

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE CAFEIEIRO SUBMETIDAS A DIFERENTES REGIMES HÍDRICOS

Daniela D. FRIES¹; Sidnei DEUNER¹; José D. ALVES¹; Patrícia F. P. GOULART²; André A. LIMA¹; Ilisandra ZANANDREA¹; Neidiquele M. SILVEIRA¹; Paola C. HENRIQUE²

¹ Setor de Fisiologia Vegetal/DBI/UFLA, Lavras, MG; ² Unilavras, Rua Padre José Poggel, 506, Centenário, 37200-000 Lavras (MG)

Resumo:

Plantas sujeitas a períodos de escassez de água têm seu crescimento e produtividade prejudicados principalmente, devido a restrição imposta à fixação fotossintética do CO₂. Para o cafeeiro, o fechamento estomático, que ocorre após um curto período de estresse hídrico, tem sido considerado como o indicador primário da falta de água, juntamente com uma queda na taxa fotossintética líquida. Ao mesmo tempo, a absorção do excesso de energia resultante do aumento na fração do fluxo de fótons fotossintéticos que não foram utilizados na fotossíntese nem dissipados como calor, promove aumentos na formação de espécies reativas de oxigênio, desencadeando o estresse oxidativo. Neste contexto, objetivou-se avaliar a capacidade antioxidante de mudas de cafeeiro submetidas a diferentes regimes hídricos. Para isso, mudas de cafeeiro *Coffea arabica*, cultivar Catuai IAC 99, com 8 meses de idade foram submetidas a capacidade de campo (CC), suspensão gradativa da irrigação (SG) e suspensão total da irrigação (ST). Avaliações do potencial hídrico foram realizadas na antemãhã (6h). A determinação da peroxidação lipídica e atividade das enzimas; dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutathiona (GR) foram realizadas em folhas coletadas às 17 h. A peroxidação lipídica aumentou somente nas plantas que foram submetidas a ST, sendo esse aumento verificado a partir dos 15 dias do início do experimento e atingindo uma maior diferença aos 21 dias. A atividade das enzimas aumentou com a imposição do estresse, sendo mais expressiva nas plantas que tiveram a suspensão total da irrigação. A imposição gradativa do estresse hídrico influenciou em menor intensidade no estresse oxidativo.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, estresse oxidativo, estresse hídrico.

ANTIOXIDANT CAPACITY IN COFFEE PLANTS SUBMITTED TO DIFFERENT WATER STATUS

Abstract:

Plants submitted to water limitation have their growth and productivity hampered mainly due the restriction imposed by photosynthetic fixation of CO₂. For coffee, the stomatic closure, that occur after a short period of water stress, has been considered as a primary indicator of water deficit, jointly with a drop net photosynthetic rate. Concomitantly, the uptake of excess of energy resulting from the increase in photosynthetic photon flux portion that were not used in photosynthesis neither dissipated as heat, promoting the increases in species reactive to oxygen, triggering the oxidative stress. For this purpose the present research aimed to evaluate the antioxidant capacity of coffee seedlings submitted to different water status. For this purpose, *Coffea arabica* cultivar Catuai IAC 99, with 8 months old were submitted to field capacity (CC), gradative suspension of irrigation (SG) and total suspension of irrigation (ST). Evaluations of water potential activity were realized at 6h. The determination of lipidic peroxidation and the enzymes activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione reductase (GR) in leaves were realized 17h. There was an increase in lipidic peroxidation only in plants submitted in ST, being this increase verified since 15 days from the experiment beginning and reaching the highest difference at 21 days. All enzymes activity increased with stress imposition, being more expressive in plants with total water suspension. The gradative imposition of water stress influenced in lower intensity than the oxidative stress.

Key words: *Coffea arabica*, oxidative stress, water stress.

Introdução

A falta de água é um dos fatores ambientais que mais limitam o rendimento das culturas devido, principalmente, à restrição imposta à fixação fotossintética do CO₂ e, conseqüentemente, ao crescimento das plantas.

Grande parte das regiões produtoras de café no Brasil é afetada por condições climáticas desfavoráveis onde é comum a ocorrência de deficiência hídrica em fases fenológicas críticas do cafeeiro (DaMatta, 2004). As plantas sujeitas a períodos de escassez de água têm seu crescimento e produtividade prejudicados. Segundo Rena & Maestri (2000), a falta de água reduz a formação de nós, o que implicará em menor número de flores e, conseqüentemente, de frutos e sementes.

