuição da prolina ocorre de forma que sua biossíntese libera aceptores de elétrons (NADP⁺) que irão atuar na drenagem do excesso de elétrons,

evitando assim estresse oxidativo (SIGNORELLI, 2016). Isso pode ser confirmado com o menor conteúdo de MDA verificado em plantas de ambos os genótipos sob deficiência hídrica que receberam prolina exógena em relação àquelas que não foram suplementadas com esse aminoácido (Figura 4C). Além disso, essas plantas conseguiram manter uma maior assimilação de CO₂ (A) (Figura 8A) e consequentemente o acúmulo de biomassa (Figura 10).

Após a reidratação houve um aumento expressivo no número de transcritos de *NADP-MDH* em ambos os genótipos, sendo que nas plantas transgênicas foi significativamente maior que nas selvagens (Figura 12G). Da mesma forma, foi verificado maior atividade da NADP-MDH nas plantas recuperadas que receberam aplicação de prolina exógena (Figura 14A). A ativação da válvula de malato é essencial para equilibrar o metabolismo energético e manter a homeostase redox nas plantas após um período de estresse, servindo como um tampão termodinâmico e mantendo constante a razão NADP⁺/NADPH no cloroplasto para otimizar a fotossíntese (SELINSKI; SCHEIBE, 2019). Isso pode ser observado na razão NADP⁺/NADPH que foi similar nos tratamentos de recuperação de ambos os genótipos (Figura 16A). O maior poder de recuperação fotossintética das plantas transgênicas após o déficit hídrico mostrado neste trabalho (Figura 9A) pode talvez ser atribuído a este fator.

Os genes *NAD-MDH* e *AOX* também aumentaram a expressão 48 h após a reidratação em ambos os genótipos, sendo maior nas plantas recuperadas que não receberam aplicação de prolina exógena (Figuras 12H, 12I). Dessa forma, a maior expressão de *NAD-MDH* ativa a via *AOX* pela geração de NADH que pode entrar na cadeia respiratória de transporte de elétrons, apoiando a síntese de energia em forma de ATP para auxiliar as plantas na recuperação (SELINSKI; SCHEIBE, 2019). Plantas que foram pulverizadas com prolina exibiram menor expressão de *NAD-MDH*, provavelmente devido ao elevado conteúdo desse aminoácido que, por seu catabolismo, gera grande quantidade de NADH pela atividade da P5CDH, fato este que pode ser suportado pelo declínio na razão NAD⁺/NADH observado nas plantas recuperadas suplementadas com prolina em relação às plantas irrigadas (Figuras 16B). Dessa forma, o NADH gerado no catabolismo da prolina vai alimentar a via respiratória mitocondrial produzindo energia para recuperação das plantas. Assim, há menor necessidade do NADH formado pela *NAD-MDH* e por isso houve redução

na expressão desse gene quando as plantas receberam prolina exógena (Figura 12H).

Como verificado, o metabolismo da prolina atua na manutenção do balanço redox. Alguns autores afirmaram que há uma ligação desse aminoácido no equilíbrio redox do cloroplasto (DIETZ; PFANNSCHMIDT, 2011), onde a enzima NADP-MDH atua na manutenção desse balanço nessa organela (SELINSKI; SCHEIBE, 2019). Neste estudo, nós confirmamos essa afirmação pela menor expressão e atividade da NADP-MDH verificada nas plantas sob déficit hídrico quando receberam aplicação de prolina exógena, principalmente no genótipo transgênico com alto acúmulo endógeno desse aminoácido (Figuras 11G, 13A). A ativação de NADP-MDH ocorre quando há escassez de NADP^+ , o que resulta em altas concentrações de NADPH e redução da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (SCHEIBE, 2004). Essa alta quantidade de NADPH pode ser resultado da não utilização dessa piridina na etapa bioquímica da fotossíntese para produção de carboidratos, devido à falta de CO_2 ocasionada pelo estresse (SCHEIBE, 1991). A NADP-MDH usa o excesso de NADPH gerado pela cadeia de transporte de elétrons fotossintética para converter oxaloacetato em malato, regenerando o acceptor de elétrons NADP^+ . Esse controle garante que os equivalentes redutores sejam exportados para outros compartimentos subcelulares através do transporte de malato - oxaloacetato (válvula de malato) quando estiverem em excesso e quando não forem necessários no cloroplasto para o processo de assimilação de CO_2 (SCHEIBE, 1991). O malato então é usado para outras reações fora dos cloroplastos, podendo ser direcionado para dissipação de energia na via AOX nas mitocôndrias (SELINSKI; SCHEIBE, 2019). Ao contrário, alto nível de NADP^+ atua na redução da atividade da NADP-MDH (SCHEIBE, 2004). Isto pode ser observado nas plantas selvagens estressadas pulverizadas com prolina exógena, que aumentaram a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ em relação às plantas irrigadas, possivelmente pelo aumento na quantidade de NADP^+ (Figura 15A) e reduziram a atividade da NADP-MDH (Figura 13A). Esse incremento no nível de NADP^+ também pode estar relacionado à ativação do ciclo GS/GOGAT (glutamina sintetase e glutamato sintase), fundamental para assimilação de nitrogênio pelas plantas (XU; FAN; MILLER, 2012). A degradação da prolina nessas plantas selvagens que receberam esse aminoácido, pela ação das enzimas ProDH e P5CDH, ocasiona acúmulo de glutamato e NADPH. Esse glutamato acumulado é usado no ciclo GS/GOGAT para formar glutamina. Nessa reação NADPH é oxidado

formando NADP^+ . Dessa forma, o acúmulo de NADP^+ pela ativação desse ciclo pode ter reduzido a atividade da NADP-MDH nas plantas selvagens.

As plantas transgênicas exibiram uma queda na atividade da enzima NADP-MDH ainda maior que nas selvagens ao serem suplementadas com prolina (Figura 13A). Porém, diferentemente do genótipo selvagem, essas plantas estressadas reduziram a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, provavelmente pela maior quantidade de NADPH (Figura 15A). Como já mencionado, altas concentrações de NADPH e a redução da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ativam a enzima NADP-MDH (SCHEIBE, 2004), sendo que o contrário ocorreu com essas plantas transgênicas, que sob essas condições reduziram a atividade dessa enzima. Este aumento na quantidade de NADPH pode ser resultado da degradação da grande quantidade de prolina acumulada por essas plantas pela ação da enzima P5CDH que converte o NADP^+ em NADPH. Além disso, nossos dados mostraram que as plantas transgênicas foram menos afetadas pelo déficit hídrico, mantendo maiores taxas fotossintéticas nessa condição estressante, com menor perda de água, além de acumularem mais biomassa (Figuras 8, 10). Dessa forma, maiores quantidades de NADPH também pode estar relacionado ao menor consumo dessa piridina gerada pela via da pentose fosfato (PPP) para reciclagem de glutathiona oxidada (GSSG), que é essencial para evitar estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010). Outros estudos deverão ser realizados para elucidar a relação entre a via PPP e a produção constitutiva de prolina.

3.6 Considerações Finais

Em resumo, os resultados descritos neste trabalho mostraram aumento no conteúdo de prolina em folhas e raízes de plantas de tabaco após um déficit hídrico de nove dias, sendo este aumento maior nas plantas transgênicas superexpressando o transgene *VaP5CSF129A* e quando as plantas receberam a suplementação desse aminoácido (10 mM). Isso ocorreu tanto pelo aumento na expressão dos genes que codificam as enzimas da biossíntese de prolina, *P5CS1* e *P5CR*, como também pela supressão da expressão do gene *ProDH* na deficiência hídrica, principalmente da isoforma *ProDH2*, responsável pelo catabolismo da prolina. As plantas transgênicas reduziram a condutância estomática (G_s) e a transpiração (E) e conseguiram manter elevada a atividade fotossintética, aumentando a eficiência do uso da água (EUA) e, conseqüentemente o acúmulo de

biomassa, sendo este efeito positivo ainda maior quando a prolina foi aplicada de forma exógena. Entretanto, a suplementação de prolina nas plantas transgênicas em condições normais de irrigação ocasionou uma redução da atividade fotossintética, possivelmente devido à diminuição da atividade da Rubisco (SIVAKUMAR; SHARMILA; SARADHI, 1998). Foi possível também observar aumento na expressão dos genes *NADP-MDH*, *NAD-MDH* e *AOX* nas plantas sob deficiência hídrica, principalmente no genótipo selvagem, indicando a ativação desses mecanismos de dissipação de energia durante o estresse aplicado. Nos tratamentos de déficit hídrico com pulverização de prolina houve uma comparativa menor expressão desses genes e da atividade da enzima *NADP-MDH*, sendo estes valores ainda menores nas plantas transgênicas. Com relação às piridinas, a aplicação de prolina exógena não teve efeito nas razões $NADP^+/NADPH$ e $NAD^+/NADH$ nas plantas selvagens sob deficiência hídrica, que se mantiveram similares em ambos os tratamentos de prolina (0 e 10 mM). Já nas plantas transgênicas estressadas, essas razões foram reduzidas com a suplementação com esse aminoácido, exibindo maiores quantidades de *NADPH* e *NADH*, provavelmente pela geração dessas piridinas na via de degradação da grande quantidade de prolina produzida.

Em condições de recuperação após 48 h da reidratação, as plantas de ambos os genótipos suplementados com prolina exibiram altos níveis desse aminoácido nas folhas, sendo isto ainda maior nas plantas transgênicas. Esse maior acúmulo de prolina na recuperação das plantas transgênicas pode ser explicado pelo aumento das expressões dos genes *P5CS1*, *P5CS2* e *P5CR*, que foram significativamente maiores do que nas plantas selvagens, e pela redução na expressão do gene e da atividade de *ProDH*. Também, as plantas transgênicas exibiram maior poder de recuperação da atividade fotossintética, mostrando que a pré-aplicação de prolina antes do estresse não tem um efeito superior à sua produção endógena. Isso porque a alta produção endógena desse aminoácido gera aceptores de elétrons, evitando a formação de EROS durante o estresse, auxiliando em uma melhor recuperação das plantas. Um aumento expressivo no número de transcritos de *NADP-MDH* foi verificado em ambos os genótipos na recuperação, sendo que nas plantas transgênicas foi significativamente maior que nas selvagens. Da mesma forma, houve uma maior atividade da *NADP-MDH* nas plantas que receberam aplicação de prolina exógena. A ativação da válvula de malato após um período de estresse é essencial para equilibrar o metabolismo energético e manter a

homeostase redox nas plantas. *NAD-MDH* e *AOX* também aumentaram a expressão 48 h após a reidratação, sendo maior nas plantas recuperadas que não receberam aplicação de prolina exógena. Ainda, as plantas que foram pulverizadas com prolina exibiram menor expressão de *NAD-MDH* e *AOX* ocasionando um declínio na razão NAD^+/NADH pelo maior conteúdo de *NADH* nessas plantas devido o catabolismo dessa prolina.

Assim, os resultados aqui obtidos mostram que a prolina atua na defesa das plantas conduzindo reações redox oxidativas e redutoras, dependendo do contexto fisiológico das plantas, do estresse aplicado e como um mecanismo complementar/compensatório para as vias de dissipação de energia, válvula de malato e *AOX*, através da regeneração de NADP^+ sob deficiência hídrica. Portanto, nossos dados dão suporte à hipótese levantada no estudo de Hebbelmann *et al.* (2012) com plantas de *Arabidopsis* mutantes com nocaute do gene *NADP-MDH*, nas quais a biossíntese de prolina contribuiu para a manutenção da homeostase redox na falta da válvula de malato.

