

## **ASPERSÃO DE PROLINA EM DE PLANTAS DE SORGO EM CONDIÇÕES SALINAS: METABOLISMO E EXPRESSÃO DOS GENES RELACIONADOS<sup>1</sup>**

P. A. F. de Freitas<sup>2</sup>, L. S. Lopes<sup>2</sup>, D. G. Coelho<sup>3</sup>, E. Gomes-Filho<sup>4</sup>

**RESUMO:** Estudou-se os efeitos da prolina exógena em folhas de Sorgo (genótipo CSF 20) em condições controle e de salinidade analisando dados de crescimento, a acumulação de prolina e a modulação da atividade enzimática e da expressão gênica dos genes relacionados. As plantas com 10 dias após a semeadura foram cultivadas em solução nutritiva na ausência e presença de 75 mM de NaCl e tratadas com soluções de prolina a 30 mM na ausência e presença de sal. Em nossas observações concluímos que a aspersão de prolina têm efeitos mitigadores e que os níveis de prolina são modulados pela combinação das atividades das enzimas e dos genes relacionados. Destaca-se que a expressão dos genes nos dias iniciais após a aplicação de prolina é crucial para a modulação tanto dos níveis de prolina quanto das atividades enzimáticas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sorgo, salinidade, expressão gênica

### **PROLINE SPRAYING IN SORGHUM PLANTAS UNDER SALINE CONDITIONS: METABOLISM AND GENE-RELATED EXPRESSION**

**SUMMARY:** The effects of exogenous proline in sorghum leaves (genotype CSF 20) under control and salinity conditions were studied by analyzing growth parameters, proline accumulation and modulation of the enzymatic activity and expression of related genes. Plants with 10 days after sowing were grown in nutrient solution in the absence and presence of 75 mM NaCl and treated with 30 mM proline solutions in the absence and presence of salt. We conclude that proline aspersion has mitigating effects and that proline levels are modulated by the combination of enzyme activities and related genes. It is noteworthy that the expression of genes in the early days after the application of proline is crucial for the modulation of both proline levels and enzymatic activities.

**KEY WORDS:** sorghum, salinity, gene expression.

<sup>1</sup> Parte do trabalho de tese do primeiro autor.

<sup>2</sup> Doutorando, DBBM, UFC. Fortaleza - CE.

<sup>3</sup> Mestrando, Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, UFC, CEP 60455-760, Fortaleza, CE. Email: danielcoelho.ea@gmail.com.

<sup>4</sup> Professor Doutor, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza, CE.

## INTRODUÇÃO

A baixa pluviosidade e a elevada taxa de evapotranspiração característica das regiões áridas e semiáridas aliadas a um manejo inadequado resultam em um solo com altos teores de sal (Carillo et al. 2011). Em decorrência disso, estresse salino é um dos grandes problemas da agricultura enfrentados não só nas regiões semiáridas do Brasil, mas, também, em muitas outras regiões do mundo (Gheyi et al., 2010). A maioria das espécies vegetais submetidas à salinidade tem o crescimento reduzido, afetando sua produtividade.

Apesar dos efeitos da salinidade do solo, plantas são capazes de se aclimatarem às condições de estresse pela acumulação de solutos compatíveis, controlando os movimentos de íons permitindo elevadas concentrações intracelulares ou na regulação de enzimas e expressão de genes.

O ajuste osmótico é um importante traço que minimiza a desidratação em ambientes cuja disponibilidade de água é limitada, uma vez que mantém a turgescência celular e processos fisiológicos garantindo a aclimação da planta ao ambiente (Cramer et al., 2011). Dentre as respostas metabólicas envolvidas na aclimação ao estresse, o acúmulo de prolina tem sido um interessante objeto de estudo, muito embora não tenha seu papel completamente esclarecido (Parihar et al., 2015). A prolina, em condições de estresses abióticos, pode ser uma molécula chave de sinalização capaz de desencadear múltiplas respostas que fazem parte do processo de aclimação. O acúmulo de prolina, além de estar relacionado com o ajustamento osmótico pode contribuir para a estabilização de membranas e proteínas; promover a eliminação de radicais livres; atuar na sinalização celular; participar do equilíbrio de oxirredução e na indução da expressão de genes (Lehmann et al., 2010).

