



CLEIDE NASCIMENTO CAMPOS

**MELATONINA EXÓGENA NA PROMOÇÃO DE
TOLERÂNCIA DE MUDAS DE *Coffea arabica* L.
AO DÉFICIT HÍDRICO**

LAVRAS – MG

2016

CLEIDE NASCIMENTO CAMPOS

**MELATONINA EXÓGENA NA PROMOÇÃO DE TOLERÂNCIA DE
MUDAS DE *Coffea arabica* L. AO DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Jose Donizeti Alves

Coorientador

Dra. Kamila Dázio Rezende de Souza

LAVRAS - MG

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Campos, Cleide Nascimento.

Melatonina exógena na promoção de tolerância de mudas de *Coffea arabica* L. ao déficit hídrico / Cleide Nascimento Campos. – Lavras: UFLA, 2016.

75 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador: Jose Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. Melatonina. 2. Tolerância à seca. 3. Indolamina. 4. Café.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CLEIDE NASCIMENTO CAMPOS

**MELATONINA EXÓGENA NA PROMOÇÃO DE TOLERÂNCIA DE
MUDAS DE *Coffea arabica* L. AO DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/ Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2016.

Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira UFLA

Dr. Helbert Rezende de Oliveira Silveira EPAMIG

Dr. Jose Donizeti Alves
Orientador

Dra. Kamila Dázio Rezende de Souza
Coorientadora

LAVRAS - MG

2016

Às minhas amadas irmãs, Naiára e Cristiane.

OFEREÇO

*A Eles, meus pais, que aguardam ansiosos a cada retorno meu
e não medem esforços para sonhar comigo, os meus sonhos.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

“Em tudo dei graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco”

I Tessalonicenses 5:18

Ao Senhor Deus, cujo misericordioso amor infinita bondade me permitiu realizar com êxito cada etapa de minha vida, me protegendo e guiando cada passo que dei.

À minha família, por todo amor e compreensão a cada espera.

Aos meus pais, por depositarem em mim toda a sua confiança apoiando sempre meus estudos. A vocês dedico cada uma de minhas conquistas, assim como, o meu amor mais sincero.

Às minhas irmãs por seus tão grandes amor, por sentirem tanto orgulho. Vocês e nosso pequeno são meus tesouros.

Ao Roniel, amor que ganhei do Senhor, por não ter desistido de mim, por ter sido meu refúgio em dias de tormenta, por existir.

Aos “Discípulos de Cristo”, pelo acolhimento e pela companhia na caminhada com Cristo Jesus. O carinho de vocês levarei para sempre.

Aos amigos Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, pela ajuda na execução dos trabalhos, pelo convívio diário, pelos momentos de descontração e pela valiosa amizade.

Ao meu orientador, o Prof. Jose Donizeti Alves, pelos ensinamentos, pela confiança e pelo apoio durante meu mestrado.

À professora Daniela Deitos Fries, por ter me apresentado à Fisiologia vegetal. Obrigada por seus ensinamentos e amizade.

Aos membros da banca examinadora, que gentilmente, aceitaram contribuir com este trabalho.

Aos verdadeiros amigos que aqui fiz, pois fazem parte da minha vida.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, à Lena (*in memorian*), à Lu, ao Barrinha, por cada palavra amiga. Em especial agradeço ao Joel e Odorêncio, pela disposição em ajudar sempre.

Aos professores da Fisiologia Vegetal, por contribuírem com minha formação.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade, e por oferecer suas instalações para a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos pesquisadores, que no silêncio inquieto de seus laboratórios, contribuíram com embasamento intelectual para responder às minhas perguntas.

À todos que contribuíram de alguma forma, minha gratidão!

RESUMO

O café tem grande importância para o cenário mundial, destacando-se como a segunda *commodity* mais comercializada no mundo e quinto produto agrícola mais comercializado do país. No entanto seu cultivo abrange grandes áreas, o expondo a adversidades ambientais, das quais se destaca a crescente escassez hídrica, que se configura no mais limitantes dos fatores ambientais. Assim, na tentativa de aumentar a tolerância das plantas aos diferentes estresses ambientais, surge o interesse pela utilização de substâncias que promovam a tolerância de plantas aos estresses bióticos e abióticos. Dentre essas moléculas destaca-se a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), cuja concentração nas plantas varia nos diferentes tecidos e de acordo com o estágio desenvolvimento, sendo considerada como promotora de tolerância a estresses em plantas. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar a ação da melatonina exógena na indução de tolerância à seca em mudas de *Coffea arabica* L. da cultivar Catuaí 144. Foi observado que a melatonina promoveu tolerância à seca em mudas de *Coffea arabica* L., permitindo melhor desenvolvimento dessas plantas e reduzindo o estresse oxidativo causado pela condição de estresse hídrico.

Palavras-chave: Melatonina. Tolerância à seca. Indolamina. Café.