Para o cafeeiro, o fechamento estomático, que ocorre após um curto período de estresse hídrico, tem sido considerado como o indicador primário da falta de água (Rena & Maestri, 2000), juntamente com uma queda na taxa fotossintética líquida. Ao mesmo tempo, a absorção do excesso de energia resultante do aumento na fração do fluxo de fótons fotossintéticos que não

foram utilizados na fotossíntese nem dissipados como calor, promove aumentos na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$) e oxigênio “singlet” (O_2^1) desencadeando o estresse oxidativo (Asada, 1999; Lima et al., 2002). Dessa forma, a tolerância da planta ao estresse hídrico implica na eliminação desses radicais pelo sistema antioxidante, que envolve um grupo de enzimas, dentre elas, dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e redutase da glutatona (GR). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EAOs, sendo responsável pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ para formar H_2O_2 e O_2 (Gratão et al., 2005). A CAT, a APX e a GOPX são enzimas que catalisam a conversão do H_2O_2 à água e O_2 (Igamberdiev et al., 2002). A GR catalisa a redução dependente de NADPH da glutatona oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH) (Mullineaux et al., 1997). A APX e a GR, assim como a GSH, são importantes componentes do ciclo ascorbato-glutatona, responsável pela remoção do H_2O_2 em diferentes compartimentos celulares (Foyer et al., 2005).

Em cafeeiros, foram verificados aumentos nas atividades da SOD, CAT e APX, mais expressivamente em um clone tolerante a deficiência hídrica (Lima et al., 2002).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade antioxidante de mudas de cafeeiro submetidas a diferentes regimes hídricos: capacidade de campo, suspensão gradativa da irrigação e suspensão total da irrigação.

Material e Métodos

Mudas de cafeeiro *Coffea arabica*, cultivar Catuaí IAC 99, com 8 meses de idade, cultivadas em vasos de 3 litros em casa-de-vegetação, foram submetidas a três regimes hídricos: capacidade de campo (CC), suspensão gradativa da irrigação (SG) e suspensão total da irrigação (ST). No início do estabelecimento dos regimes hídricos os vasos foram pesados e mantidos na CC. A cada 3 dias os vasos submetidos a CC eram pesados e a água perdida pela evapotranspiração repostas. Para o regime de SG, a reposição foi gradativamente decrescendo, ou seja, os vasos eram pesados e a quantidade de água perdida era repostas sendo reduzida 20% a cada três dias até chegar a suspensão total aos 15 dias após o início do experimento. Para o regime de ST, a água foi totalmente suspensa a partir do primeiro dia do experimento.

O potencial hídrico (Ψ_w) foi medido na antemãhã (6 h) com uma câmara de pressão tipo Scholander. As folhas para as análises bioquímicas foram coletadas às 17 h, congeladas em N_2 líquido e posteriormente armazenadas em freezer a $-80^\circ C$. Esse horário foi escolhido após uma avaliação do perfil enzimático diário das enzimas estudadas.

Para a extração das enzimas, duzentos miligramas de tecido foliar foram macerados em N_2 líquido acrescido de 50% de PVPP (Polivinilpolipirrolidona) e homogeneizado em 1,5 mL do seguinte tampão de extração: Fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico 10 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 10 min a $4^\circ C$, o sobrenadante foi coletado e dessalizado em Coluna Sephadex G-25 (PD-10). A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), monitorando-se a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. A catalase foi estimada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 2 min em um meio de reação contendo fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, e H_2O_2 12,5 mM (Havir e McHale, 1987). Para a atividade da redutase da glutatona (GR), baseou-se no método de Cakmak et al. (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH, com decréscimo na absorbância a 340 nm por 2 min. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolis e Reis, 1977), sendo as leituras realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

Resultado e Discussão

A peroxidação lipídica não mostrou grandes variações entre os três regimes hídricos estabelecidos (Figura 1). Verificou-se apenas um aumento significativo para as plantas que tiveram a suspensão total da irrigação (ST) somente a partir dos 15 dias, atingindo uma maior diferença aos 21 dias após o início do experimento. Para as plantas onde a água foi suspensa gradativamente (SG) e também as mantidas na capacidade de campo (CC) não houve diferença na peroxidação lipídica durante o período experimental. Essa pequena diferença na peroxidação lipídica, a qual é um indicativo forte de estresse oxidativo, pode ser devido à alta capacidade das plantas em eliminar a causa, ou seja, as EROs (Bartosz, 1997).