A modificação de plantas geneticamente é um passo significativo a fim de compreender o metabolismo da prolina e os mecanismos intrínsecos que levam à minimização dos efeitos deletérios causados pelo estresse. Entretanto, a aplicação de prolina tem se mostrado eficaz em diminuir os efeitos causados por diversos tipos de estresse (Gupta & Huang, 2014) e estudos mais complexos e específicos fazem-se necessários estudos mais completos que busquem ampliar a informação sobre a influência da prolina exógena em sistemas vegetais.

Dentre as culturas exploradas no contexto atual, o sorgo é uma espécie consideravelmente disseminada no Brasil e no mundo, servindo tanto para a alimentação animal e humana quanto para a produção de etanol (Meki et al., 2013). No presente estudo buscou-se

estudar as implicações bioquímicas e moleculares da aspersão de prolina durante a aclimatação de plantas de sorgo às condições de salinidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Estratégia experimental

Os experimentos foram conduzidos utilizando o sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), cultivar CSF 20, como material vegetal. Plantas com 10 dias de idade foram cultivadas em solução nutritiva de Clark onde permaneceram por dois dias, sob aeração. Depois disso, as plantas foram transferidas individualmente para baldes contendo 6 L da mesma solução nutritiva, quando as plantas serão submetidas a quatro tratamentos: 1. controle/água: aspersão foliar de água desionizada e sem adição de NaCl na solução nutritiva; 2. controle/prolina: aspersão foliar de prolina a 30 mM e sem adição de NaCl na solução nutritiva; 3. salino/água: aspersão foliar água desionizada e adição de NaCl a 75 mM na solução nutritiva; e 4. salino/prolina: aspersão foliar prolina a 30 mM determinada no experimento preliminar e adição de NaCl a 75 mM na solução nutritiva. As coletas para determinação do conteúdo e atividade das enzimas do metabolismo da prolina foram realizadas aos 7 e 14 dias após a imposição dos tratamentos. Após a coleta, as folhas do sorgo foram liofilizadas para obtenção da massa seca (MS) ou imediatamente congeladas com N<sub>2</sub> líquido e armazenados a – 80°C até sua utilização. As coletas para as análises de expressão foram feitas aos 0, 0.5, 1, 2, 5, 7 e 14 dias.

### Determinação de Prolina

Os teores de prolina serão determinados de acordo com o método descrito por Bates et al. (1973) pelas leituras de absorbância a 520 nm.

### Enzimas do metabolismo da prolina

Para a análise das enzimas do metabolismo da prolina, foram utilizados o tecido fresco de folhas. A extração foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Wang et al. (2011), com modificações. A atividade da sintetase da  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CS) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Wang et al. (2011). A atividade da P5CS foi determinada pela oxidação do NADPH e medida pelo aumento linear na absorbância a 340 nm, por 5 min. Atividade OAT foi medida utilizando o método de Kim et al. (1994). A absorbância foi medida a 510 nm e a concentração de P5C formada sob condições de alta temperatura e condições ácidas foi utilizada nos cálculos. A atividade da desidrogenase da prolina (ProDH) foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Sakuraba et al.

(2001) com modificações. PDH foi estimada pela diminuição da absorbância a 600 nm, causada pela redução do 2,6 dicloroindofenol (DCIP).

### **Expressão dos genes da prolina**

Para extração do RNA total, 100 mg de folhas foram macerados em almofariz e pistilo usando nitrogênio líquido e transferidos para eppendorfs de 1,5 mL. O material macerado foi submetido a extração usando-se o RNeasy plant mini Kit (Quiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Para determinar a pureza do RNA total, as amostras foram lidas em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) no comprimento de onda de 260 nm. A pureza do RNA extraído foi estimada avaliando a razão 260/280 nm (a qual é usada para identificar contaminação por proteínas e que deve variar entre os valores 1,8 e 2,0) e a razão 260/230 nm (a qual é usada para identificar contaminação por polissacarídeos e que deve estar acima do valor 2,0).