ABSTRACT

The coffee is very important for the world stage, standing out as the second most traded commodity in the world and fifth most traded agricultural product of the country. However cultivation requires coverage of large areas, exposing environmental adversities, of which highlights the growing water scarcity, which constitutes the most limiting environmental factors. So in an attempt to increase the tolerance of plants to different environmental stresses, arises interest in the use of substances that promote plant tolerance to biotic and abiotic stresses. Among these molecules melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) stands out, plants whose concentration varies in different tissues and according to the development stage, it is regarded as a promoter of stress tolerance in plants. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of exogenous melatonin in inducing tolerance to drought in seedlings *Coffea arabica* L. the cultivar Catuaí 144. It was observed that melatonin promoted drought tolerance in plants of *Coffea arabica* L., allowing for better plant growth and reducing oxidative stress caused by water stress condition.

Key - words: Melatonin. Drought. Tolerance. Coffee. Indolamin.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE		
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
	REFERÊNCIAS	26
	SEGUNDA PARTE - ARTIGO	33
	ARTIGO 1 Melatonina reduz estresse oxidativo e promove tolerância à seca em plantas jovens de <i>Coffea arabica</i> L.	33

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Muito se tem comentado a respeito das alterações climáticas nos últimos tempos, especialmente os seus efeitos, promovendo baixos volumes de precipitação, e temperaturas em patamares mais elevados. Devido a essas mudanças, diversas regiões do globo terrestre estão sendo prejudicadas pela falta de água, em um evento denominado estresse hídrico, que afeta a produtividade de diversas culturas.

Dentre essas culturas destaca-se o café, uma vez que seu cultivo abrange grandes áreas, implicando em exposição a diversas alterações edafoclimáticas, entre as quais se encontra a eminente escassez hídrica. A seca compromete significativamente a produção desta cultura, implicando em redução das taxas fotossintéticas, e por isso reduzindo o crescimento no estágio juvenil, bem como, translocamento de fotoassimilados para os órgãos dreno, na fase adulta, levando com isso, a perda de folhas, florada e comprometendo o enchimento grãos.

O déficit hídrico, é caracterizado como o mais limitante dos fatores ambientais, cujas respostas iniciais são a redução do potencial hídrico foliar, menor condutância estomática e conseqüentemente, redução das taxas fotossintéticas, e síntese de clorofila. Em função desses fatores, há um decréscimo na síntese de sacarose e também um aumento nos níveis celulares de espécies reativas de oxigênio (EROs), ocasionando possíveis estresses oxidativos. Como uma possibilidade de reduzir os danos causados por essas alterações metabólicas, pode ocorrer um aumento no conteúdo celular de osmorreguladores como, a prolina e os açúcares, bem como ativação do sistema antioxidante enzimático e não enzimático, que podem atuar na neutralização das EROs.

Diante desse quadro de alterações ambientais, tem surgido o interesse em cultivar variedades que sejam mais tolerantes a esses estresses, ou mesmo, na utilização de substâncias que podem atuar induzindo a tolerância a estresses em plantas que não possuem essa característica. Dentre essas substâncias destaca-se a melatonina, uma indolamina biogênica, oriunda do triptofano, que tanto pode ser sintetizada pela planta em situações de estresses, quanto pode ser absorvida do meio.

A melatonina é considerada como uma substância promotora de tolerância a estresses em plantas, uma vez que sua síntese é induzida nos vegetais quando estes estão expostos a estresse bióticos ou abióticos. Com isso, é induzida a expressão de genes relacionados a estresses, aumentando a atuação do sistema antioxidante e atenuando os efeitos do estresse oxidativo.

Apesar de se conhecer os benefícios da melatonina em amenizar os danos causados por estresse abióticos, não existe na literaturas dados dessas indolamina referente a indução de tolerância ao estresse hídrico em café. Assim sendo, o presente estudo visou investigar o efeito da melatonina exógena na promoção da tolerância de mudas de *Coffea arabica* L. da cultivar Catuaí 144 ao déficit hídrico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O café tem grande importância para o cenário mundial, destacando-se como a segunda *commodity* mais comercializada no mundo e quinto produto agrícola mais comercializado do país (CONAB, 2015). O café pertence ao gênero *Coffea* e possui duas grandes espécies de importância mundial, *Coffea arabica* e *Coffea canefora*, conhecidos como café arábica e conilon, respectivamente.

No Brasil, na safra de 2014, foi registrado o beneficiamento de aproximadamente 45,3 milhões de sacas, sendo 32,3 milhões de café arábica e 13 milhões de conilon (CONAB, 2015; FAS/USDA, 2015). Nesse aspecto, o café arábica corresponde a 70% da produção brasileira, sendo Minas Gerais o maior estado produtor, correspondendo a 50% da produção nacional, e o sul de Minas Gerais, a região que mais se destaca (CONAB, 2015).

Para a manutenção dessa produtividade, os produtores tendem a expandir o cultivo do café para grande parte de suas áreas, inclusive aquelas marginais ao cafeeiro, o expondo com isso, a adversidades edafoclimáticas relacionadas a diversos fatores, dentro os quais, os veranicos, a sazonalidade, e a crescente escassez hídrica (MELO et al., 2014). Diante desse fato, muito se tem comentado a respeito do efeito do estresse hídrico para o cafeeiro nos últimos anos, uma alteração meteorológica que há décadas não se manifestava com tanta intensidade e durabilidade (MELO et al., 2014; DAMATTA et al., 2010).

