

# EFEITO DO ESTRESSE SALINO E DA PROLINA EXÓGENA EM CALOS DE MILHO<sup>1</sup>

TEREZINHA RANGEL CAMARA<sup>2</sup>, LILIA WILLADINO<sup>3</sup>, JOSEP MARIA TORNÉ<sup>4</sup>,  
ALBERT MANICK<sup>5</sup> E MARIA ASUNCIÓN SANTOS<sup>4</sup>

Universidade Federal Rural de Pernambuco - Departamento de Química

**RESUMO** - O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de NaCl (0, 68, 137 e 205 mM) sobre o cultivo *in vitro* de calos de dois genótipos (W64Ao2 e Arizona 8601) de milho (*Zea mays* L.), em meio de cultura N6, suplementado ou não com a adição de 6,0 mM de prolina. Os tratamentos consistiram da combinação dos quatro níveis de NaCl com os dois níveis de prolina, num fatorial 4x2. Os tratamentos foram mantidos durante 60 dias, com subcultivos a cada 20 dias. A taxa de crescimento dos calos e o conteúdo endógeno de putrescina, espermina, espermidina, prolina e outros aminoácidos livres foram avaliados no final do período experimental. A adição de prolina exógena favoreceu o crescimento dos calos no tratamento-controle e minorou os efeitos deletérios do estresse salino em ambos os genótipos, no nível de sal mais elevado (250mM de NaCl). A taxa de crescimento dos calos de W64Ao2 foi superior àquela dos calos de Arizona 8601, possivelmente por causa, em parte, do maior acúmulo de prolina endógena e da manutenção ativa do metabolismo das poliaminas naqueles calos.

**TERMOS ADICIONAIS PARA INDEXAÇÃO:** Aminoácidos, poliaminas, salinidade, *Zea mays*.

## EFFECT OF SALINE STRESS AND EXOGENOUS PROLINE IN MAIZE CALLUS

**ABSTRACT** - This work aimed at evaluating the effect of different NaCl concentrations (0, 68, 137 and 205 mM) in two maize (*Zea mays* L.) genotypes (W64Ao2 and Arizona 8601) callus cultures in N6 medium, supplemented or not with 6.0 mM proline. Treatments consisted of the combinations of the four NaCl levels with the two-proline levels under 4x2 factorial. Treatments were maintained for 60 days with subcultures at 20 days each. Relative growth rate, endogenous free putrescine, spermine, spermidine, proline and others amino acids were evaluated at the end of the experimental period. Proline addition improved callus growth in both genotypes in the control treatment and reduced deleterious effects in the highest salt level (250mM NaCl). W64Ao2 callus growth rate was higher than in the Arizona 8601 probably due, in part, to the higher proline accumulation and the maintenance of polyamine metabolism in those calluses.

**ADDITIONAL INDEX TERMS:** Aminoacids, poliamines, salinity, *Zea mays*.

---

1. Recebido em 21/2/2000 - Aceito em 6/7/2000

2. Agrônoma, Dra., Profa. Adjunto/UFRPE, Pesquisadora CNPq. e-mail tcamara@novaera.com.br

3. Bióloga, Dra., Profa. Adjunto/UFRPE, Pesquisadora do CNPq.

4. Biólogo, Dr., Centro de Investigación y Desarrollo - CSIC, Barcelona, Espanha.

5. Estatístico, Dr., Centro de Investigación y Desarrollo - CSIC, Barcelona, Espanha.

## INTRODUÇÃO

O impacto da salinidade do solo sobre a produtividade agrícola é um sério problema em regiões áridas e semi-áridas, que dependem da irrigação para garantir um adequado suprimento de água para as culturas (Tal, 1984). Dentre os mecanismos de tolerância ao estresse salino, destaca-se a osmorregulação, a qual inclui um aumento líquido na concentração de solutos nas células. O aumento na concentração de solutos em plantas submetidas a estresse desempenha um papel fundamental no equilíbrio osmótico e na proteção de enzimas em presença de elevadas concentrações de eletrólitos no citoplasma (Greenway e Munns, 1980).