Por fim, nossos dados também confirmaram a possibilidade do uso de plantas geneticamente modificadas visando uma maior tolerância a deficiência hídrica, umas das principais causas da redução da produtividade das culturas. As plantas transgênicas com alto acúmulo endógeno de prolina mostraram-se mais tolerantes ao déficit hídrico, principalmente pela maior atividade fotossintética e acúmulo de biomassa em relação às selvagens. Tendo em vista o claro papel da prolina no aumento da tolerância ao déficit hídrico, o desenvolvimento de plantas transgênicas utilizando promotores induzidos pode ser mais vantajoso do que o uso de promotores constitutivos, como o usado neste estudo, evitando assim a expressão do *P5CS* durante as várias fases de desenvolvimento da planta (CARNEIRO; CARNEIRO, 2011). A aplicação de prolina exógena antes do estresse proporcionou benefícios ainda maiores nas plantas transgênicas submetidas ao déficit hídrico, sendo que este efeito da suplementação também foi verificado no genótipo selvagem. Sendo assim, em certas situações, a aplicação exógena de prolina tem potencial prático para beneficiar plantas em condições de deficiência hídrica, sendo, porém, importante a realização de novos trabalhos para determinar custos, concentrações ideais de prolina e melhores épocas de aplicação em acordo com diferentes espécies de plantas.

3.7 Conclusão

As plantas transgênicas acumularam maior conteúdo de prolina sob deficiência hídrica e 48 h após a reidratação do que as selvagens, sendo isto ainda maior com a suplementação exógena desse aminoácido antes do início do estresse. Isto foi causado pelo aumento na expressão dos genes responsáveis pela biossíntese de prolina, principalmente *P5CS1*, e pela redução dos genes da via catabólica, especialmente *ProDH2*.

A aplicação de prolina exógena reduziu os efeitos negativos do déficit hídrico na atividade fotossintética e proporcionou maior acúmulo de biomassa em ambos os genótipos, sendo que as plantas transgênicas foram ainda menos afetadas e exibiram maior poder de recuperação por apresentarem maior CRA e eficiência no uso da água quando receberam a prolina exógena.

A prolina atuou como um mecanismo complementar/compensatório para as vias de dissipação de energia - válvula de malato e AOX, que foram menos utilizadas na deficiência hídrica pelo acúmulo deste aminoácido nas plantas. As enzimas NADP-MDH e AOX foram menos ativas nas plantas transgênicas com alto acúmulo endógeno de prolina do que nas selvagens, e a aplicação exógena de prolina reduziu ainda mais a expressão desses genes e a atividade de NADP-MDH.

4 CAPÍTULO 2

Efeitos da prolina no perfil ionômico foliar de plantas de tabaco submetidas à deficiência hídrica

RESUMO

A ionômica tem como objetivo quantificar os elementos minerais de um organismo e verificar como fatores fisiológicos, genéticos e ambientais, tais como o déficit hídrico, podem alterar essa composição elementar. A deficiência hídrica pode reduzir a absorção de nutrientes, sendo que a prolina, como mitigadora dos efeitos da seca, pode auxiliar na absorção e acúmulo de minerais em plantas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da prolina no perfil ionômico de plantas de tabaco selvagens e geneticamente modificadas para a superprodução de prolina submetidas a aplicações exógenas desse osmólito sob deficiência hídrica. O experimento foi realizado em casa de vegetação, utilizando um evento transgênico com expressão constitutiva do gene *VaP5CSF129A* e o controle não transformado (selvagem), duas doses de prolina: 0 e 10 mM e dois regimes hídricos: irrigado e deficiência hídrica. Aos trinta dias após o transplante das mudas para os vasos foram realizadas três aplicações foliares de prolina e três dias após a última aplicação a irrigação foi suspensa por nove dias. No nono dia de suspensão da irrigação foram coletadas folhas para determinação do conteúdo de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn. Os dados foram submetidos à análise de variância, clusterização hierárquica e componentes principais. Houve uma diferenciação de grupos em função da aplicação de prolina exógena, mostrando que este tratamento influenciou mais o perfil ionômico das plantas de tabaco do que os regimes hídricos. A análise multivariada do ionoma mostrou a separação dos elementos em cinco “clusters”, sendo que estes agrupamentos podem estar relacionados aos mecanismos de absorção e translocação que são afetados pela maior quantidade de prolina presente nas folhas. O K foi o nutriente em maior quantidade encontrado nas folhas do tabaco. Com poucas exceções, o conteúdo dos elementos minerais foi maior, nos dois regimes hídricos, quando a prolina foi aplicada adicionalmente. De maneira geral, os micronutrientes exibiram maior quantidade nas plantas transgênicas com alto acúmulo de prolina, com exceção do Fe, possivelmente pela competição com o Cu. Dessa maneira, nossos dados sugerem que a prolina pode atuar direta ou indiretamente, por seu efeito no aumento da tolerância ao estresse, como mitigadora das deficiências nutricionais causadas por condições de déficit hídrico no tabaco, principalmente se aplicada via foliar anteriormente ao início da deficiência hídrica.

Palavras-chave: Nutrientes. Aminoácidos. Estresse abiótico.

ABSTRACT

Effects of proline on the leaf ionic profile of tobacco plants subjected to water deficiency

Ionomics aims to quantify the mineral elements of an organism and verify how physiological, genetic and environmental factors, such as water deficit, can change this elementary composition. Water deficiency can reduce the absorption of nutrients, and proline, as an osmolyte having mitigating effects on drought, can assist in the absorption and accumulation of minerals in plants. In this context, the objective of this work was to evaluate the effect of proline on the ionic profile of wild and a genetically modified tobacco overproducing proline with additional exogenous applications of this osmolyte under water deficiency. The experiment was carried out in a greenhouse, using a transgenic event with constitutive expression of the *VaP5CSF129A* gene and the untransformed (wild) control, two exogenous proline concentrations: 0 and 10 mM and two water regimes: irrigated and water deficiency. Thirty days after transplanting the seedlings into pots, three foliar applications of proline were performed and irrigation was suspended three days after the last application for nine days. On the ninth day of suspension of irrigation, leaves were collected to determine the content of N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn and Zn. The data were submitted to analysis of variance, hierarchical clustering and principal components analysis. There was a clear differentiation of groups according to the application or not of exogenous proline, showing that this treatment, influenced the ionic profile of tobacco plants more than the water regimes. The multivariate analysis of the ionome showed the separation of the elements into five clusters, which may be related to the mechanisms of absorption and translocation that are affected by the greater amount of proline present in the leaves. K was the nutrient present in greatest amounts in tobacco leaves. With few exceptions, the content of the mineral elements was higher, in the two water regimes, when proline was additionally applied. In general, micronutrients were detected in greater amounts in transgenic plants, with the exception of Fe, possibly due to the competition with Cu. Thus, our data suggest that proline might act, directly, or indirectly by its effect on stress tolerance, as a mitigator of nutritional deficiencies caused by water deficit conditions in tobacco, mainly if applied prior to the onset of water deficiency.

Keywords: Nutrients. Amino acids. Abiotic stress.

4.1 Introdução

O ionoma pode ser definido como o conjunto de elementos minerais, incluindo elementos essenciais e não essenciais, metais e não metais em um organismo. Assim, ionômica é o estudo do ionoma, e tem como objetivo quantificar esses elementos e verificar como a fisiologia, a genética, o estágio de desenvolvimento e o ambiente podem alterar a composição do ionoma de células, tecidos e órgãos, incluindo os vegetais (PITA-BARBOSA; RICACHENEVSKY; FLIS, 2019).

Os nutrientes minerais são indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Os termos macro e micronutrientes são utilizados fazendo referência à necessidade de cada mineral para desempenhar seu papel no metabolismo vegetal, sendo que os macronutrientes são adquiridos em maior quantidade em relação aos micronutrientes (MORGAN; CONNOLLY, 2013). As plantas são organismos sésseis que precisam lidar com condições ambientais adversas e isso inclui mudanças nos fatores abióticos, como a disponibilidade de água. A deficiência hídrica reduz a taxa de difusão de nutrientes no solo em direção às raízes, a absorção pelas raízes e o transporte desses nutrientes devido, principalmente, a diminuições no fluxo de transpiração, transporte ativo e permeabilidade da membrana (ETIENNE *et al.*, 2018).

Também, em resposta ao déficit hídrico, as plantas sintetizam e acumulam alguns compostos que desempenham funções protetoras, além de auxiliar na manutenção do metabolismo vegetal, crescimento e desenvolvimento. Um exemplo é o aminoácido prolina, que atua como osmoprotetor, estabilizando estruturas celulares, enzimas, eliminando espécies reativas de oxigênio (EROS) e mantém o equilíbrio redox em situações adversas (MEENA *et al.*, 2019). A utilização de plantas transgênicas transformadas com genes que codificam enzimas chave da biossíntese de prolina podem acumular uma maior quantidade desse aminoácido e atenuar os efeitos do estresse (BORGIO; MARUR; VIEIRA, 2015). O aumento nos níveis de prolina e os seus benefícios para as plantas, inclusive a tolerância ao estresse, também tem sido demonstrado através da aplicação exógena desse aminoácido (HASANUZZAMAN *et al.*, 2014).

Já foi verificado que existe uma correlação positiva entre o acúmulo de prolina e o conteúdo de alguns elementos minerais (PER *et al.*, 2017). Além disso, a

aplicação exógena de prolina pode auxiliar na absorção e acúmulo de nutrientes em plantas submetidas a diferentes tipos de estresse, incluindo o déficit hídrico (ZOUARI *et al.*, 2019). Dessa forma, torna-se interessante analisar plantas com alto acúmulo endógeno de prolina e plantas submetidas à aplicação exógena deste aminoácido para aumentar o nosso entendimento sobre como a prolina influencia o conteúdo de elementos minerais em plantas sob condições de deficiência hídrica. A identificação de como a prolina em condições normais e de déficit hídrico regula a acumulação de íons nas folhas de uma planta modelo, como o tabaco, pode auxiliar o melhoramento de outras espécies que tiveram a introgressão do gene *P5CS* para aumentar a tolerância à seca.

4.2 Objetivo

Avaliar o efeito da prolina no perfil ionômico de plantas de tabaco selvagens e geneticamente modificadas para a superprodução endógena de prolina submetidas a aplicações exógenas desse osmólito sob deficiência hídrica.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação como descrito no Capítulo 1, Item 3.3 (3.3.1, 3.3.2, 3.3.3 e 3.3.4). Foi composto por dois materiais vegetais: um evento transgênico de tabaco (*Nicotiana tabacum*) com expressão constitutiva do gene *VaP5CSF129A* e o controle não transformado (selvagem), duas doses de prolina: 0 e 10 mM, e dois regimes hídricos: irrigado (condições normais de suprimento de água, mantendo o solo nos vasos com 100% da capacidade de campo) e suspensão da irrigação por nove dias (deficiência hídrica).

Nove dias após a suspensão da irrigação, quando o solo apresentou 20% de umidade em relação aos vasos irrigados, foi realizada a coleta do material vegetal para análise dos elementos minerais (três repetições por tratamento). Foram coletadas a quarta e quinta folha (do ápice para a base), sendo acondicionadas em sacos de papel para posterior secagem.

4.3.2 Análise de elementos minerais

Após a coleta, as folhas foram lavadas em água corrente e posteriormente em água deionizada. Em seguida, foram acondicionadas em sacos de papel e mantidas em estufa com circulação de ar a 60°C para secagem e, quando secos, o material foi macerado com auxílio de almofariz e pistilo. Foram determinados os conteúdos de 11 elementos minerais: nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn). Os conteúdos dos elementos foram determinados segundo metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), sendo que o N foi determinado em destilador pela transformação do N amoniacal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em amônia (NH_3); P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn pelo método de digestão nítrico-perclórica; e o B por colorimetria da azometina H. Os conteúdos dos elementos minerais foram expressos em miligramas por quilo de matéria seca (mg kgMS^{-1}).