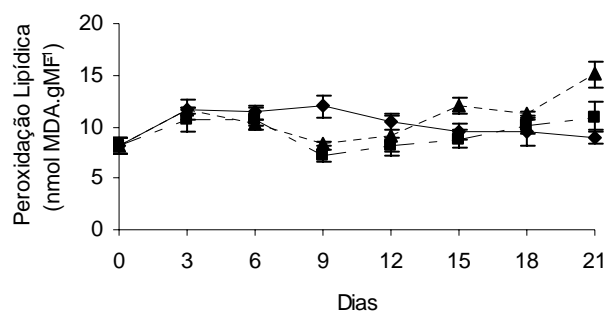


Figura 1. Peroxidação lipídica em plantas de cafeeiro cv. Catuaí submetidas a três regimes hídricos: capacidade de campo (CC, — ◆ —), suspensão gradativa da irrigação (SG, - - ■ - -) e suspensão total da irrigação (ST, --- ▲ ---). A barra indica o erro padrão da média de três repetições.

Enquanto nas plantas que estavam em CC a atividade de todas as enzimas permaneceu constante durante o período de avaliação, o estresse promoveu aumentos significativos, independente da forma de imposição (Figura 2). Foi observado que a SOD, primeira enzima a atuar, realizando a dismutação do radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), teve um aumento significativo a partir de 12 dias, tanto para as plantas que estavam em SG quanto em ST (Figura 2A). Aos 21 dias, houve uma redução na atividade da enzima nas plantas que estavam em ST, o que possivelmente acarretou em maiores danos causados pela peroxidação lipídica (Figura 1).

Embora a SOD faça parte do primeiro ajuste da tolerância das plantas ao estresse oxidativo, seu produto, o H_2O_2 , é também um radical livre e seu acúmulo é tão prejudicial quanto o do superóxido. A eliminação do H_2O_2 pode ser realizada tanto por catalases quanto por peroxidases (Asada, 1999; Willekens et al., 1995). No presente trabalho, a atividade da CAT aumentou em relação ao controle, a partir de 9 dias nas plantas que estavam em ST e a partir de 15 dias naquelas que estavam em SG (Figura 2B). A APX já apresentou uma resposta ao estresse após 3 dias de indução (Figura 2C). O aumento quase linear dessas duas enzimas a partir de 9 dias, principalmente para as plantas em ST, mostra uma grande capacidade antioxidativa, permitindo às plantas tolerarem o estresse hídrico por períodos mais prolongados.

A APX utiliza ascorbato para reduzir o H_2O_2 , e sua importância na tolerância ao estresse oxidativo é muito significativa. Sendo assim, o pool de ascorbato reduzido precisa ser restaurado para manter a atividade dessa enzima, o que é realizado por um grupo de enzimas como redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), redutase do dehidroascorbato (DHAR) e redutase da glutathione (GR). Essas três enzimas, juntamente com a SOD e a APX fazem parte da rota ascorbato/glutathione (Asada, 1999). Da mesma forma que as outras enzimas estudadas, a GR também apresentou um aumento em função do tempo de estresse, sendo significativo a partir de 12 dias, tanto para as plantas em SG quanto em ST (Figura 2D).