Assim sendo, para o sul de Minas Gerais foi verificado apenas 10% do volume de chuva esperado para o início do ano de 2015. Essa irregularidade foi acompanhada da elevação de 20% na evapotranspiração, o que provoca uma acentuada queda na água acumulada no solo, a níveis de déficits observados apenas em secas severas (ALVARENGA, 2014; CONAB, 2015). Além disso, há previsões de que o solo permanecerá em estado de déficit hídrico por todo o ano,

dificultando a absorção de água e conseqüentemente, acarretando em severos danos ao metabolismo vegetal (ALVARENGA, 2014).

Diante desse comportamento atípico das condições climáticas no início de 2014, em diversas regiões do país, com volumes de chuvas inferiores ao padrão histórico e temperaturas em patamares elevados, a produção do café foi altamente afetada. Em vista disso, estimativas sugerem que em 2015 haverá uma colheita de 44,25 milhões de sacas de café beneficiado, valor que representa uma redução de 2,4% quando comparado a produção do ciclo anterior. (CONAB, 2015). Diante disso, respostas adequadas às mudanças ambientais são cruciais para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas, uma vez que a ocorrência de deficiência hídrica influencia negativamente no crescimento vegetal, influenciando em diversos processos fisiológicos, podendo afetar a produção.

O estresse hídrico se configura no mais limitante dos fatores ambientais, dado que, está cada dia mais comum, reduzindo a produtividade das plantas em diversas regiões do globo terrestre (GHANNOUM et al., 2009). Em geral, as respostas ao déficit hídrico se iniciam com a redução da condutância estomática (g_s), que por sua vez, reduz a concentração interna de gás carbônico (C_i), bem como a atividade de carboxilação da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (YARDANOV et al., 2003; GHANNOUM et al., 2003; GHANNOUM et al., 2009; XU et al., 2010).

Sob condições de estresse hídrico a fotossíntese é severamente afetada, sendo observadas interferências na síntese de clorofila e alterações no potencial de água das folhas (Ψ_{folha}) ou mesmo no conteúdo relativo de água (CRA). Dessa maneira, no início do déficit hídrico a capacidade fotossintética é mais elevada, e o rendimento quântico permanece inalterado, uma vez que, o potencial hídrico das folhas ainda é maior que 50%. Com isso, a condutância estomática (g_s) se mantém elevada, mantendo consigo a concentração interna de gás carbônico (C_i). Em contrapartida, se a condição de estresse persistir, o potencial da folha é

sensivelmente reduzido, levando à redução da *gs* e conseqüentemente do *Ci*. Com isso, a atividade carboxilase da Rubisco é reduzida, limitando a atividade fotossintética (YARDANOV et al., 2003; GHANNOUM et al., 2009; XU et al., 2010).

Em função dessa redução na atividade carboxilase da Rubisco, há um acúmulo de NADPH e indisponibilidade de NADP^+ para receber os elétrons ao final da etapa fotoquímica, acarretando em acúmulo de elétrons. Estes por sua vez, serão doados ao oxigênio molecular (O_2) produzindo radicais superóxido (O_2^-), que juntamente com outras espécies reativas de oxigênio (EROS), oriundas do excesso de excitação ao fotossistema II (PSII), inativam os mecanismos de reparo desse fotossistema pela supressão da síntese *de novo* da proteína D1, que constitui o centro de reação do PSII (YAMAMOTO et al, 2008; YAMASHITA et al, 2008; NISHIYAMA et al, 2011).

Além desses danos, o excesso de excitação ao centro de reação P680 do PSII leva à formação do estado tripleto da clorofila *a*, que reage com o O_2 reduzindo-o a oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (SHARMA et al., 2012). Esse $^1\text{O}_2$ então, induz à ocorrência de peroxidação lipídica e por conta disso, ocasiona desestabilização da estrutura da proteína D1 e conseqüentemente do PSII (YAMAMOTO et al, 2008). A peroxidação lipídica leva ao extravasamento do conteúdo celular, rápida dessecação e morte celular, além de afetar na atividade respiratória da mitocôndria, deterioração de pigmentos e fixação de carbono pelo cloroplasto (KARABAL; YÜCEL; ÖKTEM, 2003; FOYER; NOCTOR, 2000; SCANDALIOS, 1993).

Em virtude da baixa assimilação fotossintética, ocorre uma diminuição na síntese de sacarose, que pode ser hidrolisada a hexoses e disponibilizada para diversos processos metabólicos do vegetal, podendo também, ser alocadas em órgãos de reserva para usos posteriores (HAMMOND; WHITER, 2008). Essa redução da síntese de sacarose, leva a privação do fornecimento de açúcares

solúveis, acarretado em alterações fisiológicas e bioquímicas para sustentar a respiração e outros processos metabólicos (XU et al., 2015; ROSA et al., 2009).