4.3.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e, quando significativas, às médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Para uma melhor avaliação do efeito da prolina no ionoma de plantas selvagens e transgênicas submetidas à deficiência hídrica foram realizadas análises estatísticas multivariadas por meio da análise de clusterização hierárquica (*heatmap*) e análise de componentes principais (ACP). Para o *heatmap* foi utilizada a distância euclidiana e o método Ward, que identifica subgrupos homogêneos (DU *et al.*, 2020). Os conteúdos dos elementos minerais foram transformados em z-score para obter distribuição padrão antes da plotagem do *heatmap* no programa *ClustVis* (METSALU; VILO, 2015). A ACP foi realizada utilizando o programa *Paleontological Statistics (PAST)* v. 3.25.

4.4 Resultados

Com poucas exceções, o conteúdo dos elementos minerais nas folhas de tabaco foi maior com a aplicação de prolina exógena nos dois regimes hídricos

aplicados (Figura 17). A suplementação com este aminoácido aumentou o conteúdo de nitrogênio (N) em ambos os genótipos mantidos sob condições normais de irrigação e sob deficiência hídrica. Entretanto, não houve diferenças significativas entre os genótipos e entre os regimes hídricos dentro de cada condição de prolina (0 e 10 mM) (Figura 17A).

O conteúdo de P (fósforo) foi similar em ambos os genótipos, aproximadamente $3000 \text{ mg kgMS}^{-1}$, não mostrando nenhuma diferença estatística entre todos os tratamentos (Figura 17B).

O potássio (K) foi o macronutriente em maior quantidade encontrado nas folhas do tabaco (Figura 17C). Nas plantas selvagens que não receberam prolina exógena, o déficit hídrico aumentou em cerca de 37% o conteúdo desse nutriente em relação às plantas irrigadas, enquanto que nas transgênicas o déficit hídrico causou a redução do conteúdo de K, apresentando valor similar às plantas selvagens irrigadas (cerca de $30000 \text{ mg kgMS}^{-1}$). A aplicação de prolina exógena não acarretou diferenças significativas no teor de K em ambos os genótipos entre os regimes hídricos. No entanto, o genótipo transgênico com alto acúmulo endógeno de prolina exibiu incremento no conteúdo de K apenas sob deficiência hídrica, enquanto que as plantas selvagens irrigadas e estressadas aumentaram o K após a aplicação, mostrando os maiores valores encontrados para esse nutriente (50000 e $56500 \text{ mg kgMS}^{-1}$, respectivamente) (Figura 17C).

A deficiência hídrica não alterou o conteúdo de cálcio (Ca) nas plantas selvagens sem aplicação de prolina exógena em comparação com as plantas irrigadas (aproximadamente $20000 \text{ mg kgMS}^{-1}$) (Figura 17D). Já nas plantas transgênicas, a suspensão da irrigação por nove dias reduziu em 20% a quantidade desse nutriente, exibindo conteúdo similar às plantas selvagens que não receberam prolina. A suplementação exógena com esse aminoácido aumentou o Ca nas plantas selvagens em ambos os regimes hídricos, enquanto que nas transgênicas esse aumento foi somente observado nas plantas sob déficit hídrico (Figura 17D).

O conteúdo de magnésio (Mg) foi significativamente maior nas plantas selvagens sob deficiência hídrica e com aplicação de prolina exógena ($16600 \text{ mg kgMS}^{-1}$), enquanto que todos os outros tratamentos não exibiram diferenças estatísticas quanto ao teor deste nutriente nas folhas (Figura 17E).

O déficit hídrico aumentou o conteúdo de enxofre (S) nas folhas das plantas selvagens e esse conteúdo manteve-se semelhante após a aplicação de prolina,

tanto nas plantas irrigadas quanto nas estressadas (cerca de 5000 mg kgMS⁻¹) (Figura 17F). Conteúdo similar a este também foi verificado no genótipo transgênico quando não houve a suplementação com prolina. Entretanto, quando este aminoácido foi aplicado, o conteúdo de S nas plantas transgênicas irrigadas aumentou para 6770 mg kgMS⁻¹, sendo que com a imposição do déficit hídrico os teores de S foram similares aos observados nas plantas transgênicas que não receberam a aplicação de prolina exógena (Figura 17F).

Em relação aos micronutrientes, a suspensão da irrigação ocasionou um aumento equivalente no conteúdo de boro (B) (cerca de 140 mg kgMS⁻¹) nas plantas selvagens tanto no tratamento sem suplementação de prolina exógena quanto no com a aplicação de 10 mM desse aminoácido três dias antes do início do estresse (Figura 17G). Neste genótipo, a aplicação de prolina também aumentou o teor de B nas plantas irrigadas, porém em valor menor (112,50 mg kgMS⁻¹) que o observado nas plantas sob déficit hídrico, e similar ao observado nas plantas transgênicas sem a aplicação de prolina exógena. A pulverização de prolina nas plantas transgênicas irrigadas aumentou o conteúdo desse nutriente (162 mg kgMS⁻¹), sendo que a aplicação deste aminoácido não foi suficiente para manter este nível de B nas folhas dessas plantas na condição de deficiência hídrica (Figura 17G).

O conteúdo de cobre (Cu) nas folhas não foi influenciado pelo déficit hídrico no genótipo selvagem quando a prolina exógena não foi aplicada, sendo que as plantas irrigadas e estressadas apresentaram valores similares (cerca de 40 mg kgMS⁻¹) (Figura 17H). Ao contrário, as plantas transgênicas apresentaram menor quantidade desse nutriente após a imposição da deficiência hídrica em comparação com as mantidas sob irrigação. A suplementação de prolina exógena não apresentou efeito nas plantas selvagens sob déficit hídrico que exibiram conteúdo semelhante àquelas que não foram pulverizadas com esse aminoácido, enquanto que nas plantas irrigadas a quantidade desse nutriente foi significativamente reduzida (16,69 mg kgMS⁻¹). Já no genótipo transgênico, a aplicação de prolina proporcionou um aumento no conteúdo de Cu, sendo o maior valor observado nas plantas irrigadas (94,67 mg kgMS⁻¹) com uma queda ocasionada pela suspensão da irrigação (77,35 mg kgMS⁻¹) (Figura 17H).

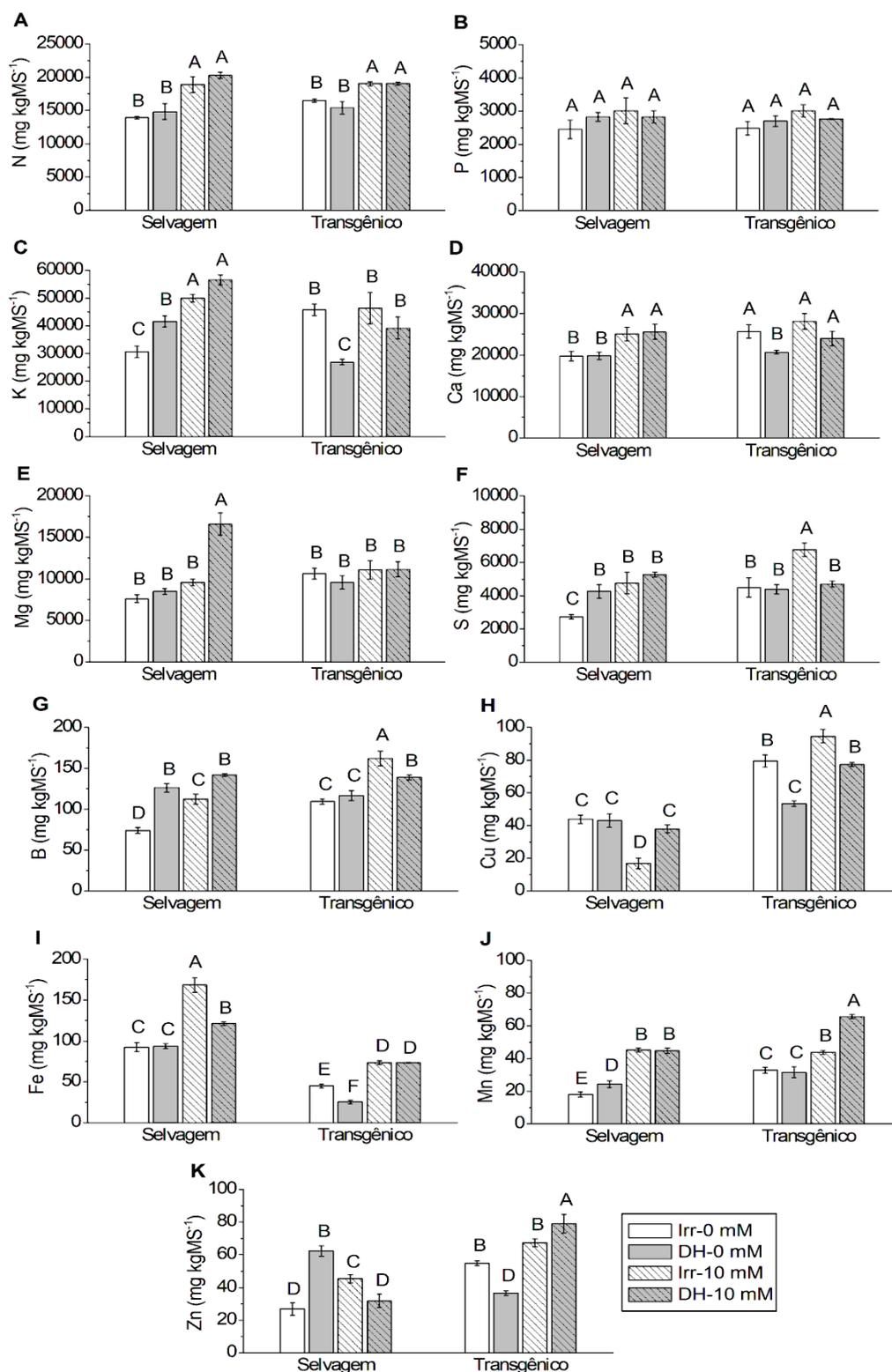
De maneira geral, o conteúdo de ferro (Fe) foi maior nas folhas das plantas selvagens (Figura 17I). Nessas plantas, o déficit hídrico não influenciou o teor desse nutriente quando não houve a suplementação com prolina; entretanto, a aplicação

deste aminoácido proporcionou um aumento no conteúdo de Fe, sendo este aumento mais notável nas plantas em condições normais de irrigação (168,53 mg kgMS⁻¹) em comparação com as plantas submetidas à deficiência hídrica (121,20 mg kgMS⁻¹). A aplicação de prolina exógena também aumentou, mas em menor proporção, o conteúdo desse nutriente nas folhas das plantas transgênicas, sendo que neste caso não foi observada diferença significativa entre os dois regimes hídricos aqui utilizados (Figura 17I).

A deficiência hídrica ocasionou um pequeno aumento no conteúdo de manganês (Mn) nas plantas selvagens quando não houve a aplicação de prolina exógena (Figura 17J). Com a suplementação deste aminoácido, foi observado um acréscimo nos teores de Mn, porém sem diferença significativa entre as plantas irrigadas e estressadas. Esse aumento proporcionado pela adição de prolina exógena também foi observado no genótipo transgênico, sendo que as plantas sob déficit hídrico exibiram o maior conteúdo de Mn (65,70 mg kgMS⁻¹) (Figura 17J).

A suspensão da irrigação nas plantas selvagens acarretou o aumento do conteúdo de zinco (Zn) somente quando estas não foram pulverizadas com 10 mM de prolina, enquanto que nas plantas transgênicas este mesmo tratamento causou uma redução no teor deste micronutriente. Com a aplicação de prolina exógena, houve um aumento no nível de Zn nas plantas transgênicas, sendo que o maior conteúdo desse nutriente (80 mg kgMS⁻¹) foi detectado no tratamento com déficit hídrico (Figura 17K).