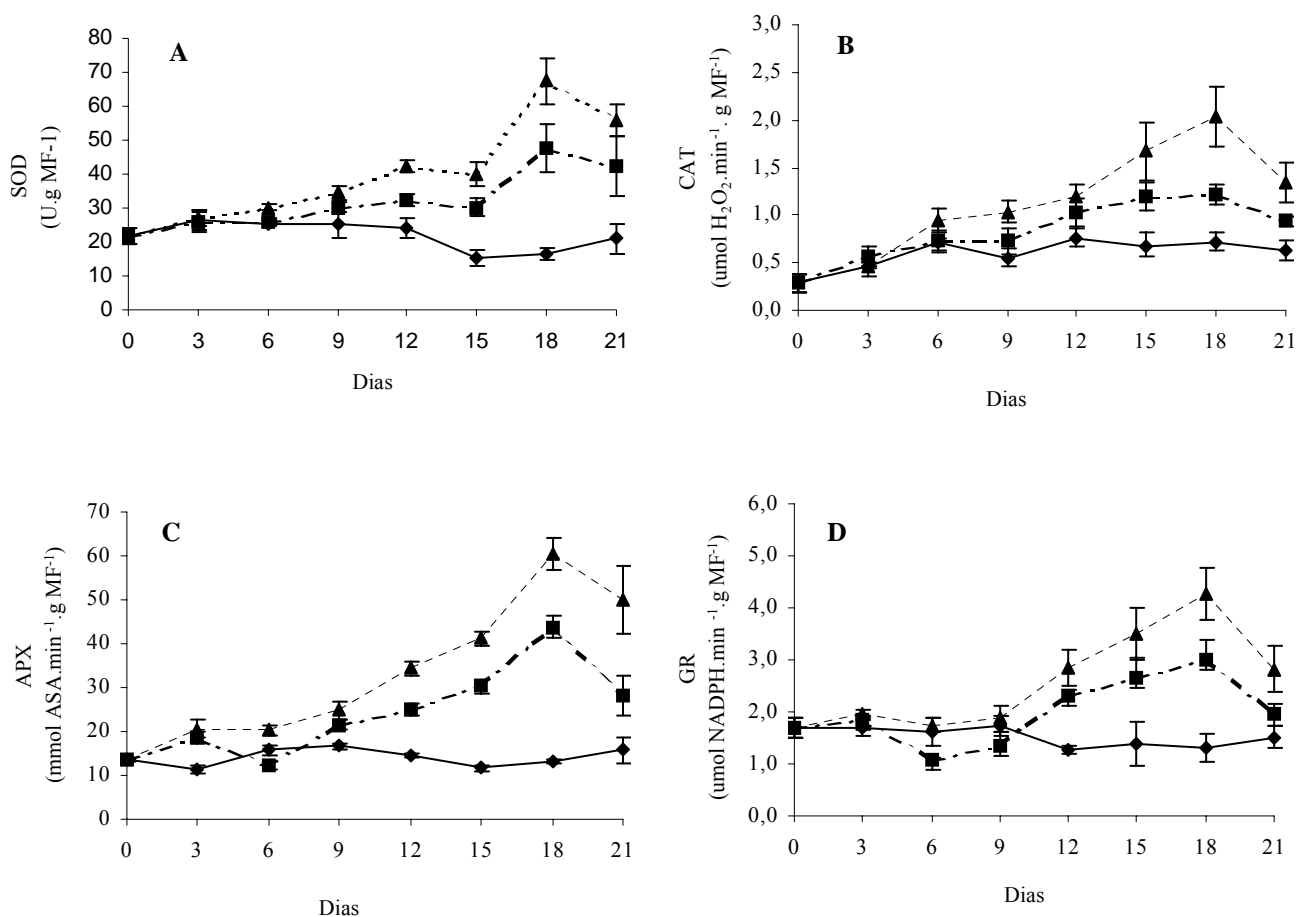


Figura 2. Atividade das enzimas SOD (A), CAT (B), APX (C) e GR (D) em plantas de cafeeiro cv. Catuaí submetidas a três regimes hídricos: capacidade de campo (CC, —◆—), suspensão gradativa da irrigação (SG, ---■---) e suspensão total da irrigação (ST, ---▲---). A barra indica o erro padrão da média de três repetições.

De maneira geral, verificou-se que, nas plantas em que o estresse foi induzido gradativamente, aos 9 dias, quando foi feita a irrigação de apenas 40% e o potencial hídrico estava em -0,66 MPa, os valores das atividades das enzimas estavam próximos aos da CC. Ao mesmo tempo, nas plantas em ST o potencial hídrico já alcançava -2,37 MPa e as atividades da SOD, CAT e APX apresentaram-se superiores às das plantas que estavam em CC.

Em 18 dias de estresse, quando as atividades de todas as enzimas estavam com os valores mais altos, independente da imposição do estresse, o potencial hídrico já alcançava -2,75 MPa, nas plantas em ST, ultrapassando o valor considerado crítico para o cafeeiro (-2,5 MPa). A imposição gradativa do estresse hídrico parece ter influenciado em menor intensidade do estresse oxidativo no período estudado, uma vez que, a atividade de todas as enzimas se manteve inferior a das plantas em ST e não houve diferenças na peroxidação lipídica em relação à CC.

Aos 21 dias, todas as enzimas apresentaram uma pequena queda em suas atividades nas plantas que estavam sob estresse, as quais refletiram em maiores danos à membrana como pode ser observado nos dados de peroxidação lipídica (Figura 1), principalmente nas plantas em ST.

Conclusões

A atividade das enzimas do sistema antioxidante apresenta-se mais expressiva nas plantas que tiveram a suspensão total da irrigação.

A imposição gradativa do estresse hídrico influenciou em menor intensidade no estresse oxidativo.

Referências Bibliográficas

ASADA, K. The water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASADA, K. THE WATER-WATER CYCLE IN CHLOROPLASTS: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiologia Plantarum**, Warsaw, v. 19, n. 1, p. 47-64, 1997.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide- scavenging enzymes in germination wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 260, p. 127-132, Jan. 1993.

DAMATTA, F.M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, p. 1-6, 2004.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

LIMA, A.N.S.; DAMATTA, F.M.; PINHEIRO, H.A.; TOTOLA, M.R.; LOUREIRO, M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239-247, 2002.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

RENA, A.A.; MAESTRI, M. Relações Hídricas no Cafeeiro. **ITEM**, n. 48, p. 34-41, 2000.

WILLEKENS, H.; INZE, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalase in plants. **Molecular Breeding**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 207-228, 1995.