Os açúcares solúveis desempenham diversas funções nas plantas, podendo ser aumentados a medida em que se agrava o estresse hídrico, impedindo a oxidação de membranas, e mantendo a estrutura de proteínas (ARABZADEH, 2012). No entanto, sob estresses, as funções desses açúcares não são semelhantes. Assim sendo, a sacarose e a glicose atuam como substratos para a respiração celular ou como osmólitos para manutenção da homeostase celular, funções estas, não desempenhadas pela frutose, uma vez que este açúcar está relacionado à síntese de metabólitos secundários (XU et al., 2015).

Além das diversas funções desempenhadas pelos açúcares no metabolismo vegetal, estas moléculas também apresentam diversas funções antioxidantes, sendo os oligossacarídeos rafínosícos, os frutanos e os dissacarídeos, os principais exemplares (KEUNEN et al., 2013). Dessa maneira, com a intensificação do estresse observa-se uma elevação nos níveis desses carboidratos neutralizando os radicais hidroxila e reduzindo com isso, os danos ao metabolismo vegetal (COUÉE et al., 2006; KEUNEN et al., 2013).

Como já mencionado, embora necessário ao desempenho das funções celulares, o oxigênio, inevitavelmente leva a formação de EROs, em baixas quantidades, em eventos metabólicos naturais dos vegetais, ocorrentes nos cloroplastos pela fotossíntese, nas mitocôndrias pela respiração e nos peroxissomos pela fotorrespiração (BARBOSA et al., 2014; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). Em condições normais, essas EROs são mantidas em baixas concentrações, atuando diretamente no processo de sinalização celular. No entanto, em casos de estresses como o déficit hídrico, há um aumento na produção de EROs, podendo resultar em estresses oxidativos, ocasionando danos às membranas celulares. Diante da necessidade de neutralizar o excesso dessas espécies reativas, as

plantas desenvolveram mecanismos de defesa antioxidante enzimático e não enzimático.

O sistema celular de defesa antioxidante possui uma cascata de eventos, em que a dismutase do superóxido (SOD) atua como primeira linha de defesa. Essa enzima catalisa a dismutação do radical O_2^- a H_2O_2 e O_2 , e modula os níveis celulares de H_2O_2 e O_2 nos cloroplastos, peroxissomos e mitocôndrias, impedindo que seja formado o radical OH^\cdot a partir do O_2 (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; BARBOSA et al., 2014; SHARMA et al., 2012). Após formado, o H_2O_2 é convertido a O_2 e H_2O pela enzima catalase (CAT) (Figura 1) (BARBOSA et al., 2014; SHARMA et al., 2012). Além dessas enzimas, há a ação de diversas peroxidases e desidrogenases, como as compreendidas no ciclo da ascorbato-glutationa, caracterizado por uma série de reações redox acopladas, envolvendo as enzimas peroxidase do ascorbato (APX), redutase do monodehidroascorbato (MDHAR), redutase do dehidroascorbato (DHAR), redutase da glutaciona (GR) e o ascorbato, que é um antioxidante não enzimático (JIMÉNEZ et al., 1998).

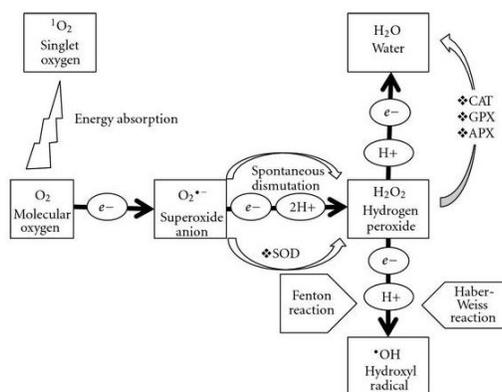


Figura 1 Representação da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e ação do sistema antioxidante enzimático em plantas

Fonte: (SHARMA et al., 2012).

Tendo em vista esses mecanismos, estudos demonstram que sob condições de déficit hídrico a atividade das enzimas antioxidantes se mantém elevada, principalmente sob estresse moderado e severo (SALEKJALALI et al., 2012). Além disso, estudos com *Trifolium repens* L. demonstraram que plantas pré-condicionadas à seca apresentam atividade da enzima SOD aumentada durante o período de seca e após reidratação, quando comparadas às plantas não pré-condicionadas (LI et al., 2013).

A capacidade das plantas em tolerar a seca envolve, além desses mecanismos de defesa antioxidante, o acúmulo de solutos orgânicos de baixo peso molecular e íons inorgânicos, num mecanismo denominado ajustamento osmótico. Durante a seca as plantas acumulam esses solutos a fim de reduzir o potencial osmótico, elevando o potencial hídrico e mantendo o turgor celular em condições ótimas. Ademais, sob influência do estresse, a síntese proteica é inibida e a degradação de proteínas é acelerada, levando a um acúmulo de aminoácidos e aminas livres (DE FATIMA FUMIS; PEDRAS, 2002). Entre esses compostos comumente utilizados pelas plantas como osmorreguladores, destaca-se a prolina e os compostos quaternários de amônio, como a glicinabetaína, que são ativamente acumulados em resposta a estresses abióticos, sobretudo, o estresse hídrico (ASHRAF; HARRIS, 2004).