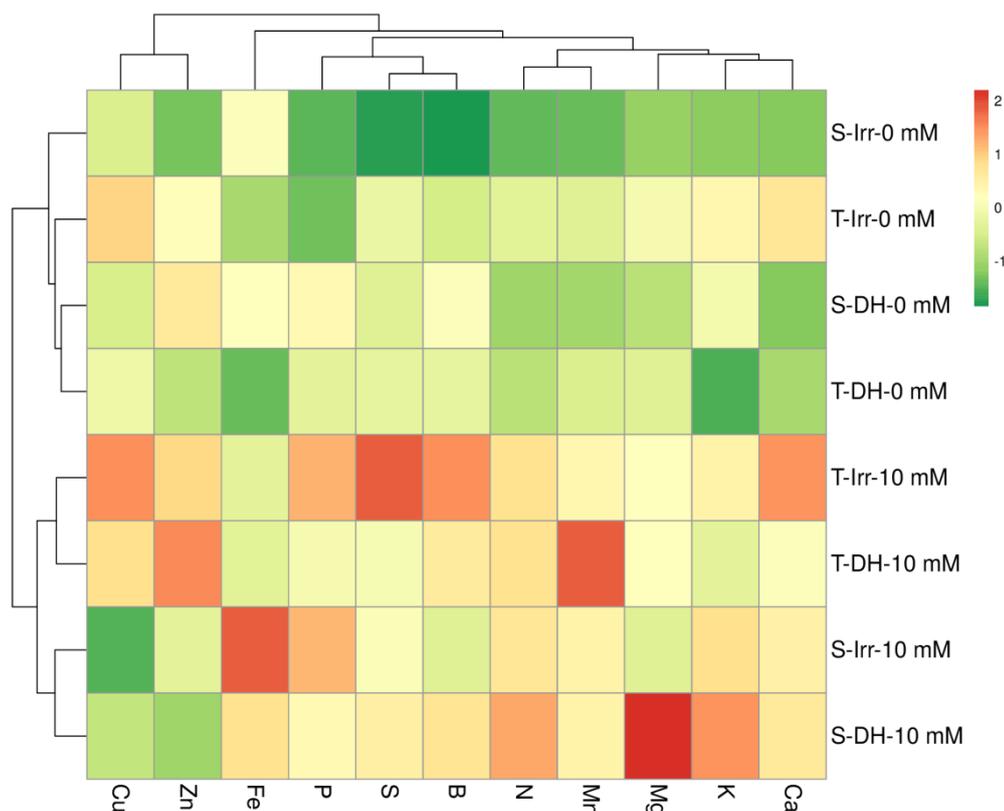
Figura 17 - Conteúdo dos elementos minerais nas folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



A) N (Nitrogênio), B) P (Fósforo), C) K (Potássio), D) Ca (Cálcio), E) Mg (Magnésio), F) S (Enxofre), G) B (Boro), H) Cu (Cobre), I) Fe (Ferro), J) Mn (Manganês), K) Zn (Zinco). Barras com letras distintas indicam diferença estatística entre as médias dos tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barra de erros indica o erro padrão da média ($n=3$). Valores expressos em mg kgMS^{-1} .

As respostas das plantas de tabaco caracterizadas por análise de clusterização hierárquica, apresentada como *heatmap*, mostraram que os tratamentos (linhas) foram separados em dois grandes grupos principais de ionoma (Figura 18). A cor vermelha indica as amostras com maior conteúdo do elemento e a cor verde indica amostras com menor conteúdo do nutriente correspondente. O grupo 1 é formado pelas plantas que receberam aplicação de prolina exógena e o grupo 2 contém as plantas que não receberam suplementação com esse aminoácido, sendo que, de modo geral, as folhas de tabaco mostraram maior quantidade dos elementos analisados quando foram suplementadas com prolina exógena antes do início do estresse em comparação com as que não receberam a adição deste aminoácido. Analisando os elementos (colunas), observa-se a formação de quatro “clusters”: 1. Ca, K e Mg; 2. Mn e N; 3. B, S e P; 4. Zn e Cu, 5. Fe, em uma posição específica e separada dos demais elementos.

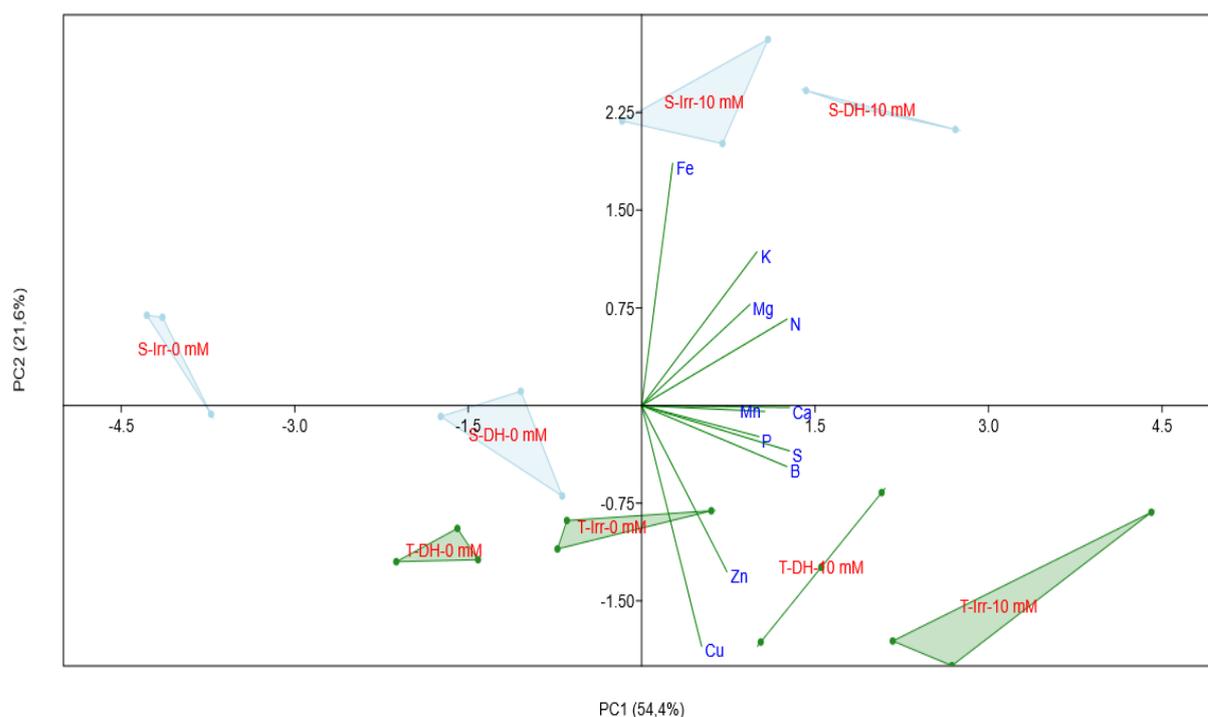
Figura 18 - *Heatmap* dos elementos minerais nas folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



N (Nitrogênio), P (Fósforo), K (Potássio), Ca (Cálcio), Mg (Magnésio), S (Enxofre), B (Boro), Cu (Cobre), Fe (Ferro), Mn (Manganês), Zn (Zinco). Cor vermelha representa tratamentos (linhas) com alto conteúdo do elemento correspondente em cada coluna; e verde representa baixo conteúdo.

A análise de componentes principais (ACP) explicou 76% da variação total dos dados originais (Figura 19). O PC1 e PC2 explicaram 54,4% e 21,6% da variância, respectivamente, sendo que os elementos que influenciaram para a diferenciação dos grupos em PC1 foram S (0,379), Ca (0,379), N (0,373) e B (0,372), e em PC2 foram Fe (0,552), Cu (-0,548), Zn (-0,378) e K (0,350), de acordo com os respectivos valores de “loading”. Pode-se observar que houve uma separação mais evidente nos íons das amostras sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM) em comparação aos genótipos. As amostras que receberam a aplicação de prolina exógena foram localizadas no eixo positivo do PC1 devido ao “loading” positivo de todos os elementos analisados. Dentre os quatro tratamentos com a adição de prolina, estes foram divididos entre os genótipos selvagem e transgênico principalmente pelo “loading” positivo do Fe e K, e negativo de Cu e Zn no PC2.

Figura 19 - Análise de componentes principais (ACP) dos elementos minerais nas folhas de dois genótipos de tabaco (selvagem e transgênico) submetidos a diferentes regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) sem e com aplicação de prolina (0 e 10 mM).



4.5 Discussão

A absorção de elementos minerais é um processo fundamental para as plantas sobreviverem e crescerem. Entretanto, vários estresses abióticos resultam em menor absorção de nutrientes e, conseqüentemente, menor conteúdo nos tecidos das plantas. O acúmulo de prolina em plantas é um importante mecanismo para minimizar os efeitos dos estresses abióticos, tendo já sido demonstrado que a suplementação exógena deste aminoácido pode melhorar a absorção e acúmulo de nutrientes em plantas estressadas (ZOUARI *et al.*, 2019).

Nossos dados mostraram que a aplicação de prolina exógena aumentou o conteúdo de nitrogênio (N) nas folhas das plantas de ambos os genótipos de tabaco irrigadas e sob deficiência hídrica (Figura 17A). Estudos relatam que o acúmulo de prolina está relacionado a conteúdos elevados de N, minimizando os efeitos dos diferentes tipos de estresse (SÁNCHEZ *et al.*, 2001; DÍAZ *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2011). Como o N é um constituinte da prolina, ambos estão diretamente ligados no metabolismo das plantas (IQBAL *et al.*, 2014). Em beterraba sacarina (*Beta vulgaris*) houve uma correlação positiva entre o acúmulo de prolina e a absorção de N para as plantas sob deficiência hídrica (MONREAL *et al.*, 2007). Em plantas de *Medicago truncatula* transformadas com o gene *VaP5CSF129A*, mesmo gene usado no genótipo transgênico de tabaco utilizado neste estudo, foi verificado alto acúmulo de prolina e fixação de N em comparação com as plantas selvagens e foram menos afetadas pela salinidade (ARMENGAUD *et al.*, 2004). Essa relação entre N e prolina pode ser explicada pelo fato de que a oxidação da prolina fornece grande quantidade de energia para fixação desse nutriente pelas raízes em leguminosas (VERDOY *et al.*, 2006). Além disso, a aplicação de prolina exógena pode resultar em maior degradação desse aminoácido gerando o glutamato, que é um dos aminoácidos fundamentais para a via de assimilação de N (PER *et al.*, 2017).

O fósforo (P) é um elemento essencial que tem papel na transferência de energia, respiração e fotossíntese, porém apresenta baixa mobilidade no solo, o que dificulta seu transporte até o sistema radicular. No entanto, são escassos os estudos sobre a relação do P com a prolina em plantas (PER *et al.*, 2017). Neste trabalho, observou-se a similaridade do conteúdo de P nos dois genótipos, sendo que tanto os regimes hídricos quanto as aplicações de prolina não tiveram grande efeito na absorção e translocação deste nutriente para as folhas de tabaco (Figura 17B).