Para identificação dos genes relativos as enzimas do metabolismo da prolina (*p5cs1*, *p5cs2*, *prodh* e *oat*) foram realizadas buscas no banco de dados do *National Center of Biotechnology Center* (NCBI). Após a anotação do gene, deduziu-se a sequência de DNA complementar (cDNA) a qual foi traduzida em sequência de aminoácidos usando o portal de recurso em bioinformática da *Swiss Institute of Bioinformatics* usando a ferramenta *Expert Protein Analysis System* (ExPASy). O desenho dos *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados nas reações de PCR em tempo real foram feitos usando o programa Perl Primer V1.1.20 (Marshall, 2011).

A análise da expressão gênica foi feita com os *primers*, diluídos para a concentração de 500  $\mu\text{M}$ , sendo quantificados em triplicata usando-se o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). O cálculo da concentração real dos *primers* foi feito a partir das leituras médias das concentrações obtidas no espectrofotômetro sendo posteriormente diluídos para uma concentração de 6  $\mu\text{M}$ . A solução de trabalho utilizada nas reações de qPCR foi de 300  $\text{nm}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . A determinação da temperatura ótima para cada primer foi feita a partir de um gradiente de temperatura (47,2; 50,5; 52,7; 55,0; 57,5; 59,8; 63,6 e 65,0°C) usando um *pool* de amostras de cDNA. O procedimento foi realizado em termociclador Mastercycle ep realplex 4S (Eppendorf®). As temperaturas selecionadas foram a que apresentaram o menor valor de Ct e de acordo com as curvas mais típicas (sigmóides). Os cDNAs obtidos pela reação de RT na etapa anterior foram diluídos até a concentração final de 25  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  considerando a concentração inicial em torno de 1000  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  para todas as amostras.

A cada reação de qPCR foram adicionados o cDNA, os oligonucleotídeos iniciadores (senso e anti-senso), água ultrapura (Milli-Q) autoclavada e livre de nucleases e Power SYBR

Green<sup>®</sup> PCR Master Mix 2X (PROMEGA) em um volume final de 20 µL. Alíquotas da mesma amostra de cDNA foram utilizadas para todas as reações gene-específicas. A mistura de reação foi distribuída em placas (Twin.tec real-time PCR plate 96 Eppendorf<sup>®</sup>) com 96 poços, sendo cada amostra depositada em três poços. O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em termociclador Mastercycle ep realplex 4S (Eppendorf<sup>®</sup>) detectando os níveis de fluorescência do SYBR Green. As variáveis utilizadas em cada ciclo foram os seguintes: 1) Temperatura de 95°C por 10 min; 2) 40 ciclos envolvendo desnaturação a 95°C durante 15 s e 15 s à temperatura de anelamento de acordo com cada par de *primer* e; 3) 20 s de extensão a 60°C. Também foi realizada a curva de dissociação (Melting), que consistiu de 15 s de incubação a 95°C; 15 s de incubação a 60°C e uma subida de 95°C.

Após os ciclos de reação de PCR em tempo real, a expressão gênica foi determinada pelo número de ciclos de amplificação necessários para que a fluorescência emitida pelo SYBR Green ultrapasse o valor de  $C_t$  (*Cycle threshold*) durante a fase exponencial da reação. Os valores de  $C_t$  correspondem a média aritmética das triplicatas para cada condição e gene. Os valores de  $C_t$  foram convertidos para valores de expressão relativa delta  $C_t$  e delta – delta  $C_t$  (Livak & Schmittgen, 2001) com o auxílio do programa GeNorm (Vandesompele et al., 2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prolina exógena foi eficiente minimizar os efeitos da salinidade nas folhas (Figura 1). Nos tratamentos salinos aos 14 dias, houve um aumento na massa seca (35%) e na área foliar (32%) quando a prolina foi aspergida.