Nesse sentido, a prolina produzida sob estresses, é acumulada no citosol das células contribuindo para o ajustamento osmótico. Outra importante função da prolina, é que ela forma uma camada de hidratação ao redor das proteínas, impedindo que essas sejam deterioradas pela condição de estresse (BURRITT, 2012). Outrossim, a principal função da prolina no ajustamento osmótico consiste em aumentar a capacidade de resistência à desidratação pela plantas, uma vez que, auxilia na redução do potencial hídrico, permitindo que a água se mova para dentro da célula, minimizando os danos causados pela excesso de íons (KRASENSKY; JONAK, 2012; BURRITT, 2012).

Embora as plantas passem por todas essas alterações em seu metabolismo, de acordo com a duração e intensidade do estresse, as plantas também passam por outras alterações, em que modificam a alocação de biomassa, crescendo menos que as plantas em condições normais de cultivo. Diante disso, o crescimento das plantas e a alocação de biomassa são notavelmente influenciados pela deficiência hídrica, como observado em estudos de arroz (XU et al., 2015), feijão (VALE et al., 2012) e *Pinus radiata* (WAGHORN et al., 2015). Atrelado a isso, são observados, redução da área foliar, espessamento de paredes celulares e espessamento da cutícula (YARDANOV et al., 2003; XU et al., 2010). Adicionalmente, aumentos do sistema radicular de plantas sob seca, bem como da razão raiz/parte aérea podem ser observados como resposta à busca por água no solo (GHANNOUM et al., 2009; VALE et al., 2012).

Na tentativa de aumentar a tolerância das plantas aos diferentes estresses ambientais, surge o interesse pela utilização de substâncias que promovam a tolerância de plantas aos estresses bióticos e abióticos. Dentre essas moléculas destaca-se a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), um composto indólico (indolamina biogênica), oriundo do triptofano e sintetizada a partir da serotonina por advento de uma acetilação (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2006; PAREDES et al., 2009), sendo caracterizada como anfipática. Essa característica confere à melatonina a capacidade de atravessar todas as membranas celulares e entrar em compartimentos subcelulares (SHIDA et al., 1994; ZHANG et al., 2014).

A melatonina é uma indolamina produzida endogenamente em todo o Reino Vegetal e Animal, cuja concentração nas plantas varia nos diferentes tecidos e de acordo com o estágio de desenvolvimento (REITER et al., 2015). A melatonina foi nomeada como tal, devido à sua capacidade de mudar a cor de répteis, anfíbios e peixes (LERNER et al., 1958). Nos vertebrados, atua como

moduladora de humor, sono, comportamento sexual, fisiologia reprodutiva, ritmos circadianos e imunologia (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2006; REITER et al, 2010; HARDELAND et al., 2011; CIPOLLA-NETO et al. de 2014).

Nas plantas, a biossíntese da melatonina ocorre em quatro processos consecutivos, nos quais, o primeiro é catalisado pela descarboxilase do triptofano (TDC), que converte o triptofano em triptamina. Em seguida, a hidroxilase do 5 - triptofano (T5H), hidrolisa, no carbono 5, a triptamina, convertendo-a em serotonina. Por fim, há ação de outras duas enzimas, a N-acetiltransferase da serotonina (SNAT), que converte a serotonina em N-acetilserotonina, e a methyltransferase da N-acetilserotonina (ASMT), que limita rota biossintética pela conversão de N-acetilserotonina em melatonina (Figura 2) (PAREDES et al., 2009; KANG et al., 2013; BYEON et al., 2014; ZHANG et al., 2014).

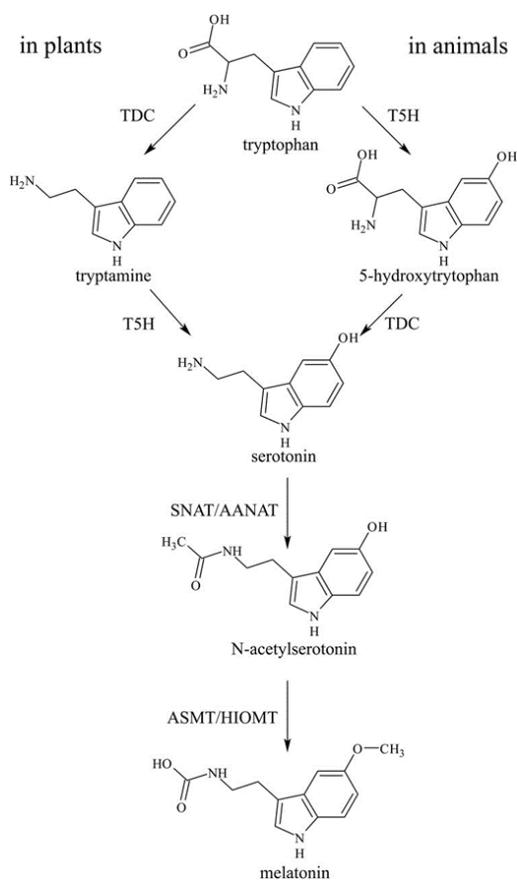


Figura 2 Rota biossintética de melatonina em plantas e animais

Fonte: (ZHANG et al., 2014)

A melatonina é descrita como promotora de tolerância a estresses em plantas (Figura 3) (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2006; ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2007; ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2009; ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2014), uma vez que sua síntese é indutível nos vegetais quando estes estão expostos a estresses bióticos e abióticos, limitando os estresses oxidativos, pela indução da expressão de genes relacionados a estresses, pela redução da peroxidação lipídica e dos níveis de H_2O_2 , e aumento

do sistema antioxidante enzimático, ou mesmo quelando metais pesados (ZHANG et al., 2014; REITER et al., 2015).