Já o potássio (K) foi o nutriente encontrado em maior quantidade nas folhas das plantas de ambos os genótipos (Figura 17C). Nas plantas selvagens sem suplementação com prolina, o déficit hídrico aumentou o conteúdo desse nutriente (Figura 17C). Conforme já demonstrado, o K desempenha um papel importante na regulação do potencial osmótico das células vegetais, regulando a abertura estomática, na ativação de enzimas envolvidas na respiração e fotossíntese, e no alívio dos danos oxidativos induzidos pela seca (HURTADO-SALAZAR *et al.*, 2017; ETIENNE *et al.*, 2018). Durante o estresse, um potencial de membrana mais negativo reduz a força motriz e facilita a absorção de K, permitindo que as plantas retenham esse elemento mineral no citosol (BOSE *et al.*, 2013). A pulverização de prolina exógena ocasionou um incremento ainda maior no conteúdo de K nas plantas selvagens, tanto nas mantidas irrigadas como nas submetidas à deficiência hídrica (Figura 17C). Em oliveiras sob estresse salino, a aplicação de 50 mM de prolina aumentou a absorção de K (BEN AHMED *et al.*, 2011). Estes autores propõem que a prolina melhorou a capacidade das plantas quanto à seletividade entre nutrientes essenciais e outros íons menos necessários para o seu metabolismo ou potencialmente tóxicos, o que também pode ocorrer em condições de déficit hídrico. Além disso, a prolina pode reduzir significativamente o efluxo de K da célula e regular a homeostase iônica pelo aumento da atividade da ATPase (CUIN; SHABALA, 2007). É interessante notar que as plantas transgênicas apresentaram menores conteúdos de K em relação às selvagens com a suspensão da irrigação, mesmo quando receberam aplicação adicional de prolina (Figura 17C). Neste caso, é possível que o efeito osmoprotetor deste aminoácido em condições de déficit hídrico diminuiu a necessidade de K para a manutenção do potencial hídrico nas plantas que já possuíam um alto nível de prolina endógena pelo efeito da inserção do transgene.

A aplicação de prolina exógena aumentou o conteúdo de cálcio (Ca) nas plantas do genótipo selvagem de maneira similar em ambos os regimes hídricos e nas transgênicas sob déficit hídrico (Figura 17D). Os íons de Ca têm uma forte influência na produção de biomassa das culturas, pois estão envolvidos no desenvolvimento da parede celular, das membranas e no crescimento celular (LISUMA; MBEGA; NDAKIDEMI, 2020). Como a prolina atua na manutenção da integridade das membranas (ALI; BANO; FAZAL, 2017) e o Ca é um componente da membrana celular, a prolina exógena pode ter influenciado na absorção deste

nutriente a fim de manter a estrutura das células, evitando assim possíveis danos causados pelo déficit hídrico. É importante mencionar que as plantas que receberam pulverização com prolina que exibiram maior conteúdo de Ca, também foram as que apresentaram maior teor de N (Figura 17A), o que pode ter sido devido à influência positiva do Ca na captação de N e na ativação de enzimas associadas com assimilação de N e compostos nitrogenados, como é o caso da prolina (LÓPEZ-LEFEBRE *et al.*, 2001).

A aplicação exógena de prolina aumentou o conteúdo de magnésio (Mg) apenas nas plantas selvagens estressadas (Figura 17E). O Mg é um componente da molécula de clorofila e cofator de enzimas associadas com a fotossíntese e a respiração (LISUMA; MBEGA; NDAKIDEMI, 2020). Por serem processos essenciais à sobrevivência das plantas e altamente afetados pela deficiência hídrica, a prolina pode ter auxiliado na proteção contra EROS geradas pelo estresse, e conseqüentemente, em uma menor degradação da clorofila e menor remobilização para outros órgãos. Além disso, o processo de absorção do Mg pode ocorrer de duas formas: passiva e ativa, sendo que esta última é auxiliada por transportadores e necessita de energia (WANG *et al.*, 2020). O catabolismo da prolina gera grande quantidade de energia em forma de ATP (ATKINSON, 1977) e, com isso, o maior catabolismo desse aminoácido ocasionado pela aplicação exógena pode ter aumentado a absorção deste elemento pela via ativa em condições de déficit hídrico. Já nas plantas transgênicas, a suplementação com prolina não apresentou efeito no aumento do conteúdo de Mg (Figura 17E), possivelmente devido à combinação da biossíntese constitutiva e da conseqüente maior degradação da prolina.

As plantas selvagens que não receberam aplicação de prolina exibiram um incremento na quantidade de enxofre (S) sob déficit hídrico (Figura 17F). Como o S é um elemento essencial para o crescimento (LISUMA; MBEGA; NDAKIDEMI, 2020), o seu aumento nas folhas pode ser atribuído à inibição da sua exportação das folhas em direção aos tecidos apicais devido a uma redução no crescimento dos tecidos ocasionado pela deficiência hídrica (SARDANS; PEÑUELAS; OGAYA, 2008). A prolina exógena apresentou efeito no aumento do conteúdo de S apenas nas plantas transgênicas irrigadas (Figura 17F). O S tem um papel significativo no equilíbrio do conteúdo de osmólitos (RIFFAT; AHMAD, 2018). Como essas plantas já acumularam maior quantidade de prolina endógena, esse elemento pode ter desempenhado essa função, já que por terem sido cultivadas em condições normais

de irrigação a necessidade de biossíntese de prolina pelo gene nativo tornou-se menor.

Há relatos sobre o papel dos macronutrientes na tolerância a estresses abióticos, mas faltam informações com relação aos micronutrientes (PER *et al.*, 2017). Devido às menores quantidades necessárias desses elementos para a manutenção da fisiologia das plantas em comparação com os macronutrientes, os efeitos da seca na absorção dos micronutrientes são menos estudados (SILVA *et al.*, 2010). De maneira geral, os micronutrientes estão envolvidos na mudança na atividade de enzimas e produção de metabólitos envolvidos nas respostas das plantas ao ambiente (HAJIBOLAND, 2012).

O boro (B) atua como um elemento estrutural, juntamente com cálcio, para a formação das paredes celulares e manutenção da integridade das membranas (SILVA *et al.*, 2010) através da sua ação contra o estresse oxidativo e no ajustamento osmótico (MARSCHNER, 2012). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram um aumento no conteúdo de B nas plantas do genótipo selvagem quando suplementadas com prolina em relação ao controle irrigado (Figura 17G); entretanto, o déficit hídrico mostrou-se como o fator mais importante em plantas deste genótipo, pois o uso de prolina exógena não foi capaz de aumentar o nível deste elemento em plantas submetidas a esse estresse. Nas plantas transgênicas, a aplicação de prolina aumentou o conteúdo de B, principalmente nas plantas em condições normais de irrigação (Figura 17G). Esse fato pode estar relacionado à função do B na promoção da síntese de enzimas que atuam na assimilação de N, sendo que os produtos finais da assimilação de N são principalmente os aminoácidos e proteínas (RUIZ *et al.*, 1998).

O cobre (Cu), o ferro (Fe), o manganês (Mn) e o zinco (Zn) estão fortemente ligados à produção e eliminação de EROS, pois atuam na transdução de sinais mediante os diversos tipos de estresses ambientais e na modulação da atividade das enzimas antioxidantes (cofatores) (HAJIBOLAND, 2012). Por exemplo, em plantas, a superóxido dismutase (SOD), uma das principais enzimas antioxidantes que catalisa a conversão do ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido (H_2O_2), existe em três formas que são classificadas pelo metal em seus centros redox: Mn (Mn-SOD), Fe (Fe-SOD) ou Cu/Zn (CuZn-SOD). Além disso, a deficiência desses micronutrientes podem afetar outros fatores fisiológicos, como

transporte de elétrons, relações hídricas e trocas gasosas que podem influenciar no metabolismo de EROS (HAJIBOLAND, 2012).

O conteúdo de Cu nas plantas selvagens foi menor apenas nas folhas das plantas que foram mantidas irrigadas e com suplementação com prolina. Enquanto que, de modo geral, as plantas transgênicas apresentaram maior conteúdo de Cu em comparação com as selvagens, com exceção das plantas em deficiência hídrica sem aplicação de prolina, que mostraram valores similares às selvagens no mesmo tratamento (Figura 17H). O Cu é um elemento mineral ligado à redução do estresse oxidativo principalmente nos cloroplastos, onde são encontradas em duas grandes proteínas: a plastocianina e CuZn-SOD (HAJIBOLAND, 2012). A absorção deste elemento pela raiz ocorre predominantemente como Cu (I) com oxidação a Cu (II) necessária para o carregamento do xilema (RYAN *et al.*, 2013). Sendo assim, como a absorção e translocação de Cu são conduzidas por processos redox, a prolina pode estar envolvida neste mecanismo através da sua ação moduladora do balanço redox intracelular. Ainda, White, Chaney e Decker (1981) mostraram que o Cu deve ser ligado a aminoácidos, principalmente a asparagina, glutamina e histidina, dependendo da espécie de plantas, para que seja translocado. Dessa forma a prolina, sendo um aminoácido, pode também favorecer o acúmulo deste micronutriente nas plantas.

As plantas selvagens apresentaram maior conteúdo de Fe do que as transgênicas em todos os tratamentos, sendo isto ainda mais expressivo quando a prolina exógena foi utilizada, independentemente do regime hídrico aplicado (Figura 17I). A aplicação de prolina exógena pode elevar o teor de Fe para prevenir o desenvolvimento de clorose nas folhas, principalmente em situações de estresse (STETSENKO *et al.*, 2011), sendo que uma das principais funções desse elemento é o seu envolvimento na produção de clorofila (AHANGER *et al.*, 2016), mais precisamente na ativação de enzimas da biossíntese desse pigmento (GHAFOR *et al.*, 2019). Dessa forma, o alto acúmulo de prolina nas folhas, ainda mais notável nas plantas sob estresse, pode ter refletido a absorção e/ou transporte de Fe, sendo este fato menos significativo nas plantas transgênicas. Também, os dados aqui apresentados mostram a já conhecida competitividade entre Fe e Cu, onde este último elemento inibe a absorção de Fe (RYAN *et al.*, 2013), o que pode ser observado pelo maior conteúdo relativo de Cu nas plantas transgênicas (Figura 17H).

As plantas selvagens sem pulverização de prolina aumentaram o conteúdo de Mn ao serem submetidas ao déficit hídrico e esse aumento foi ainda maior com a aplicação do aminoácido, sendo este efeito também verificado nas plantas transgênicas (Figura 17J). Em *Arabidopsis thaliana*, a deficiência hídrica aumentou o conteúdo foliar de Mn, e os autores relacionaram esse resultado a uma necessidade maior da enzima Mn-SOD que está envolvida na eliminação de EROS induzida pelo estresse hídrico (ACOSTA-GAMBOA *et al.*, 2016). Além disso, o Mn é um componente essencial do fotossistema II (HAJIBOLAND, 2012), e a prolina pode ter auxiliado no aumento da quantidade disponível de Mn para a manutenção da eficiência do aparato fotossintético.

Quando não houve suplementação com prolina, a deficiência hídrica aumentou o conteúdo de Zn nas plantas selvagens e, de modo oposto, reduziu nas transgênicas (Figura 17K). O Zn atua na atividade antioxidante por ser cofator da enzima SOD (BLASCO; GRAHAM; BROADLEY, 2015); portanto, plantas com atividade reduzida dessa enzima devido deficiência de Zn são mais sensíveis a fatores de estresse oxidativo, incluindo o déficit hídrico (KARIM, RAHMAN, 2015). Dessa forma, para auxiliar na manutenção do sistema antioxidante, pode ter ocorrido o aumento no conteúdo de Zn nas plantas selvagens estressadas, enquanto que a observada redução deste elemento na parte aérea das plantas transgênicas pode estar relacionada à menor geração de EROS, e conseqüente menor necessidade de Zn em função do alto acúmulo endógeno de prolina nessas plantas. Entretanto, quando a prolina exógena foi aplicada ocorreu o contrário, o conteúdo de Zn nas plantas selvagens foi reduzido e aumentou nas transgênicas sob déficit hídrico (Figura 17K). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que o Fe e o Zn competem pelos locais de ligação a proteínas e fosfolipídios na membrana das células e interferem na absorção um do outro (BRAY; BETTGER, 1990). Essa relação negativa pode ser observada quando houve aplicação de prolina, onde o conteúdo de Zn foi reduzido nas plantas selvagens enquanto o Fe aumentou, e nas plantas transgênicas a quantidade de Zn foi maior ao passo que a absorção de Fe foi menor.