Sob condições controle, o conteúdo de prolina do tratamento controle/prolina foi aumentado 5,5 vezes em relação ao tratamento controle/água aos 7 dias enquanto esse aumento foi 3,0 vezes maior aos 14 dias (Figura 1a). Aos 7 dias o teor de prolina foi aumentado nos tratamentos salinos. Todavia o conteúdo de prolina foi aumentado cerca de 4,8 no tratamento salino/água e 16,5 vezes no tratamento salino/prolina. O conteúdo de prolina foi depletado no tratamento salino/prolina aos 14 dias sendo cerca de 45% menor que o encontrado no tratamento salino/água.

Em relação as atividades das enzimas de síntese, na ausência de aspersão da prolina, observamos um aumento da atividade da P5CS e da OAT nos tratamentos salinos, sendo que a primeira apresenta uma atividade superior a segunda (Figura 2b e 2c). A aspersão de prolina promoveu uma redução na atividade da P5CS aos 7 dias (Figura 2b). Entre os controles, houve uma redução de 29% na atividade dessa enzima enquanto entre os tratamentos salinos a prolina

exógena proporcionou uma redução de 53%. Quanto a atividade da OAT, o fornecimento de prolina não alterou as atividades desta enzima nos tratamentos controle e salino (Figura 2c). Quanto a enzima de degradação, na ausência de prolina, houve uma redução na atividade da ProDH de cerca de 56% aos 7 dias (Figura 2d). Neste mesmo tempo de coleta, entretanto, a aspersão de prolina, aumentou a atividade dessa enzima. O tratamento controle/prolina teve um aumento de 48% na atividade da ProDH em relação ao tratamento controle/água, enquanto no tratamento salino prolina houve uma elevação de 330% em relação ao tratamento salino/água.

Na figura 3a podemos perceber o padrão de expressão do gene *p5cs* em condições de salinidade e na ausência de prolina. Claramente, observamos um aumento progressivo na expressão da *p5cs* a partir de 2 dias após a imposição dos tratamentos. A expressão no tratamento salino/água é 2,1 e 8,7 maior, respectivamente aos 7 e 14 dias, em relação ao tratamento salino. Já quando às plantas aspergidas com prolina em condições de salinidade, o padrão de aumento na expressão não é verificado e percebe-se que praticamente não há variação na expressão. Aos 7 dias, o nível de expressão é similar aos controles. Entretanto, a expressão é 12,6 vezes no tratamento salino/prolina quando comparado aos controles sendo superior a expressão do tratamento salino/água. A expressão da *oat* na condição salina parece ser importante durante o período inicial de estresse (Figura 3b). Aos 7 dias, a expressão do gene da *oat* no tratamento salino/água é 36% maior que o tratamento salino/prolina. Aos 14 dias, não houve diferenças significativas na expressão ocasionada pela aspersão de prolina. Quanto a expressão da ProDH, a expressão em condições de salinidade sem prolina é reduzida (Figura 3c). Nos tratamentos aonde a prolina foi aplicada, houve aumento na expressão do gene *prodh* logo poucas horas após a exposição aos tratamentos. Essa expressão foi aumentada 32% e 178%, respectivamente na ausência e presença de prolina exógena, logo 12 h após a imposição dos tratamentos. Aos 7 e 14 dias, a expressão do gene *prodh* é menor nos tratamentos salinos comparados aos controles independente da aspersão de prolina.

A prolina tem sido reconhecida como uma molécula capaz de diversos efeitos tanto na célula vegetal quanto no contexto de planta inteira. No presente trabalho, observou-se uma recuperação da massa seca das folhas e da área foliar. Tem sido proposto que as folhas acumulam mais prolina para manter a taxa de divisão celular, o turgor e o conteúdo de clorofila para manter a atividade fotossintética sob estresse salino. Resultados similares foram encontrados, por exemplo, em milho (Freitas, 2013) e arroz (Hasanuzzaman, et al., 2014).