Dentre os solutos orgânicos que se acumulam no citoplasma em resposta ao estresse, destacam-se a prolina (Kuznetsov e Shevyakova, 1997; Viégas *et al.*, 1999), a putrescina (Basu e Gosh, 1991; Camara *et al.*, 1998) e carboidratos solúveis (Garcia *et al.*, 1997). Tem-se demonstrado uma correlação positiva entre a acumulação de prolina e a tolerância ao estresse salino, tanto em trabalhos realizados com cultivo *in vitro* (Jain *et al.*, 1991; Camara *et al.*, 1998), como naqueles envolvendo a planta inteira (Storey *et al.*, 1993). Entretanto, a acumulação de prolina pode também ser interpretada como sintoma de danos causados na planta pelo estresse (Hasegawa *et al.*, 1986; Das *et al.*, 1990). Bellinger *et al.*, (1991) sugerem que a acumulação de prolina não é um indicador de resistência e sim um indicador de tolerância adquirida, visto que diversos experimentos demonstram que células, calos e somaclones selecionados como tolerantes ao estresse apresentam uma maior acumulação de prolina do que os não adaptados.

O aumento da concentração de putrescina, como conseqüência do estresse salino, é uma resposta bastante generalizada em plantas (Shevyakova *et al.*, 1985; Basu e Gosh, 1991). Por outro lado, a tolerância ao estresse salino parece estar associada não apenas à capacidade de acumular putrescina, mas em manter ativo o metabolismo das poliaminas, incluindo-se aí a síntese de espermina e espermidina (Tattini *et al.*, 1993; Willadino *et al.*, 1996).

Considerando a importância da acumulação de solutos compatíveis, sobretudo a prolina, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de prolina ao meio de cultura sobre o crescimento de calos de milho submetidos ao estresse salino. Avaliou-se também o efeito da salinidade sobre a acumulação de putrescina, espermina, espermidina, prolina e alguns outros aminoácidos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados calos com 14 meses de idade, provenientes do cultivo de embriões imaturos de dois genótipos de milho: a linha pura W64Ao2, de origem chinesa; e o híbrido Arizona 8601, desenvolvido no Texas para cultivo em áreas salinas (Day, 1987).

Os calos foram obtidos e multiplicados em meio básico N6 (Chu *et al.*, 1975), modificado com 6,0 mM de prolina (Claparols *et al.*, 1993), sendo mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas, fluxo de fótons fotossintético de 90-110  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Foram realizados três subcultivos, sendo um a cada 20 dias. Os tratamentos consistiram da adição de 0, 68, 137 e 205 mM de NaCl ao meio de cultivo, em combinação com 0 e 6 mM de prolina, em um fatorial 4x2, inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento. A taxa de crescimento dos calos (TCC) foi calculada a partir da massa fresca dos calos no início e final do experimento, de acordo com a equação:  $\text{TCC} = [(\ln mf_f - \ln mf_i) / (t_f - t_i) \times 10^3]$  (Galiba *et al.*, 1993), em que  $mf_f$  e  $mf_i$  correspondem à massa fresca final e inicial, e  $t_f$  e  $t_i$  ao tempo final (60 dias) e inicial, respectivamente.

Sessenta dias após o início dos tratamentos, foram coletadas amostras para as análises bioquímicas. Essas amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas à temperatura de  $-80^\circ\text{C}$  até a sua utilização.

As análises de poliaminas (livres + conjugadas) foram realizadas por cromatografia de camada delgada (TLC), segundo Tiburcio *et al.* (1985). Foi determinada a concentração de

putrescina (Put), espermidina (Spd), espermina (Spm) e calculado o total de poliaminas (PAs), a partir do somatório da concentração de Put, de Spd e de Spm no tecido.