Para ter uma melhor descrição do efeito das aplicações de prolina no ionoma de plantas de tabaco selvagens e transgênicas submetidas ao déficit hídrico, foram realizadas análises de clusterização (*heatmap*) e ACP. Estas duas análises mostraram resultados semelhantes quanto à diferenciação de grupos em função dos

tratamentos sem e com aplicação de prolina exógena (0 e 10 mM) (Figuras 18, 19). Quando houve aplicação desse aminoácido, a ACP exibiu uma separação ainda mais evidente entre os genótipos selvagem e transgênico, mostrando que a prolina exógena foi o tratamento que, de maneira geral, influenciou mais o perfil ionômico das plantas de tabaco do que os regimes hídricos (irrigado e deficiência hídrica) (Figura 19). A separação dos grupos ocorreu de forma que as plantas de ambos os genótipos tratadas com prolina exibiram maiores conteúdos de nutrientes e as plantas que não foram pulverizadas com o aminoácido mostraram as menores quantidades dos elementos minerais analisados, principalmente as plantas selvagens irrigadas (S-Irr-0 mM). As plantas submetidas a este tratamento apresentaram, de modo geral, menores quantidades relativas dos elementos minerais (Figura 18). Uma notável exceção foi o Fe, cujos menores conteúdos foram verificados nas plantas transgênicas, possivelmente devido à competição com o Cu que apresentou maiores conteúdos relativos nesse genótipo (Figuras 17H, 17I). Isso também pode ser verificado pela separação do grupo Cu/Zn pela alta quantidade destes elementos nas plantas transgênicas irrigadas e sob deficiência hídrica, ambas com suplementação de prolina exógena (T-Irr-10 mM e T-DH-10 mM) (Figura 18). Esses três micronutrientes (Fe, Cu e Zn) também foram os principais responsáveis pela diferenciação dos grupos em PC2 (Figura 19). Os macronutrientes Ca, K e Mg constituíram um grupo isolado principalmente devido à baixa quantidade desses elementos em S-Irr-0 mM em oposição ao mais alto conteúdo relativo nas plantas selvagens estressadas com prolina exógena (S-DH-10 mM) (Figura 18). Estes dados parecem indicar a necessidade de mais estudos na interação entre o acúmulo de K e a suplementação de prolina exógena em plantas selvagens em situação de déficit hídrico, já que essas plantas não acumularam alta quantidade de prolina endógena como as transgênicas. A baixa quantidade de B, S e P no tratamento S-Irr-0 mM em contraste com o maior conteúdo destes nas folhas das plantas transgênicas quando a prolina foi aplicada ocasionou o agrupamento destes elementos (Figura 18). Coincidentemente, estes elementos participam conjuntamente da estruturação e síntese da parede celular (CAKMAK; RÖMHELD, 1997; DUPAS, 2012; FERNANDES; GOULAO; AMÂNCIO, 2016), sendo, ainda, que proteínas ricas em prolina e hidroxiprolina estão envolvidas na ligação com borato nas paredes celulares primárias (BONILLA *et al.*, 1997). Da mesma forma, a menor quantidade dos elementos N e Mn nas folhas das plantas de tabaco que não

receberam adição de prolina em comparação com aquelas que receberam a suplementação deste aminoácido ocasionou a formação de um grupo isolado (Figura 18). Este agrupamento pode refletir o conhecido papel do Mn no metabolismo do N, particularmente na síntese de proteínas e aminoácidos (EBEID; KUTÁCEK, 1979), e no aumento da assimilação de nitrato (BLOOM; KAMERITSCH, 2017).

Finalmente, como a tolerância moderada a estresses abióticos pode estar relacionada à manutenção das concentrações de elementos minerais nos tecidos das plantas (HURTADO-SALAZAR *et al.*, 2017), nossos dados apontam que a prolina, além do seu já reconhecido papel como osmoprotetor, atuando na manutenção de estruturas celulares, enzimas, redução da geração de EROS, equilíbrio redox e crescimento, pode ter contribuído, de modo direto ou indireto, para aumentar a tolerância de plantas de tabaco ao déficit hídrico pelo aumento dos conteúdos dos macros e micronutrientes. Estas informações inéditas geradas neste trabalho poderão servir como base para estudos mais aprofundados do papel da prolina na absorção, transporte e armazenamento de nutrientes.

4.6 Conclusão

A aplicação exógena de prolina apresentou efeito positivo aumentando o conteúdo dos elementos minerais em plantas de tabaco selvagens e transgênicas irrigadas e submetidas à deficiência hídrica, sendo o efeito do déficit hídrico menos evidente. De maneira geral, os micronutrientes (B, Cu, Mn e Zn) exibiram maior quantidade nas plantas transgênicas, com exceção do Fe, possivelmente pela competição com o Cu, o que indica que estes elementos estão direta ou indiretamente envolvidos nos processos bioquímicos que controlam a biossíntese e/ou catabolismo da prolina. Como o déficit hídrico afeta a absorção e o transporte de nutrientes, nossos dados sugerem que a prolina pode atuar como mitigador das deficiências nutricionais causadas por esse estresse abiótico.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-GAMBOA, L. M. *et al.* Moderate to severe water limitation differentially affects the phenome and ionome of *Arabidopsis*. **Functional Plant Biology**, v. 44, n. 1, p. 94-106, oct. 2016.
- AGAMI, R. A. *et al.* Exogenous application with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) or proline induces stress tolerance in basil plants (*Ocimum basilicum* L.) exposed to water stress. **International Journal of Environmental and Agriculture**, v. 2, n. 5, p. 78-92, may 2016.
- AGGARWAL, M. *et al.* Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimising oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Biological Trace Element Research**, v. 140, n. 3, p. 354-367, jun. 2011.
- AHANGER, M. A. *et al.* Plant growth under drought stress: Significance of mineral nutrientes. *In*: AHMAD, P. **Water stress and crop plants: a sustainable approach**. 1 ed. New Jersey: Wiley, 2016. v. 2, p. 649-668.
- ALI, F.; BANO, A.; FAZAL, A. Recent methods of drought stress tolerance in plants. **Plant Growth Regulation**, v. 82, n. 3, p. 363-375, jul. 2017.
- ALI, Q. *et al.* Ameliorating effects of exogenously applied proline on seed composition, seed oil quality and oil antioxidant activity of maize (*Zea mays* L.) under drought stress. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, n. 1, p. 818-835, jan. 2013.
- AN, Y. *et al.* Proline accumulation in leaves of *Periploca sepium* via both biosynthesis up-regulation and transport during recovery from severe drought. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-10, jul. 2013.
- ANJUM, N. A.; LOPEZ-LAURI, F. Plant nutrition and abiotic stress tolerance III. **Plant tress**, v. 5, n. 1, 2011.
- ARAÚJO, W. L.; NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R. On the role of plant mitochondrial metabolism and its impact on photosynthesis in both optimal and sub-optimal growth conditions. **Photosynthesis Research**, v. 119, n. 1-2, p. 141-146, feb. 2014.
- ARDINI, F. *et al.* Iomic profiling of *Nicotiana langsdorffii* wild-type and mutant genotypes exposed to abiotic stresses. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 665-677, 2013.
- ARMENGAUD, P. *et al.* Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. **Physiologia Plantarum**, v. 120, n. 3, p. 442-450, Mar. 2004.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1-15, jan. 1949.

ATKINSON, D. E. **Cellular energy metabolism and its regulation**. New York: Academic Press, 1977. 306 p.

BANDURSKA, H. *et al.* Regulation of proline biosynthesis and resistance to drought stress in two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes of different origin. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 427-437, sep. 2017.

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.

BEN AHMED, C. *et al.* Exogenous proline effects on water relations and ions contents in leaves and roots of young olive. **Amino Acids**, v. 40, n. 2, p. 565-573, feb. 2011.

BERGER, J.; PALTA, J.; VADEZ, V. An integrated framework for crop adaptation to dry environments: Responses to transient and terminal drought. **Plant Science**, v. 253, p. 58-67, dec. 2016.

BHARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. **Plant Breeding**, v. 132, n. 1, p. 21-32, feb. 2013.

BIANCUCCI, M. *et al.* Proline affects the size of the root meristematic zone in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 263, p.1-14, oct. 2015.

BLASCO, B.; GRAHAM, N.S.; BROADLEY, M. R. Antioxidant response and carboxylate metabolism in *Brassica rapa* exposed to different external Zn, Ca, and Mg supply. **Journal of Plant Physiology**, v. 176, p. 16-24, mar. 2015.

BLOOM, A. J.; KAMERITSCH, P. Relative association of Rubisco with manganese and magnesium as a regulatory mechanism in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 161, n. 4, p. 545-559, Dec. 2017.

BONILLA, C. *et al.* The aberrant cell walls of boron-deficient bean root nodules have no covalently bound hydroxyproline-/proline-rich proteins. **Plant Physiology**, v. 115, n. 4, p. 1329-1340, dec. 1997.

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**, v. 37, n. 2, p. 191-199, apr./jun. 2015.

BOSE, J. *et al.* Haem oxygenase modifies salinity tolerance in *Arabidopsis* by controlling K⁺ retention via regulation of the plasma membrane H⁺-ATPase and by altering *SOS1* transcript levels in roots. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 2, p. 471-481, jan. 2013.

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.

BRAY, T. M.; BETTGER, W. J. The physiological role of zinc as an antioxidant. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 281-291, 1990.

BROWN, N. J. *et al.* C₄ acid decarboxylases required for C₄ photosynthesis are active in the mid-vein of the C₃ species *Arabidopsis thaliana*, and are important in sugar and amino acid metabolism. **The Plant Journal**, v. 61, n. 1, p. 122-133, jan. 2010.

CAKMAK, I.; RÖMHELD, V. Boron efficiency induced impairments of cellular functions in plants. **Plant and Soil**, v. 193, n. 1/2, p. 71-83, 1997.

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, sep. 2011.

CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A. Maize transformation to obtain plants tolerant to viruses by RNAi technology. *In*: ALVAREZ, M. A. **Genetic transformation**. Istanbul: INTECH (Open access publisher), v. 1, 340 p., 2011.

CARVALHO, K. *et al.* The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic 'Swingle' citrumelo. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 4, p. 3269-3279, apr. 2013.

CHEN, J. B. *et al.* Two *P5CS* genes from common bean exhibiting different tolerance to salt stress in transgenic *Arabidopsis*. **Journal of Genetics**, v. 92, n. 3, p. 461-469, dec. 2013.

CLIFTON, R.; MILLAR, A. H.; WHELAN, J. Alternative oxidases in *Arabidopsis*: A comparative analysis of differential expression in the gene family provides new insights into function of non-phosphorylating bypasses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, n. 7, p. 730-741, jul. 2006.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 5, p. 187-188, May 2000.

CUI, M. *et al.* Ethylene increases accumulation of compatible solutes and decreases oxidative stress to improve plant tolerance to water stress in *Arabidopsis*. **Journal of Plant Biology**, v. 58, n. 3, p. 193-201, jun. 2015.

CUIN, T. A.; SHABALA, S. Amino acids regulate salinity-induced potassium efflux in barley root epidermis. **Planta**, v. 225, n. 3, p. 753-761, feb. 2007.

CVIKROVÁ, M. *et al.* Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 7-15, dec. 2013.

DAHAL, K.; MARTYN, G. D.; VANLERBERGHE, G. C. Improved photosynthetic performance during severe drought in *Nicotiana tabacum* overexpressing a

nonenergy conserving respiratory electron sink. **New Phytologist**, v. 208, n. 2, p. 382-395, oct. 2015.