Os níveis de prolina em plantas são uma combinação do resultado da biossíntese e catabolismo e isso é necessário para analisar os perfis de expressão e a função dos genes envolvidos nesse processo para entender os mecanismos do metabolismo da prolina. Estudos

com *Arabidopsis* mostram que o modelo-padrão para acumulação de prolina em condições de salinidade, obedece a regra de aumento da expressão dos genes de síntese e de seus produtos bem como a redução da expressão/atividade dos genes/enzimas de degradação (Wang et al., 2015). O genótipo de sorgo objeto desse estudo obedece tal modelo. Observou-se que o aporte de prolina foi responsável por reduzir a atividade enzimática da P5CS aos 7 dias o que refletiu na diminuição expressão do gene relacionado. Aos 14 dias, observa-se uma depleção do nível de prolina no tratamento salino/prolina apesar da atividade da P5CS ser idêntica em ambos tratamentos salinos. Aparentemente, essa depleção foi percebida pela planta a qual elevou a expressão do gene *p5cs*. A prolina exógena também alterou a expressão dos genes *oat* e *prodh*. Essa regulação é relevante pois o aporte de prolina e a manutenção do seu teor requer uma regulação nos momentos iniciais da exposição ao estresse, reduzindo a expressão dos genes de síntese (*oat*) e aumentando a dos genes de degradação (*prodh*).

## CONCLUSÕES

Concluimos, portanto, que os efeitos benéficos ocasionados pela aspersão foliar de prolina durante o estresse salino requer mecanismos regulatórios finos tanto da atividade de enzimas regulatórias quanto dos genes relacionados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATES, L.S.; 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, 1973.

CARILLO, P.; ANNUNZIATA, M.G.; PONTECORVO, G.; FUGGI, A.; WOODROW, P. *Salinity Stress and Salt Tolerance, Abiotic Stress In Plants – Mechanisms and Adaptations*, 1. Ed: InTech, 2011.

CRAMER, G.R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, V.11, n.1, p. 1-14, 2011.

Freitas, P.A.F. Aplicação foliar de prolina como meio de minorar os efeitos do estresse salino em plantas de milho, Dissertação de Mestrado, UFC, 2013.

GHEYI, H.R.; DIAS, N.S.; LACERDA, C.F. Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados. Instituto Nacional Científico Tecnológico em Salinidade, Fortaleza, 2010. 472p.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*, V.2014, n.1, p. 1-18, 2014.

HASANUZZAMAN, M.; ALAM, M.M.; RAHMAN, A.; HASANUZZAMAN, K. N.; FUJITA, M. 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*, V.2014, n.1, p. 1-18, 2014.

KIM, H.R.; RHO, H.W.; PARK, J.W.; PARK, B.H.; KIM, J.S.; LEE, M.W. Assay of ornithine aminotransferase with ninhydrin. *Analytical Biochemistry*, V.223, n.2, p. 205-207, 1994.

LEHMANN, S.; FUNCK, D.; SZABADOS, L.; RENTSCH, D. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino acids*, V.39, n.4, p. 949-962, 2010.

MEKI, M.N.; SNIDER, J.L.; KINIRY, J.R.; RAPER, R.L.; ROCATELI, A.C. Energy sorghum biomass harvest thresholds and tillage effects on soil organic carbon and bulk density. *Industrial Crops and Products*, V.43, n.1, p. 172-182, 2013.

