

USO DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO COMO MARCADOR DE TOLERÂNCIA DO CAFFEIRO ARABICA (*Coffea arabica* cv. *Icatu*) ÀS BAIXAS TEMPERATURAS POSITIVAS E SECURA*

AD Rodrigues (Instituto Superior de Agronomia, Portugal), FL Partelli (Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil), JC Ramalho, IM Palos, AS Fortunato e LF Goulao (Centro Eco-Bio/Instituto de Investigação Científica Tropical, Portugal, cochichor@iict.pt). * Apoiado pelo projeto PTDC/AGR-AAM/64078/2006, co-financiado pelo fundo europeu FEDER.

O cultivo do cafeeiro em zonas com incidência frequente de baixas temperaturas positivas pode constituir um problema, tendo em conta a conhecida sensibilidade desta planta ao frio, que limita fortemente o metabolismo fotossintético e o crescimento (DaMatta *et al.*, 1997, *Plant Sci.* 128:43; Barros *et al.*, 1997, *Field Crops Res.* 54:65; Ramalho *et al.*, 2003, *Plant Biol.* 5:631; Silva *et al.*, 2004, *Field Crops Res.* 89:349). Assim, é essencial a escolha adequada de genótipos que apresentem um maior grau de tolerância a este importante factor climático.

Trabalhos anteriores mostraram a existência de diferenças na capacidade de tolerar as baixas temperaturas positivas ao nível foliar, principalmente devido a uma dinâmica de aclimação da maquinaria fotossintética (Ramalho *et al.*, 2003; Batista-Santos *et al.*, 2011, *J. Plant Physiol.*, 168:792) que conta com alterações na matriz lipídica das membranas dos cloroplastos (Campos *et al.*, 2003, *J. Plant Physiol.*, 160:283; Partelli *et al.*, 2011, *Env. Exp. Bot.*, doi:10.1016/j.envexpbot.2011.06.001) e o reforço do sistema antioxidativo (Ramalho *et al.*, 2003; Fortunato *et al.*, 2010, *J. Plant Physiol.* 167:333). Tendo em atenção o último ponto apresentam-se aqui resultados relativamente a *Coffea arabica* cv. *Icatu*, o genótipo que registou anteriormente a maior capacidade de aclimação ao frio, com o objectivo de encontrar marcadores de análise ao nível bioquímico e molecular, por forma a permitir a selecção de cultivares mais adequadas ao plantio. A análise conjunta com a sobreposição de falta de água é também estudada, já que é frequente a ocorrência simultânea destes 2 factores climáticos limitantes nas áreas de implantação da cultura do café.

As plantas de *Coffea arabica* cv. *Icatu* foram cultivadas em vasos de 10 L e mantidas em casa de vegetação. Com cerca de 1,5 ano de idade foram transferidas para câmaras de crescimento (10000 EHHF, ARALAB, Portugal) em condições controladas de temperatura (25/20 °C, dia/noite), irradiância (700-900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), CO_2 (380 $\mu\text{L L}^{-1}$), umidade relativa (70%) e fotoperíodo (12 h). Foram então submetidas a 3 níveis de irrigação de forma a manter cerca de 80, 40 e 20% da capacidade de campo, correspondendo aos tratamentos de Controlo (Ctr-bem irrigado), Estresse Moderado (SM) e Estresse Severo (SS), respectivamente. Após o estabelecimento prévio dos níveis hídricos (cerca de 15 dias), as plantas foram submetidas sucessivamente a um decréscimo gradual da temperatura (0,5 °C por dia) até 13/8 °C, um ciclo de 3 dias a 13/4 °C (3x13/4 °C), seguindo-se um período de 14 dias de recuperação de frio a 25/20 °C (Rec. Frio) e, após rega de todas as plantas, um novo período de recuperação da exposição à secura (Rec. Seca).

As determinações incluíram, entre outras, a avaliação das actividades das enzimas do cloroplasto Cu,Zn-dismutase de superóxido (Cu,Zn-SOD - EC 1.15.1.1) e peroxidase de ascorbato (APX - EC 1.11.1.11), de acordo com Fortunato *et al.* (2010). Para os estudos de expressão génica o RNA total foi extraído com recurso ao uso combinado dos kits “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen, Alemanha) e “Qiagen DNase”. A integridade e concentração do RNA foram verificadas por electroforese em gel 1% de agarose e por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Thermo Scientific). Usaram-se 650 ng de RNA total para síntese de cada cDNA, com o *primer* oligo-(dT)18 e o sistema “SuperScript II first-strand synthesis” (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A expressão dos genes cAPX e SOD1 foi avaliada por PCR quantitativo num iQTM5 Real-Time Detection System (BioRad) com “SYBR Green” como fluoróforo e iniciadores específicos desenhados para a sequência de cada gene. A sequência de cada um dos genes foi identificada nas bases de dados de EST (“Expressed Sequence Tags”) de *Coffea* spp. (Vidal *et al.*, 2010, *Plant Physiol.* 154:1053). Os valores da expressão génica foram normalizados em função da média geométrica de 3 genes de referência (Vandesompele *et al.*, 2002, *Genome Biol.* 3:34.1), cuja expressão é constante no material usado: ubiquitina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e ciclofilina (dados não publicados).