As concentrações endógenas de prolina (Pro), arginina (Arg), alanina (Ala), glutamina (Gln), glutamato (Glu), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e do total de aminoácidos nos calos foram determinadas por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), utilizando uma coluna Pico-Tag C-18 de 300 x 3,1 mm. Para detecção dos aminoácidos, foi utilizado um detector de ultra-violeta a 254 nm (Pons *et al.*, 1991). Problemas técnicos no preparo dos extratos de amostra dos calos de W64Ao2 tratados com 205 mM de NaCl provocaram a perda do material, impossibilitando a realização das análises de aminoácidos nesses calos.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o *Statgraph 5.0*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ambos os genótipos observou-se um decréscimo na taxa de crescimento dos calos em função do aumento dos níveis de salinidade no meio de cultura (Tabela 1). Por outro lado, a adição de prolina ao meio de cultura favoreceu o crescimento dos calos no tratamento sem NaCl e minorou o efeito deletério do estresse salino na dose de sal mais elevada (205 mM) promovendo, simultaneamente, maior TCC e maior acúmulo de prolina livre (Tabela 2), em comparação com os calos tratados sem prolina exógena. O efeito benéfico da aplicação de prolina tem sido verificado em diversos tipos de estresse como o salino (Roy *et al.*, 1993), o hídrico (Handa *et al.*, 1986) e aquele induzido pelo frio (Songstad *et al.*, 1990). A prolina ministrada exogenamente pode facilitar o ajuste osmótico e, conseqüentemente, favorecer a manutenção do crescimento sob condições de estresse salino (Hasegawa *et al.*, 1986). Os calos de W64Ao2 tratados com prolina mantiveram uma taxa de crescimento positiva em todos os níveis de salinidade, enquanto que os de Arizona 8601 apresentaram taxa de crescimento

negativa a partir do tratamento com 137mM de NaCl. Em experimentos anteriores realizados com calos embriogênicos desses mesmos genótipos, submetidos a um menor tempo de cultivo *in vitro*, Willadino *et al.*, (1996) obtiveram um maior crescimento e acúmulo de prolina livre dos calos de Arizona 8601 frente aos calos de W64Ao2 quando tratados com NaCl. Deste modo, a exemplo do constatado também por outros pesquisadores (Evans, 1989; Bourgeais-Chalou e Guerrier, 1992) variações induzidas pelo tempo de cultivo *in vitro* podem alterar a resposta dos calos à salinidade.

A composição quantitativa de aminoácidos livres dos calos tratados com e sem prolina, foi afetada pela salinidade do meio (Tabelas 2 e 3). Os tratamentos com 137 e 205 mM de NaCl, em comparação com o tratamento sem sal, promoveram, de uma maneira geral, um acúmulo de Arg, Gln e Glu nos calos de Arizona 8601. No que se refere aos calos de W64Ao2 tratados com 137 mM de NaCl, observou-se um aumento na concentração de Arg, GABA, Ala, Glu e total de Aas, em relação aos calos mantidos sem NaCl. A acumulação de Arg e seus precursores (Gln e Glu) foi observada também em células de *Nicotiana sylvestris* (Shevyakova *et al.*, 1985) e em calos de milho (Willadino *et al.*, 1996) submetidos ao estresse salino. Vários autores demonstraram que o estresse salino promove um incremento na atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) (Roosens *et al.*, 1998; Viégas e Silveira, 1999) e glutamato sintase (GOGAT) (Berteli *et al.*, 1995) envolvidas na assimilação do íon amônio. O ciclo GS/GOGAT provavelmente desempenha um importante papel no suprimento de glutamato para a biossíntese de arginina e prolina em condições de estresse salino (Berteli *et al.*, 1995). A elevada produção de  $\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$ , durante o estresse abiótico, acompanhada de um incremento da via biossintética da Arg, é considerada um mecanismo de desintoxicação do íon amônio produzido (Slocum e Weinstein, 1990; Lovatt, 1990). A capacidade de incorporar esse amônio em condições de estresse, seja salino (Lovatt, 1990), osmótico (Flores e Galston, 1982) ou nutricional (Rabe e Lovatt, 1986), pode

representar um mecanismo homeostático importante frente a condições de estresse em vegetais. O aumento na concentração de Pro livre em condições de estresse é amplamente documentado, tanto em estresse hídrico (Voetberg e Sharp, 1991; van Rensburg *et al.*, 1993) como em estresse salino (Bourgeais-Chaillou e Guerrier, 1992; Cachorro *et al.*, 1993). Em ausência de prolina exógena, o maior acúmulo de prolina livre nos calos de W64Ao2 submetidos ao estresse salino coincidiu com uma maior taxa de crescimento desses calos em comparação com os de Arizona 8601. A prolina parece fazer frente ao efeito inibidor do NaCl sobre o crescimento, contribuindo para uma maior adaptação das plantas e tecidos submetidos a condições adversas (Delauney e Verma, 1993). Entre as diversas funções atribuídas à prolina em tecidos vegetais submetidos a estresse destacam-se a osmorregulação, a manutenção do pH citoplasmático, a proteção contra a desnaturação de enzimas, o seqüestro de radicais livres, além de servir como reserva de carbono e nitrogênio e ser