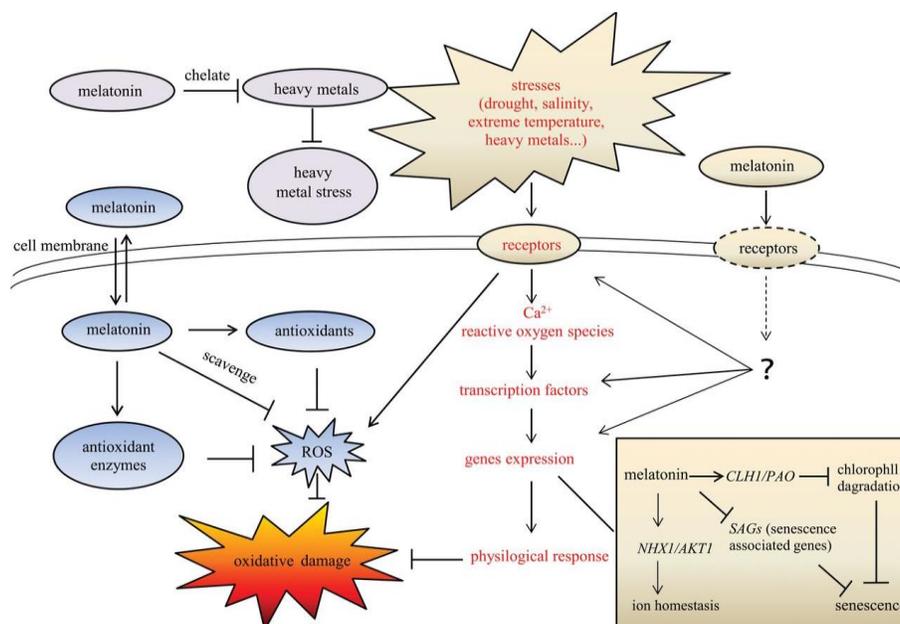


Figura 3 Visão geral das respostas celulares induzidas pelo tratamento com melatonina exógena

Fonte: (ZHANG et al., 2014).

Além disso, a melatonina tanto pode ser sintetizada pela planta quanto absorvida do meio (TAN et al., 2007). Essa característica então, tem despertado na comunidade científica o interesse em usá-la como indutor de resistência a estresses, uma vez que todos os fatores de estresse podem provocar aumentos nos níveis de melatonina (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2006; ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2014; ZHANG et al., 2014). Com a absorção dessa substância, a resposta das plantas sob condições adversas pode ser melhorada.

A melatonina é uma molécula sensível às condições externas, que interferem na sua concentração intracelular. Assim, alterações bruscas nos

fatores ambientais causadores de estresse (luz, temperatura, patógenos, água) levam a aumentos nos níveis celulares de melatonina. Os níveis de melatonina também variam significativamente entre os órgãos, flutuando de picogramas a microgramas por grama de tecido, sendo os níveis mais elevados, encontrados nos órgãos reprodutores (ZHANG et al., 2014).

Desde que a melatonina foi descoberta, há aproximadamente duas décadas, muito se tem estudado sobre o seu efeito nas plantas, e ainda assim, há muito o que investigar. Assim sendo, resultados demonstram que, plântulas de tomate pré-tratadas com melatonina minimizam os impactos negativos da seca pela regulação do sistema antioxidante e redução da produção de substâncias tóxicas, como as EROs (LIU et al., 2015). Ademais foi observado que a aplicação de melatonina alivia os danos ultra-estruturais em estacas de uva cultivadas sob déficit hídrico induzido por polietileno glicol (PEG) (MENG et al., 2014)

Atrelado a isso, folhas e raízes de plantas de pimenta sob elevada radiação produzem mais melatonina que aquelas sombreadas (TAN et al., 2007). As raízes influenciam diretamente na percepção a estresses, uma vez que são sensíveis a qualquer mudança no meio. Nesse órgão, a melatonina é encontrada em maior quantidade nas zonas de crescimento e tem a função de promover o enraizamento, regenerando raízes laterais e adventícias (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2007; PELAGIO-FLORES et al., 2012; KOYAMA et al., 2013; PARK; BACK, 2012).

A aplicação exógena de melatonina em plantas de maçã, promoveu a resistência à mancha, reduzindo a desfolha ocasionada por essa doença implicando, na promoção da imunidade da planta pela melatonina. Paralelamente, a aplicação de 0,1 mM de melatonina compensou o declínio na atividade da CAT, além de promover o aumento na atividade da APX, em relação às plantas controle sem melatonina (YIN et al., 2013).