Resultados e conclusões

A exposição a défice hídrico promove o aumento da actividade de enzimas ligadas à defesa antioxidativa de remoção de espécies reactivas de oxigénio (ROS), conforme se pode ver pelo aumento para perto do dobro (APX) ou mais do triplo (Cu,Zn-SOD) das actividades obtidas (Fig. 1). Tal aumentará o potencial de protecção das folhas em caso de sobreposição de outro estresse ambiental, como a exposição a baixas temperaturas positivas (4 °C). A exposição apenas ao frio aumenta igualmente a capacidade antioxidativa, observando-se um acréscimo gradual (APX) ou mais repentino (Cu,Zn-SOD, logo a 18/13 °C) da actividade com a descida gradual de temperatura. Para ambas as enzimas a actividade máxima coincide com a exposição a 4 °C, decrescendo posteriormente. Esta resposta dos mecanismos antioxidativos ao frio (Ramalho *et al.*, 2003; Fortunato *et al.*, 2010) e à seca (Lima *et al.*, 2002, *Envir. Exp. Bot.* 47:239) foram já descritas em *Coffea* spp. Contudo, nota-se que a exposição simultânea a ambos os estresses ambientais incrementa ainda mais as actividades enzimáticas, pelo que este genótipo mostra capacidade de resposta acrescida quando exposto simultaneamente aos 2 estresses. Nos períodos de recuperação os valores de actividade tendem para os respectivos valores controlo.

Relativamente à expressão de genes que codificam estas enzimas, verificou-se um aumento de expressão devido ao défice hídrico em condições controlo de temperatura (25/20 °C), embora para cAPX apenas em SM. Durante a exposição a condições de frio os níveis de expressão são superiores nas plantas submetidas a défice hídrico (excepto SS para cAPX) embora tal expressão tenda a diminuir (Cu,Zn-SOD1) ou a manter-se nalguns dos tratamentos (cAPX). Desta forma, o nível de expressão parece ser aumentado pela exposição a défice hídrico. Em condições de recuperação

hídrica (Rec. Seca) os níveis de expressão aumentam significativamente nas plantas antes sujeitas a déficit hídrico (contrariamente à actividade das enzima), o que eventualmente preparará a planta para um novo episódio de estresse.

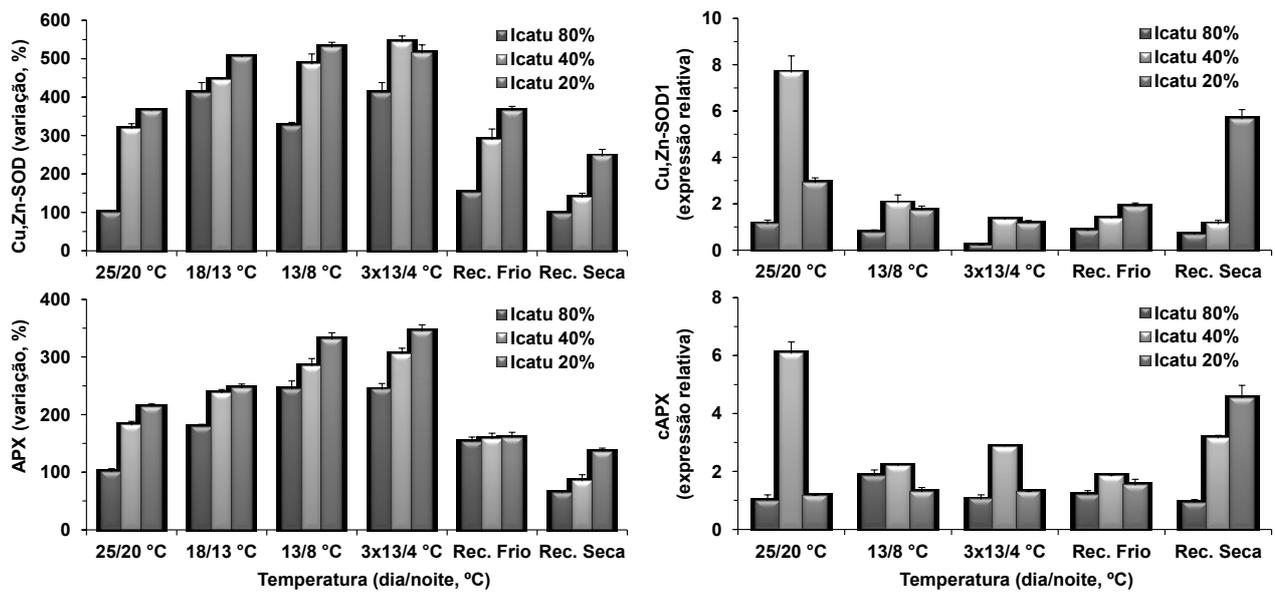


Figura 1. Avaliação da variação percentual das actividades (gráficos à esquerda) e da expressão de genes relacionados (gráficos à direita) das enzimas Cu,Zn-SOD e APX, de folhas recém maduras de plantas de Icatu expostas a 3 níveis hídricos, a diversas temperaturas e nos respectivos períodos de recuperação. Cada barra representa a média \pm erro padrão (n=3-6).

Apesar da importância de ambos os tipos de análise (bioquímica e de expressão de genes), os resultados sugerem que actividade enzimática acompanha de forma mais próxima as respostas da planta/folha às condições ambientais impostas em cada momento, constituindo por isso um bom marcador da capacidade de resposta/aclimatação aos factores de estresse de frio e seca.