um dos produtos de desintoxicação do íon amônio (Bellinger *et al.*, 1991; Alia *et al.*, 1993; Fedina *et al.*, 1994). A maior concentração de prolina nos calos tratados com 137 mM de NaCl (Tabela 2) em relação ao mais alto nível de sal (205 mM) nos calos de Arizona 8601 (Tabela 2) coincidiu com uma tendência inversa quanto ao conteúdo de PAs (Tabela 4). Esse mesmo comportamento foi observado nos tratamentos com NaCl e Pro exógena, para os dois genótipos avaliados. Ainda que a principal via biossintética da Pro seja por meio da ciclização do Glu, a Orn e a Arg (precursores das PAs) também podem ser metabolizadas a Pro (Thompson, 1980). Tanto em halófitas como em glicófitas (Kiryan e Shevyakova, 1984), Orn e Arg administradas exogenamente foram, em parte, desviadas para a síntese de Pro em condições de estresse salino. Esses resultados demonstram como a via metabólica das PAs e da Pro estão interligadas em condições de estresse salino, como demonstrado por outros autores (Shevyakova *et al.*, 1985; Camara *et al.*, 1998).

**TABELA 1** – Taxa de crescimento dos calos (TCC) de dois genótipos de milho, em função dos tratamentos com (c) e sem (s) prolina e dos níveis de NaCl.

NaCl mM	Arizona 8601		W64Ao2	
	s/Pro	c/Pro	s/Pro	c/Pro
0	25,58b	46,43a	31,91b	39,30a
68	28,16b	27,17b	29,06c	33,18b
137	-5,03c	-6,38cd	11,06d	11,64d
205	-17,01e	-8,59 d	-4,92f	3,21e

Os valores com a mesma letra, para cada genótipo, não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**TABELA 2** – Concentração de aminoácidos totais (Aas), Prolina, Arginina e Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) em calos de dois genótipos de milho, em função dos tratamentos com (c) e sem (s) prolina e dos níveis de NaCl.

NaCl mM	Total de Aas		Prolina		Arginina		GABA	
	s/Pro	c/Pro	s/Pro	c/Pro	s/Pro	c/Pr	s/Pro	c/Pro
$\mu\text{mol kg mf}^{-1}$								
Arizona 8601								
0	34.656cd	22.955e	731f	6.664c	314c	101e	8.040b	4.399cd
68	16.206f	31.698d	792f	8.993b	182e	243d	3.301d	5.003c
137	34.318cd	40.467b	1.826e	11.039a	617a	323c	7.047b	2.759d
205	36.970c	46.019a	817f	4.858d	402b	615a	20.117a	21.863a
W64Ao2								
0	22.944d	46.406b	545e	19.657b	0,0e	0,0e	1.985c	2.620b
68	25.442d	44.182b	991e	21.715a	142b	67c	2.240c	2.071c
137	42.120c	58.704a	1.743d	15.690c	50d	201a	4.512a	4.197a
205	-	-	-	-	-	-	-	-

Os valores com a mesma letra, para cada variável e genótipo, não apresentam diferença significativa, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Quanto ao efeito isolado da salinidade (sem prolina exógena), observou-se nos calos de W64Ao2 um acúmulo de PAs totais em todos os tratamentos com NaCl (Tabela 4). Os calos de Arizona 8601, entretanto, apresentaram, nas doses mais baixas de NaCl (68 e 137 mM NaCl), uma redução na concentração total de PAs em relação ao tratamento-controle. Quando submetidos ao tratamento com 205 mM de NaCl,

registrou-se nesses calos um aumento na concentração total de PAs como reflexo da acumulação de Put e Spm. Por outro lado, o aumento na concentração total de PAs, nos calos de W64Ao2, refletiu o acúmulo de Put, bem como de Spd e Spm. Nesses calos, parece não haver ocorrido inibição da síntese das poliaminas com o aumento da salinidade. A capacidade de manter ativo o metabolismo das poliaminas em condições

**TABELA 3** – Concentração de Alanina, Glutamina e Glutamato em calos de dois genótipos de milho, em função do tratamento com (c) e sem (s) prolina exógena e dos níveis de NaCl.