DALASTRA, G. M. *et al.* Trocas gasosas e produtividade de três cultivares de meloeiro conduzidas com um e dois frutos por planta. **Bragantia**, v. 73, n. 4, p. 365-371, out./dez. 2014.

DEUSCHLE, K. *et al.* The role of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. **Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3413-3425, dec. 2004.

DHINGRA, A. *et al.* Transgenic plantation crops, ornamentals and turf grasses. *In*: KOLE, C.; HALL, T. C. **Compendium of transgenic crop plants**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2009. 2776 p.

DÍAZ, P. *et al.* Osmotically induced proline accumulation in *Lotus corniculatus* leaves is affected by light and nitrogen source. **Plant Growth Regulation**, v. 46, n. 3, p. 223-232, jul. 2005.

DIETZ, K.-J.; PFANNSCHMIDT, T. Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. **Plant Physiology**, v. 155, p. 1477-1485, apr. 2011.

DINAKAR, C. *et al.* Alternative oxidase pathway optimizes photosynthesis during osmotic and temperature stress by regulating cellular ROS, malate valve and antioxidative systems. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 68, p. 1-17, feb. 2016.

DINAKAR, C.; RAGHAVENDRA, A. S.; PADMASREE, K. Importance of AOX pathway in optimizing photosynthesis under high light stress: role of pyruvate and malate in activating AOX. **Physiologia Plantarum**, v. 139, n. 1, p. 13-26, may 2010.

DOBRÁ, J. *et al.* Tobacco leaves and roots differ in the expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 13, p. 1588-1597, sep. 2011.

DU, F. *et al.* Ionic responses of rice plants to the stresses of different arsenic species in hydroponics. **Chemosphere**, v. 243, p. 1-9, mar. 2020.

DUPAS, E. **Nitrogênio, potássio e boro: aspectos produtivos, morfológicos, nutricionais e frações fibrosas e proteicas do capim-tanzânia**. 2012. 89 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

EBEID, M. M.; KUTÁČEK, M. The effect of manganese and EDTA on the balance of nitrogen in maize xylem exudate. **Biologia Plantarum**, v. 21, n. 3, p. 170-177, 1979.

EREL, R. *et al.* Modification of non-stomatal limitation and photoprotection due to K and Na nutrition of olive trees. **Journal of Plant Physiology**, v. 177, p. 1-10, apr. 2015.

ETIENNE, P. *et al.* Macro and micronutrient storage in plants and their remobilization when facing scarcity: The case of drought. **Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 1-14, jan. 2018.

FAROOQ, M. *et al.* Improving resistance against terminal drought in bread wheat by exogenous application of proline and gamma-aminobutyric acid. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 203, n. 6, p. 464-472, dec. 2017.

FERNANDES, J. C.; GOULAO, L. F.; AMÂNCIO, S. Immunolocalization of cell wall polymers in grapevine (*Vitis vinifera*) internodes under nitrogen, phosphorus or sulfur deficiency. **Journal of Plant Research**, v. 129, p. 1151-1163, jul. 2016.

FICHMAN, Y. *et al.* Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. **Biological Reviews**, v. 90, n. 4, p. 1065-1099, nov. 2015.

FORLANI, G. *et al.* Evolution of plant δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductases from phylogenetic and structural perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 567, p. 1-15, aug. 2015a.

FORLANI, G. *et al.* Functional characterization and expression analysis of rice δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase provide new insight into the regulation of proline and arginine catabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 591, p. 1-17, aug. 2015b.

FORLANI, G. *et al.* Regulation of proline accumulation and its molecular and physiological functions in stress defence. *In*: HOSSAIN, M. A. *et al.* **Osmoprotectant-mediated abiotic stress tolerance in plants**. Cham: Springer, 2019. 345 p.

FORLANI, G.; SCAINELLI, D.; NIELSEN, E. Two δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase isoforms are expressed in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells and are differentially modulated during the culture growth cycle. **Planta**, v. 202, p. 242-248, 1997.

FUNCK, D.; ECKARD, S.; MÜLLER, G. Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 70, p. 1-13, apr. 2010.

FUNCK, D.; STADELHOFER, B.; KOCH, W. Ornithine- δ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 40, p. 1-14, apr. 2008.

FURLAN, A. L. *et al.* Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 151, p. 566-578, jun. 2020.

GALLE, A. *et al.* Effects of drought stress and subsequent rewatering on photosynthetic and respiratory pathways in *Nicotiana sylvestris* wild type and the mitochondrial complex I-deficient CMSII mutant. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 3, p. 765-775, mar. 2010.

GANDIN, A. *et al.* The absence of alternative oxidase AOX1A results in altered response of photosynthetic carbon assimilation to increasing CO₂ in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol**, v. 53, n.9, p. 1627-1637, sep. 2012.

GHAFOOR, R. *et al.* Exogenously applied proline induced changes in key anatomical features and physio-biochemical attributes in water stressed oat (*Avena sativa* L.) plants. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, n. 3, p. 1-15, jul. 2019.

GIBERTI, S.; FUNCK, D.; FORLANI, G. Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. **New Phytologist**, v. 202, n. 3, p. 911-919, may 2014.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 909-930, dec. 2010.

GOLLDACK, D. *et al.* Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 151, p. 1-10, apr. 2014.

GUAN, C. *et al.* Overexpression of gene encoding the key enzyme involved in proline-biosynthesis (*PuP5CS*) to improve salt tolerance in switchgrass (*Panicum Virgatum* L.). **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 8, p. 1187-1199, aug. 2018.

HAJIBOLAND, R. Effect of micronutrient deficiencies on plants stress responses. *In*: AHMAD, P.; PRASAD, M.N.V. **Abiotic stress responses in plants**. New York: Springer, 2012. p. 283-329.

HARE, P. D.; CRESS, W. A. 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.; VAN STADEN, J. Disruptive effects of exogenous proline on chloroplast and mitochondrial ultrastructure in *Arabidopsis* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 68, n. 3, p. 393-396, sep. 2002.

HASANUZZAMAN, M. *et al.* Exogenous proline and glycine betaine mediated upregulation of antioxidant defense and glyoxalase systems provides better protection against salt-induced oxidative stress in two rice (*Oryza sativa* L.) varieties. **BioMed Research International**, p. 1-17, 2014.

HAYAT, S. *et al.* Role of proline under changing environments: a review. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, n. 11, p. 1456-1466, nov. 2012.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, apr. 1968.

HEBBELMANN, I. *et al.* Multiple strategies to prevent oxidative stress in *Arabidopsis* plants lacking the malate valve enzyme NADP-malate dehydrogenase. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 3, p. 1445-1459, feb. 2012.

HELLMANN, H. *et al.* Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. **Plant Physiology**, v. 123, p. 779-790, jun. 2000.

HMIDA-SAYARI, A. *et al.* Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. **Plant Science**, v. 169, n. 4, p. 746-752, oct. 2005.

HU, W. *et al.* Effects of exogenous calcium on mesophyll cell ultrastructure, gas exchange, and photosystem II in tobacco (*Nicotiana tabacum* Linn.) under drought stress. **Photosynthetica**, v. 56, n. 4, p. 1204-1211, apr. 2018.

HURTADO-SALAZAR, A. *et al.* Proline and ions accumulation in four *Passiflora* species under water-saline stress. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 4, p. 570-580, oct./dec. 2017.

IQBAL, M. J. Role of osmolytes and antioxidant enzymes for drought tolerance in wheat. *In*: FAHAD, S. **Global wheat production**. London: IntechOpen, 2018.

IQBAL, N. *et al.* A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 34-42, apr. 2014.

JAIN, M. *et al.* Ameliorative effects of proline on salt stress-induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Cell Reports**, v. 20, n. 5, p. 463-468, Jul. 2001.

JI, T. *et al.* Cucumber *phospholipase D alpha* gene overexpression in tobacco enhanced drought stress tolerance by regulating stomatal closure and lipid peroxidation. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 355, p. 1-14, dec. 2018.

KAMRAN, M. *et al.* Alleviation of drought-induced adverse effects in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) using proline as a pre-sowing seed treatment. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 2, p. 621-632, apr. 2009.

KARIM, M. R.; RAHMAN, M. A. Drought risk management for increased cereal production in Asian Least Developed Countries. **Weather and Climate Extremes**, v. 7, p. 24-35, 2015.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 4, p. 609-619, dec. 2015.

KAYA, C. *et al.* Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 397-403, jul. 2007.

KHAN, M. I. R.; ASGHER, M.; KHAN, N. A. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in

mungbean (*Vigna radiata* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 67-74, jul. 2014.

KHATRI, K.; RATHORE, M. S. Photosystem photochemistry, prompt and delayed fluorescence, photosynthetic responses and electron flow in tobacco under drought and salt stress. **Photosynthetica**, v. 57, n. 1, p. 61-74, jan. 2019.

KISHOR, P. B. K.; SREENIVASULU, N. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? **Plant, Cell and Environment**, v. 37, n. 2, p. 300-311, feb. 2014.

KIYOSUE, T. *et al.* A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 8, n. 8, p. 1323-1335, aug. 1996.

LACERDA, F. H. D. *et al.* Aplicação exógena de prolina na redução do estresse salino em meloeiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 218-227, out-dez. 2012.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

LAUNAY, A. *et al.* Proline oxidation fuels mitochondrial respiration during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, n. 21, p. 6203-6214, nov. 2019.

LI, Z. G.; DING, X. J.; DU, P. F. Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-improved heat tolerance in maize and involvement of proline. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, n. 8, p. 741-747, may 2013.

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

LISUMA, J.; MBEGA, E.; NDAKIDEMI, P. Influence of tobacco plant on macronutrient levels in sandy soils. **Agronomy**, v. 10, n. 418, p. 1-15, mar. 2020.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dec. 2001.

LÓPEZ-LEFEBRE, L. R. *et al.* Effect of calcium on mineral nutrient uptake and growth of tobacco. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 14, p. 1334-1338, nov. 2001.

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.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas: Princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafós, 1997. 304 p.

MARSCHNER, P. **Mineral nutrition of higher plants**. Amsterdam: Elsevier, 2012. 672 p.

MEENA, M. *et al.* Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. **Heliyon**, v. 5, n. 12, p. 1-20, dec. 2019.

MERWAD, A.-R. M. A.; DESOKY, E.-S. M.; RADY, M. M. Response of water deficit-stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application. **Scientia Horticulturae**, v. 228, p. 132-144, jan. 2018.

METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 1, p. 566-570, jul. 2015.

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, sep. 2009.

MITCHELL, H. J. *et al.* A rust-inducible gene from flax (*fls1*) is involved in proline catabolism. **Planta**, v. 223, n. 2, p. 213-222, jan. 2006.

MOLINARI, H. B. C. *et al.* Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. **Plant Science**, v. 167, n. 6, p. 1375-1381, dec. 2004.

MONREAL, J. A. *et al.* Proline content of sugar beet storage roots: Response to water deficit and nitrogen fertilization at field conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 257-267, jun. 2007.

MORGAN, J. B.; CONNOLLY, E. L. Plant-Soil Interactions: Nutrient Uptake. **Nature Education Knowledge**, v. 4, n. 8, 2013.

MOUSTAKAS, M. *et al.* Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 65, p. 315-325, nov. 2011.

MURAHAMA, M. *et al.* Purification and characterization of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate reductase isoenzymes indicating differential distribution in spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 7, p. 742-750, jul. 2001.

NAZAR, R. *et al.* Salicylic acid supplementation improves photosynthesis and growth in mustard through changes in proline accumulation and ethylene formation under drought stress. **South African Journal of Botany**, v. 98, p. 84-94, may 2015.

NOCTOR, G., PAEPE, R.; FOYER, C. H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 3, p. 125-134, mar. 2007.