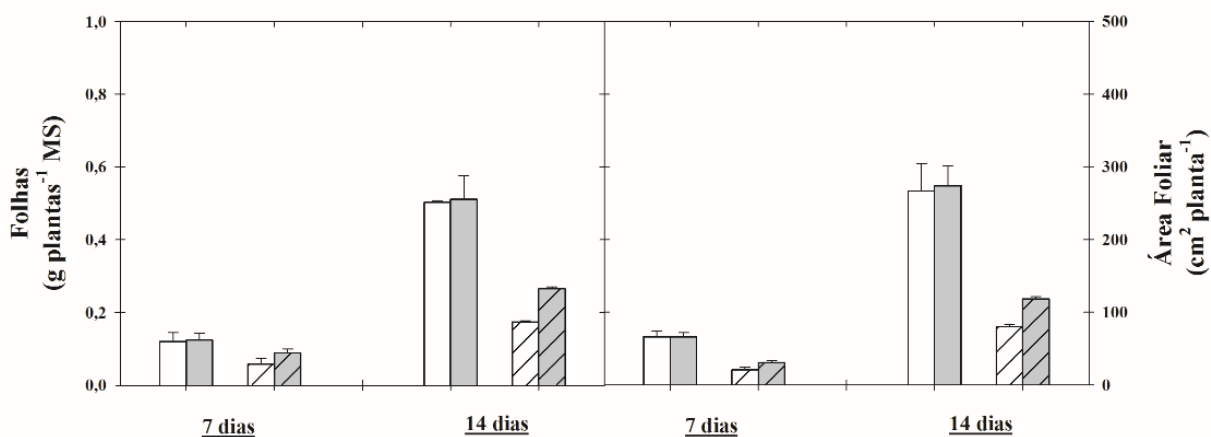
PARIHAR, P.; SINGH, S.; SINGH, R.; SINGH, V.P.; PRASAD, S.M. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, V.22, n.6, p. 4056–4075, 2015.

SAKURABA, H.; TAKAMATSU, Y.; SATOMURA, T.; KAWAKAMI, R. Purification, characterization, and application of a novel dye-linked l-proline dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus profundus*. *Applied and Environmental Microbiology*. V.67, n.4, p. 1470–1475, 2001.

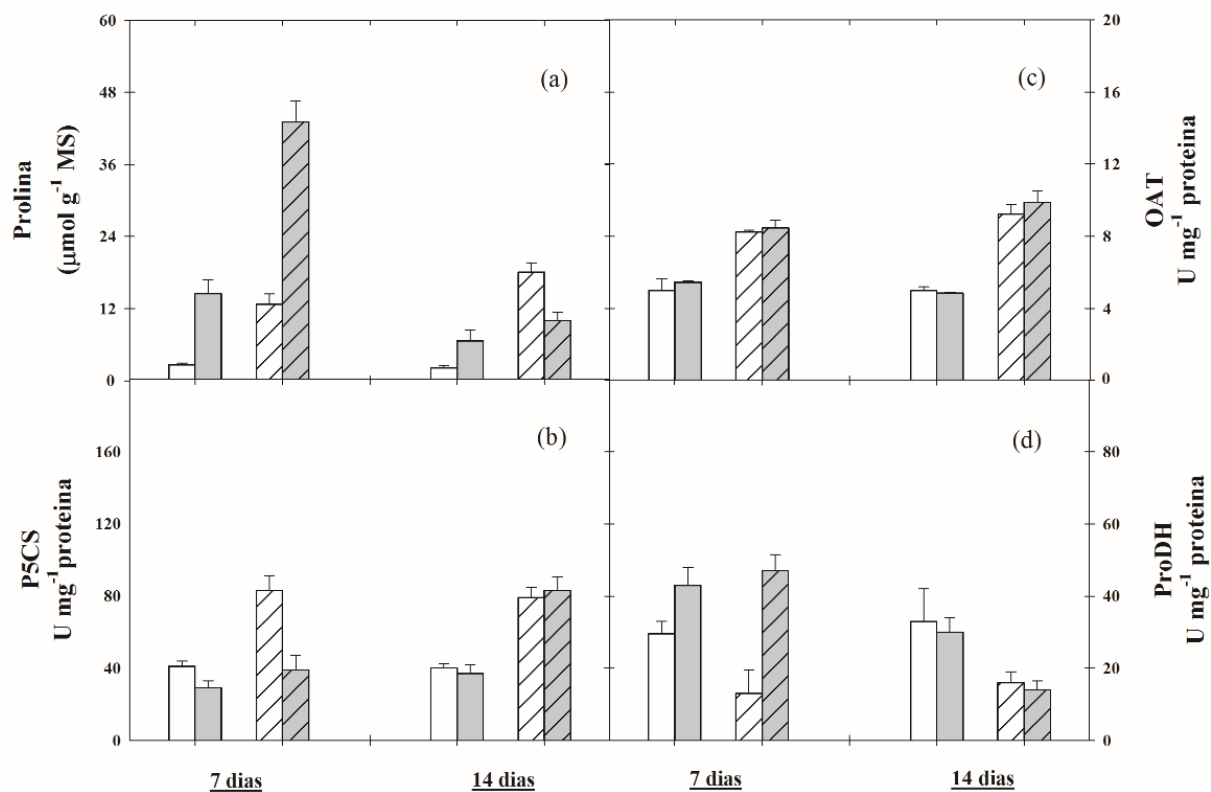
WANG, K.; LIU, Y.; DONG, K.; DONG, J.; KANG, J.; YANG, Q. The effect of NaCl on proline metabolism in *Saussurea amara* seedlings, *African Journal of Biotechnology*, V.10, n.15, p. 2886–2893, 2011.