NaCl mM	Alanina		Glutamina		Glutamato	
	s/Pro	c/Pro	s/Pro	c/Pro	s/Pro	c/Pro
$\mu\text{mol kg mf}^{-1}$						
Arizona 8601						
0	18.747a	7.748d	1.643b	857e	1.111e	373f
68	6.837de	11.633c	1.207d	1.223d	1.334de	1.474d
137	13.236b	13.839b	2.267a	2.223a	5.497a	4.960b
205	5.862e	6.751de	1.481c	1.574bc	4.406c	5.721a
W64Ao2						
0	11.436e	15.890c	3.474a	2.548cd	513c	496c
68	13.527d	12.299de	3.190b	2.421d	450c	497c
137	24.214b	26.527 <sup>a</sup>	2.792c	3.181b	1.478a	1.271b
205	-	-	-	-	-	-

Os valores com a mesma letra, para cada variável e genótipo, não apresentam diferença significativa, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

de estresse já foi registrado anteriormente (Tattini *et al.*, 1993; Willadino *et al.*, 1996; Camara *et al.*, 1998) e parece ter assegurado aos calos de W64Ao2 um melhor crescimento em relação aos calos de Arizona 8601 (Tabela 1).

Considerando-se os calos de ambos os genótipos quando cultivados em presença de Pro, observou-se um aumento na concentração de Put

a partir da dose de 137 mM de NaCl (Tabela 4). O acúmulo dessa diamina foi acompanhado pelo aumento na concentração de seu precursor, o aminoácido Arg (Tabela 2), o que sugere uma ativação da enzima ADC (arginina carboxilase) em condições de estresse, como constatado por outros autores (Smith, 1985; Flores, 1990).

**TABELA 4** – Concentração de poliaminas totais (PAs), putrescina, espermidina e espermina em calos de dois genótipos de milho, em função do tratamento com (c) e sem (s) prolina e dos níveis de NaCl.

NaCl	Total de PAs		Putrescina		Espermidina		Espermina		
	mM	s/Pro	c/Pro	s/Pro	c/Pro	s/Pro	c/Pro	s/Pro	c/Pro
$\mu\text{mol kg mf}^{-1}$									
Arizona 8601									
0	1.161c	896e	393d	394d	202c	224c	566b	278e	
68	867e	1.702b	370de	363de	205c	676a	292e	663a	
137	660f	1.014d	304e	576b	94e	148d	262e	290e	
205	1.165c	1.913a	501c	1.299a	201c	271b	463c	343d	
W64Ao2									
0	1.296e	1.586d	560f	930d	465e	438ef	271f	218g	
68	1.622d	1.023f	794e	376g	413f	355g	415c	292e	
137	2.565b	1.819c	1.354b	1.013c	853a	628c	358d	178h	
205	1.937c	2.732a	882d	1.590a	572d	688b	483a	454b	

Os valores com a mesma letra, para cada variável e genótipo, não apresentam diferença significativa, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Em síntese, os tratamentos com NaCl promoveram uma redução na taxa de crescimento dos calos. A adição de prolina ao meio de cultura favoreceu o crescimento dos calos no tratamento sem NaCl e reduziu o efeito prejudicial do mais alto nível de sal, em ambos genótipos. Os calos de

W64Ao2 mantiveram uma taxa de crescimento positiva na maioria dos tratamentos com NaCl, possivelmente em função de um maior acúmulo de prolina, bem como pela manutenção do metabolismo das poliaminas em condições de estresse salino.