NOUNJAN, N.; NGHIA, P.T.; THEERAKULPISUT, P. Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 6, p. 596-604, apr. 2012.

OLIVEIRA, F.; COSTA, M. C. F. Dossiê técnico - Cultivo de Fumo (*Nicotiana tabacum* L.). Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT, p. 1-26, fev. 2012.

OMOTO, E.; TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H. Adaptation responses in C4 photosynthesis of maize under salinity. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 5, p. 469-477, mar. 2012.

OSMAN, H. S. Enhancing antioxidant–yield relationship of pea plant under drought at different growth stages by exogenously applied glycine betaine and proline. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 389-402, dec. 2015.

PARIDA, A. K. *et al.* Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 5, p. 619-627, sep. 2008.

PER, T. S. *et al.* Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 126-140, jun. 2017.

PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 869-882, jan. 2011.

PITA-BARBOSA, A.; RICACHENEVSKY, F. K.; FLIS, P. M. One “OMICS” to integrate them all: ionomics as a result of plant genetics, physiology and evolution. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 31, p. 71-89, feb. 2019.

RAGHAVENDRA, A. S.; REDDY, K. B. Action of proline on stomata differs from that of abscisic acid, g-substances, or methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v. 83, n. 4, p. 732-734, apr. 1987.

RAJAGOPAL, V. The influence of exogenous proline on the stomatal resistance in *Vicia faba*. **Physiologia Plantarum**, v. 52, n. 2, p. 292-296, apr. 2006.

RAMAKERS, C. *et al.* Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62-66, mar. 2003.

RANI, S. J.; USHA, R. Transgenic plants: types, benefits, public concerns and future. **Journal of Pharmacy Research**, v. 6, n. 8, p. 879-883, aug. 2013.

REDDY, P. S. *et al.* Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 94, p. 104-113, sep. 2015.

- REJEB, K. B.; ABDELLEY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 278-284, jul. 2014.
- RENTSCH, D.; SCHMIDT, S.; TEGEDER, M. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. **FEBS Letters**, v. 581, n. 12, p. 2281-2289, may 2007.
- RIFFAT, A.; AHMAD, M. S. A. Changes in organic and inorganic osmolytes of maize (*Zea mays* L.) by sulfur application under salt stress conditions. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 12, p. 543-561, 2018.
- RIZZI, Y. S. *et al.* P5CDH affects the pathways contributing to Pro synthesis after ProDH activation by biotic and abiotic stress conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 572, p. 1-11, jul. 2015.
- RONDE, J. A. *et al.* Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis P5CR* gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 11, p. 1211-1224, nov. 2004.
- RUIZ, J. M. *et al.* Nitrogen metabolism in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.): Role of boron as a possible regulatory factor. **International Journal of Plant Sciences**, v. 159, n. 1, p. 121-126, jan. 1998.
- RYAN, B. M. *et al.* Copper speciation and isotopic fractionation in plants: uptake and translocation mechanisms. **New Phytologist**, v. 199, n. 2, p. 367-378, jul. 2013.
- SADIQOV, S. T.; AKBULUT, M.; EHMEDOV, V. Role of Ca²⁺ in drought stress signaling in wheat seedlings. **Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 491-497, apr. 2002.
- SALT, D. *et al.* Ionomics and the study of the plant ionome. **Annual Review in Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 709-733, 2008.
- SÁNCHEZ, E. *et al.* Proline metabolism in response to highest nitrogen dosages in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike). **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 5, p. 593-598, 2001.
- SARDANS, J.; PEÑUELAS, J.; OGAYA, R. Drought's impact on Ca, Fe, Mg, Mo and S concentration and accumulation patterns in the plants and soil of a Mediterranean evergreen *Quercus ilex* forest. **Biogeochemistry**, v. 87, p. 49-69, jan. 2008.
- SCHEIBE, R. Malate valves to balance cellular energy supply. **Physiologia Plantarum**, v. 120, n. 1, p. 21-26, jan. 2004.
- SCHEIBE, R. Redox-modulation of chloroplast enzymes: a common principle for individual control. **Plant Physiology**, v. 96, n. 1, p. 1-3, apr. 1991.
- SCHEIBE, R.; STITT, M. Comparison of NADP-malate dehydrogenase activation, Q_A reduction and O₂ evolution in spinach leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 4, p. 473-481, 1988.

SCHERTL, P. *et al.* Biochemical characterization of proline dehydrogenase in *Arabidopsis* mitochondria. **The FEBS Journal**, v. 128, n. 12, p. 2794-2804, jun. 2014.

SELINSKI, J.; SCHEIBE, R. Malate valves: old shuttles with new perspectives. **Plant Biology**, v. 21, n. 1, p. 21-30, Jan. 2019.

SHARMA, S.; VILLAMOR, J. G.; VERSLUES, P. E. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 292-304, sep. 2011.

SIERRO, N. *et al.* The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. **Nature Communications**, v. 5, n. 3833, p. 1-9, may 2014.

SIGNORELLI, S. The fermentation analogy: a point of view for understanding the intriguing role of proline accumulation in stressed plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1339, p. 1-6, aug. 2016.

SIGNORELLI, S. *et al.* Proline does not quench singlet oxygen: evidence to reconsider its protective role in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 64, p. 80-83, mar. 2013.

SIGNORELLI, S.; MONZA, J. Identification of Δ^1 -pyrroline 5-carboxylate synthase (P5CS) genes involved in the synthesis of proline in *Lotus japonicus*. **Plant Signaling and Behavior**, v. 12, n. 11, p. 1-4, 2017.

SILVA, C. da. *et al.* Drought Stress and Plant Nutrition. **Plant Stress**, v. 5, n. 1, p. 32-41, jan. 2010.

SINDITABACO. Tabaco: relevância econômica e social. Relatório Institucional, p. 1-20, 2019.

SIVAKUMAR, P.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. P. Proline suppresses Rubisco activity in higher plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 252, n. 2, p. 428-432, nov. 1998.

STETSENKO, L. A. *et al.* Proline protects *Atropa belladonna* plants against nickel salt toxicity. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 58, n. 2, p. 337-343, 2011.

STINES, A. P. *et al.* Proline accumulation in developing grapevine fruit occurs independently of changes in the levels of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase mRNA or protein. **Plant Physiology**, v. 120, n. 3, p. 923-931, jul. 1999.

STRAND, D. D. *et al.* Activation of cyclic electron flow by hydrogen peroxide in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 7, p. 5539-5544, Apr. 2015.

SUEKAWA, M.; FUJIKAWA, Y.; ESAKA, M. Exogenous proline has favorable effects on growth and browning suppression in rice but not in tobacco. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 142, p. 1-7, sep. 2019.

SUN, L. *et al.* Mechanism study of sulfur fertilization mediating copper translocation and biotransformation in rice (*Oryza sativa* L.) plants. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 426-434, apr. 2017.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, feb. 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TAMOI, M. *et al.* The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions. **The Plant Journal**, v. 42, n. 4, p. 504-513, may 2005.

TANIGUCHI, M.; MIYAKE, H. Redox-shuttling between chloroplast and cytosol: integration of intra-chloroplast and extra-chloroplast metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 3, p. 252-60, jun. 2012.

TEH, C. Y. *et al.* In vitro rice shoot apices as simple model to study the effect of NaCl and the potential of exogenous proline and glutathione in mitigating salinity stress. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 3, p. 771-781, apr. 2015.

UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 71-74, jul. 2007.

UPADHYAYA, H. *et al.* Comparative effect of Ca, K, Mn and B on post-drought stress recovery in tea [*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze]. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 4, p. 443-460, apr. 2012.

VANKOVÁ, R.; DOBRÁ, J.; STORCHOVÁ, H. Recovery from drought stress in tobacco: an active process associated with the reversal of senescence in some plant parts and the sacrifice of others. **Plant Signaling and Behavior**, v. 7, n. 1, p. 19-21, jan. 2012.

VANLERBERGHE, G. C. Alternative Oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 6805-6847, mar. 2013.

VEERANAGAMALLAIAH, P. *et al.* Glutamine synthetase expression and pyrroline-5-carboxylate reductase activity influence proline accumulation in two cultivars of foxtail millet (*Setaria italica* L.) with differential salt sensitivity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 239-244, jun. 2007.

VENDRUSCOLO, E. C. G. *et al.* Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 10, p. 1367-1376, Oct. 2007.

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

- VERDOY, D. *et al.* Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. **Plant, Cell and Environmental**, v. 29, n. 10, p. 1913-1923, oct. 2006.
- VERSLUES, P. E.; BRAY, E. A. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 1, p. 201-212, jan. 2006.
- VERSLUES, P. E., SHARP, R. E. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. **Plant Physiology**, v. 119, n. 4, p. 1349-1360, apr. 1999.
- VISHWAKARMA, A. *et al.* Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana*. **Annals of Botany**, v. 116, n. 4, p. 555-569, sep. 2015.
- WANG, H. *et al.* Proline accumulation and metabolism-related genes expression profiles in *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 792, p. 1-9, sep. 2015.
- WANG, J.; VANLERBERGHE, G. C. A lack of mitochondrial alternative oxidase compromises capacity to recover from severe drought stress. **Physiologia Plantarum**, v. 149, n. 4, p. 461-473, dec. 2013.
- WANG, W. G. *et al.* Effects of low nitrogen and drought stresses on proline synthesis of *Jatropha curcas* seedling. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 5, p. 1591-1595, sep. 2011.
- WANG, Y. *et al.* Magnesium isotope fractionation reflects plant response to magnesium deficiency in magnesium uptake and allocation: a greenhouse study with wheat. **Plant and Soil**, v. 453, n. 1-2, p. 1-13, aug. 2020.
- WANG, Z. *et al.* Hormonal interactions during cluster-root development in phosphate-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). **Journal of Plant Physiology**, v. 177, p. 74-82, apr. 2015.
- WHITE, M. C.; CHANEY, R. L.; DECKER, A. M. Metal complexation in xylem fluid. III. Electrophoretic evidence. **Plant Physiology**, v. 67, n. 2, p. 311-315, feb. 1981.
- YAMADA, M. *et al.* Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1975-1981, jul. 2005.
- YAN, Z. *et al.* Effects of proline on photosynthesis, root reactive oxygen species (ROS) metabolism in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.) under NaCl stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 80, p. 18381-18390, dec. 2011.
- XU, G.; FAN, X.; MILLER, A. J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 153-182, jul. 2012.

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 two steps of proline biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 35, p. 20491-20496, sep. 1995.

ZHANG, G. C. *et al.* Enhanced salt tolerance of transgenic vegetable soybeans resulting from overexpression of a novel Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene from *Solanum torvum* Swartz. **Horticulture, Environment and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 94-104, feb. 2015.

ZHANG, L. T. *et al.* The mitochondrial alternative oxidase pathway protects the photosynthetic apparatus against photodamage in *Rumex* K-1 leaves. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 40, p. 1-18, mar. 2012.

ZHANG, X. *et al.* Co-expression of rice *OsP5CS1* and *OsP5CS2* genes in transgenic tobacco resulted in elevated proline biosynthesis and enhanced abiotic stress tolerance. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, v. 20, n. 4, p. 717-722, 2014.

ZHANG, Z. S. *et al.* Contribution of the alternative respiratory pathway to PSII photoprotection in C3 and C4 plants. **Molecular Plant**, v. 10, n. 1, p. 131-142, jan. 2017.

ZHAO, Y. *et al.* Malate circulation: Linking chloroplast metabolism to mitochondrial ROS. **Trends in Plant Science**, v. 25, n. 5, p. 446-454, may 2020.

ZOUARI, M. *et al.* Exogenous proline-mediated abiotic stress tolerance in plants: possible mechanisms. *In*: HOSSAIN, M. A. *et al.* **Osmoprotectant-mediated abiotic stress tolerance in plants**. Cham: Springer, 2019. 345 p.