WANG, H.; TANG, X.; WANG, H.; SHAO, H.-B. Proline accumulation and metabolism-related genes expression profiles in *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress. *Frontiers in Plant Science*, V.6, n.1, 2015.

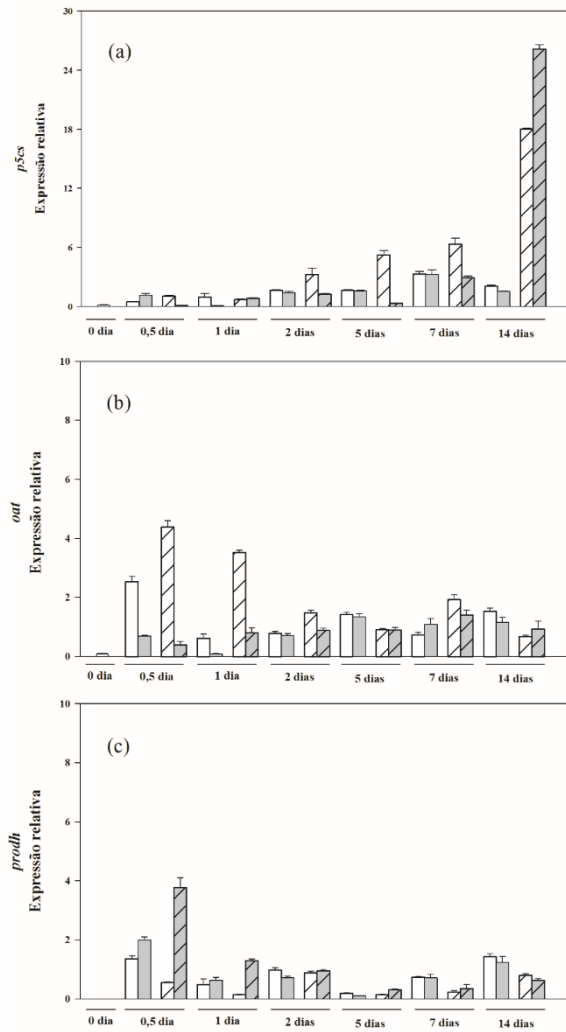




**Figura 1.** Massa seca de folhas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▨) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▨) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão.



**Figura 2.** Teor de prolina (a) e atividades das enzimas Δ<sup>1</sup>-pirrolina-5-carboxilato (P5CS) (b), ornitina aminotransferase (OAT) (c) e desidrogenase da prolina (ProDH) (d) de folhas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▨) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (□) e presença de sal (▨) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão.



**Figura 3.** Expressão dos genes *p5cs*, *oat* e *prodh* de folhas de sorgo cultivadas em solução nutritiva na ausência (□) e na presença (▨) de NaCl a 80 mM e tratadas com prolina a 30 mM na ausência (▩) e presença de sal (▧) após 7 e 14 dias da aplicação dos tratamentos. As barras representam a média ± o erro padrão.