## REFERÊNCIAS

- ALIA, P.; SARADHI, P. and MOHANTY, P. Proline in relation to free radical production in seedlings of *Brassica juncea* raised under sodium chloride stress. **Plant and Soil**, 155/156:497-500, 1993.
- BASU, R. and GOSH, B. Polyamines in various rice genotypes with respect to sodium chloride salinity. **Plant Physiology**, 82:575-581, 1991.
- BELLINGER, Y; BENSOUAD, A. and LARHER, F. Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance. In: ACEVEDO, E.; CONESA, A.P. AND SRIVASTAVA, J.P. (Eds.) *Physiology- breeding of winter cereals for stressed mediterranean environments*. INRA, 449-458. 1991.
- BERTELI, F.; CORRALES, E.; GUERRERO, C.; ARIZA, M.J.; PILEGO, F. and VALPUESTA, L. Salt stress increase ferredoxin-dependent glutamate synthase activity and protein level in the leaves of tomato. **Physiologia Plantarum**, 93:259-264, 1995.
- BOURGEAIS-CHAILLOU, P. and GUERRIER, G. Salt response in *Lycopersicon esculentum* calli and whole plants. **Journal of Plant Physiology**, 140:495-501, 1992.
- CACHORRO, P.; ORTIZ, A. and CERDA, A. Growth, water relations and solute composition of *Phaseolus vulgaris* under saline conditions. **Plant Science**, 95:23-29, 1993.
- CAMARA, T.R.; WILLADINO, L.; TORNE, J.M.; SANTOS, M.A. Efeito da putrescina e do estresse salino em calos de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 10:153-156, 1998.
- CLAPAROLS, I.; SANTOS, M.A. and TORNE, J.M. Influence of some exogenous amino acids on the production of maize embryogenic callus and on endogenous amino contents. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 34:1-11, 1993.
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; CHU, C.Y. AND BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. **Science Sinica**, 18:659-668, 1975.
- DAS, N.; MISRA, M. and MISRA, A. Sodium chloride salt stress induced metabolic changes in callus cultures of Pear millet: free solute accumulation. **Journal of Plant Physiology**, 137: 244-246, 1990.
- DAY, A.D. Registration of Arizona 8601 maize germoplasm for saline environments. **Crop Science**, 27:1069, 1987.
- DELAUNEY, A.J. and VERMA, D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. **The Plant Journal**, 4:215-223, 1993.
- EVANS, P. Somaclonal variations: genetic basis and breeding applications. **Theoretical and Applied Genetic**, 77:889-464, 1989.
- FEDINA, I.S.; TSONEV, T.D. and GULEVA, E.I. ABA as a modulator of the response of *Pisum sativum* to salt stress. **Journal of Plant Physiology**, 143:245-249, 1994.
- FLORES, H.E. Polyamines and Plant Stress. In: FLORES, H.E. (Ed.) **Stress Response in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms**. Willey-Liss Inc., 1980. p.217-239, 1990.
- FLORES, H.E. and GALSTON, A.W. Polyamine and plant stress: activation of biosynthesis by osmotic shock.. **Science**, 217:1259-1260, 1982.
- GALIBA, G.; KAUR-SAWHNEY, R. and GALSTON, A.W. Chromosomal localization of osmotic and salt stress-induced differential alterations in polyamine content in wheat. **Plant Science**, 92:203-211, 1993.
- GARCIA, A.B.; ENGLER, J.A.; IYER, S.; GERAT, S.T.; MONTAGU, M.V. and CAPLAN, A.B. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. **Plant Physiology**, 115:159-169, 1997.



- GREENWAY, H. and MUNS, R. Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. **Annual Review of Plant Physiology**, 31:149-190, 1980.
- HANDA, S.; HANDA, A.K.; HASEGAWA, P.M. and BRESSAN, R. Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. **Plant Physiology**, 80:938-945, 1986.
- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.D. and HANDA, A.K. Cellular mechanism of salinity tolerance. **HortScience**, 21:1317-1324, 1986.
- JAIN, S.; NAINAWATEE, H.S.; JAIN, R.K. and CHOWDHURY, J. B. Proline status of genetically stable salt-tolerant *Brassica juncea* somaclones and their parent cv. Prakash. **Plant Cell Reports**, 9:684-687, 1991.
- KIRYAN, I.G. and SHEVYAKOVA, N.I. Proline accumulation pathway in NaCl resistant line of *Nicotiana sylvestris* cells. **Fiziol Rast**, 31:712-720, 1984.
- KUZNETSOV, V.V. and SHEVYAKOVA, N.I. Stress response of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. **Physiologia Plantarum**, 100:320-326, 1997.
- LOVATT, C.J. Stress alters ammonia and arginine metabolism. In: FLORES, H.E.; ARTECA, R.N. and SHANNON, J.C. (Eds.) **Polyamines and ethylene biochemistry, physiology and interactions**. American Society of Plant Physiologist, 1990. p.166-179.
- PONS, A.; ESTEVES, T.; PONS, S. and ERITJA, R. Determinación del contenido de hidroxiprolina en el cuero. In: CONGRESO DE LA IUTCS, 11, Barcelona, 1991. Anales. Barcelona, 1991. p.24-31.
- RABE, E. and LOVATT, C. Increased arginine biosynthesis during phosphorus deficiency. **Plant Physiology**, 81:774-779, 1986.
- ROOSENS, N.H.C.J.; TRAN, T.T.; HAYATI, M.I. and JACOBS, M. Isolation of the ornithine- $\alpha$ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on ornithine expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 117:263-271, 1998.
- ROY, D.; BASU, N.; BHUNIA, A. and BANERJEE, S.K. Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt-sensitive cultivar of rice. **Biologia Plantarum**, 35:69-72, 1993.
- SHEVYAKOVA, N.I.; STROGONOV, B.P. and KIRYAN, G.I. Metabolism of polyamines in NaCl-resistant cell lines from *Nicotiana sylvestris*. **Plant Growth Regulation**, 3:365-369, 1985.
- SLOCUM, R.D. and WEINSTEIN, H. Stress induced putrescine accumulation as a mechanism of ammonia detoxification in cereal leaves. In: FLORES, H.E.; ARTECA, R.N. and SHANNON, J.C. (Eds.) **Polyamines and ethylene biochemistry, physiology and interactions**. American Society of Plant Physiologist, 157-165, 1990.
- SMITH, T.A. Polyamines. **Annual Review of Plant Physiology**, 36:117-143, 1985.
- SONGSTAD, D.D.; DUNCAN, D.R. and WIDHOLM, J.M. Proline and polyamine involvement in chilling tolerance of maize suspension culture. **Journal of Experimental Botany**, 41:289-294, 1990.
- STOREY, R.; GORHAM, J.; PITMAN, M.G.; HANSON, A.D. and CAGE, D. Response of *Melanthera biflora* to salinity and water stress. **Journal of Experimental Botany**, 44:1551-1560, 1993.
- TAL, M. Physiological genetics of salt resistance in higher plants. In: STAPLESS, R.C. and TONNIESEN, H.E. (Eds.) **Salinity tolerance in plants**. John Wiley and Sons, 301-320, 1984.
- TATTINI, B.Y.; HEIMLER, D.; TRAVERSI, M.L. and PIERONI, A. Polyamine analysis in salt stressed plants of olive. **Journal of Horticultural Science**, 68:613-617, 1993.
- THOMPSON, J.F. Arginine synthesis, proline synthesis, and related process. In: STUMPF,

- E.E.; CONN, A. **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 375-408, 1980.
- TIBURCIO, A.F.; KAUR-SAWHNEY, R.; INGERSOLL, R.B. and GALSTON, A.W. Correlation between polyamines and pyrrolidine alkaloids in developing tobacco callus. **Plant Physiology**, 78:323-326, 1985.
- van RENSBURG, L.; KRUGER, G.H.J. and KRUGER, H. Proline accumulation as drought-tolerance selection criterious: its relationship to membrane integrity and chloroplast ultrastructure in *Nicotiana tabacum*. **Journal Plant Physiology**, 141:188-194, 1993.
- VIÉGAS, R.A. and SILVEIRA, J.A.G. Ammonia assimilation and proline accumulation in young cashew plants during long term exposure to NaCl-salinity. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11:153-159, 1999.
- VIÉGAS, R.A.; MELO, A.R.B. and SILVEIRA, J.A.G. Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew in response to salt (NaCl) shock. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 11:21-28, 1999.
- VOETBERG, G.S. and SHARP, R.E. Growth of the maize primary root at low water potentials. III. Role of increased proline deposition in osmotic adjustment. **Plant Physiology**, 96:1125-1130, 1991.
- WILLADINO, L.; CAMARA, T.; BOGET, N.; CLAPAROLS, I. and TORNE, J.M. Polyamine and free amino acid variations in NaCl-treated embryogenic maize callus from sensitive and tolerant cultivars. **Journal of Plant Physiology**, 147:179-185, 1996.