Pré-tratamentos com melatonina previnem consideravelmente a inibição à fotossíntese e germinação, causadas pela salinidade e estresse hídrico respectivamente, além de proteger contra os danos causados pela baixa temperatura, evitando alterações na estrutura das células, bem como, evitando a apoptose, como observado em Feijão mungo sob baixas temperaturas (SZAFRANSKA et al., 2012) e sementes de pepino sob estresse osmótico e sob baixas temperaturas (ZHANG et al., 2013; POSMYK et al., 2009). A melhoria na performance das plantas expostas a condições adversas em virtude da aplicação de melatonina se deve às funções metabólicas que esse composto apresenta. A melatonina atua exatamente na manutenção do equilíbrio celular (ZHANG et al., 2014). Primeiramente, por ser anfipática, pode facilmente difundir-se pela membrana e alcançar as células. No interior da célula, pode atuar como antioxidante (neutraliza EROs), modular a atividade das enzimas antioxidantes, além de alterar a expressão de genes envolvidos na transdução de sinais para resposta ao estresse (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2014; ZHANG et al., 2014). Nesse sentido, a melatonina promove a proteção de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, contra danos oxidativos (TAN et al., 2000; ALLEGRA et al., 2003; ZHANG et al., 2014).

Condições de estresse induzem a síntese de melatonina em plantas, aliviando os efeitos nocivos dos estresses, particularmente o estresse oxidativo. Em plantas sob seca, a melatonina tem elevada eficiência em anular as respostas adversas aos derivados tóxicos do oxigênio, devido à sua capacidade de neutralizá-los (ALLEGRA et al., 2003). É relatado também, que a aplicação de melatonina suprime a expressão de genes relacionados à senescência, impede a ocorrência da degradação da clorofila (ZHAO et al., 2015), e da redução da eficiência do PSII, impedindo consequentemente a redução da fotossíntese. Adicionado a isso, a produção de H_2O_2 é cessada sob ação da melatonina, e ciclo

da ascorbato-glutationa é aumentado, assim como a atividade das enzimas antioxidantes (WANG et al., 2012).

Evidências apontam que a suplementação com melatonina aumenta a taxa de sobrevivência das plantas sobre estresses, uma vez que, plantas que receberam aplicação de melatonina no solo aumentaram seus níveis de clorofila, melhorando sua altura e biomassa. Esses fatos demonstram, que a melatonina não só protege as plantas contra a ação nociva dos estresses, como também, auxilia na recuperação das plantas após a seca, quando estas são reidratadas (WANG et al., 2014; REITER et al., 2015). Com base nesse vasto número de efeitos benéficos da melatonina, diversos estudos tem utilizado essa molécula como indutora de tolerância à seca, como em pepino (ZHANG et al., 2013), maçã (WANG et al., 2012) e tomate “Micro-Tom” reidratados (WANG et al., 2014).

O café constitui uma cultura de elevada importância econômica para o Brasil, e em decorrência das atuais alterações climáticas, particularmente o excesso de temperatura e restrição hídrica, seu cultivo encontra-se severamente afetado. Em virtude da relação entre a influência dos estresses abióticos e a promoção de tolerância a estes, diversas substâncias tem sido utilizadas.

O uso de substâncias exógenas na promoção de tolerância à estresses bióticos e abióticos é de particular interesse, frente ao atual cenário de alterações climáticas. Dessa maneira, o uso da melatonina pode ser uma alternativa para o aumento da tolerância de cultivares de café ao déficit hídrico. Além disso, a inexistência de trabalhos relacionados à melatonina exógena como promotora de tolerância à seca em cafeeiros oferece a oportunidade de se estudar a ação dessa substância na indução de tolerância a esse estresse abiótico.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, pode-se inferir que a melatonina pode ser uma boa alternativa para a promoção de tolerância de plantas à seca, uma vez que promove aumento do sistema antioxidante, reduzindo os estresses oxidativos. Além disso, inibe a expressão de genes relacionados à senescência, bem como a degradação de clorofila, induz o crescimento de raízes ao se relacionar com hormônios, e com isso melhorando o desempenho fisiológico de plantas sob condição de seca.

REFERÊNCIAS

- ALLEGRA, M.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; GENTILE, C.; TESORIERE, L.; LIVREA, M. A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **Journal of pineal research**, v. 34, n. 1, p. 1-10, 2003.
- ALVARENGA, L. A. Efeito da seca sobre o armazenamento de água no solo para 2014 e impactos futuros sobre as plantas. **Fundação Procafé – Equipe técnica de monitoramento climatológico e de alerta fitossanitário**. 2014.
- ARABZADEH, N. H aloxylon persicum and H aloxylon aphyllum. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 11, n. 1, p. 44-51, 2012.
- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Melatonin promotes adventitious-and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. **Journal of pineal research**, v. 42, n. 2, p. 147-152, 2007.
- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress?. **Trends in plant science**, v. 19, n. 12, p. 789-797, 2014.
- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. **Journal of pineal research**, v. 46, n. 1, p. 58-63, 2009.
- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J. The physiological function of melatonin in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 1, n. 3, p. 89-95, 2006.
- ASHRAF, M. P. J. C.; HARRIS, P. J. C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. **Plant science**, v. 166, n. 1, p. 3-16, 2004.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. D. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BURRITT, D. J. **Proline and the cryopreservation of plant tissues: functions and practical applications**. INTECH Open Access Publisher, 2012.
- BYEON, Y.; LEE, H. Y.; LEE, K.; PARK, S.; BACK, K. Cellular localization and kinetics of the rice melatonin biosynthetic enzymes SNAT and ASMT. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 1, p. 107-114, 2014.

CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G.; AFECHE, S. C.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal of pineal research**, v. 56, n. 4, p. 371-381, 2014.

CONAB . Acompanhamento da safra brasileira de café, v. 2 - Safra 2015, n. 2 - Segundo Levantamento, Brasília, p. 1-59, jun. 2015

COUÉE, I.; SULMON, C.; GOUESBET, G.; EL AMRANI, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 3, p. 449-459, 2006.

DAMATTA, F. M.; GRANDIS, A.; ARENQUE, B. C.; BUCKERIDGE, M. S. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1814-1823, 2010.

DE FÁTIMA FUMIS, T.; PEDRAS, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 37, n. 4, p. 449-453, 2002.

DO VALE, N. M.; BARILI, L. D.; ROZZETO, D. S.; COIMBRA, J. L. M.; GUIDOLIN, A. F.; KÖOP, M. M. Avaliação para tolerância ao estresse hídrico em feijão. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 135-144, 2012.

FAZ/USDA – United States Department of Agriculture/ Foreign Agricultural Service. USA, p. 1-6, december, 2015.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Tansley review no. 112. **New phytologist**, v. 146, n. 3, p. 359-388, 2000.

GHANNOUM, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 635-644, 2009.

GHANNOUM, O.; CONROY, J. P.; DRISCOLL, S. P.; PAUL, M. J.; FOYER, C. H.; LAWLOR, D. W. Nonstomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C4 grasses. **New Phytologist**, v. 159, n. 3, p. 599-608, 2003.

HAMMOND, J. P.; WHITE, P. J. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 1, p. 93-109, 2008.

HARDELAND, R.; CARDINALI, D. P.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; BROWN, G. M.; PANDI-PERUMAL, S. R. Melatonin - A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in neurobiology**, v. 93, n. 3, p. 350-384, 2011.

JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J. A.; PASTORI, G.; DEL RÍO, L. A.; SEVILLA, F. Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. **Plant physiology**, v. 118, n. 4, p. 1327-1335, 1998.

KANG, K.; LEE, K.; PARK, S.; BYEON, Y.; BACK, K. Molecular cloning of rice serotonin N-acetyltransferase, the penultimate gene in plant melatonin biosynthesis. **Journal of pineal research**, v. 55, n. 1, p. 7-13, 2013.

KARABAL, E.; YÜCEL, M.; ÖKTEM, H. A. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. **Plant Science**, v. 164, n. 6, p. 925-933, 2003.

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J. C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.

KEUNEN, E.; PESHEV, D.; VANGRONSVELD, J.; VAN DEN ENDE, W.; CUYPERS, A. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, cell & environment**, v. 36, n. 7, p. 1242-1255, 2013.

KOYAMA, F. C.; CARVALHO, T. L.; ALVES, E.; DA SILVA, H. B.; AZEVEDO, M. F.; HEMERLY, A. S.; GARCIA, C. R. The Structurally Related Auxin and Melatonin Tryptophan-Derivatives and their Roles in *Arabidopsis thaliana* and in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 646-651, 2013.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 4, p. 1593-1608, 2012.

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T. H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocyteS1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587-2587, 1958.

LI, Z.; SHI, P.; PENG, Y. Improved drought tolerance through drought preconditioning associated with changes in antioxidant enzyme activities, gene expression and osmoregulatory solutes accumulation in white clover (*Trifolium repens* L.). **Plant Omics**, v. 6, n. 6, p. 481, 2013.

LIU, J.; WANG, W.; WANG, L.; SUN, Y. Exogenous melatonin improves seedling health index and drought tolerance in tomato. **Plant Growth Regulation**, v. 77, n. 3, p. 317-326, 2015.

MELO, E. F.; FERNANDES-BRUM, C. N.; PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M. D.; CHALFUN-JÚNIOR, A. Anatomic and physiological modifications in seedlings of *Coffea arabica* cultivar Siriema under drought conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 1, p. 25-33, 2014.

MENG, J. F.; XU, T. F.; WANG, Z. Z.; FANG, Y. L.; XI, Z. M.; ZHANG, Z. W. The ameliorative effects of exogenous melatonin on grape cuttings under water-deficient stress: antioxidant metabolites, leaf anatomy, and chloroplast morphology. **Journal of pineal research**, v. 57, n. 2, p. 200-212, 2014.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; MURATA, N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Physiologia Plantarum**, v. 142, n. 1, p. 35-46, 2011.

PAREDES, S. D., KORKMAZ, A., MANCHESTER, L. C., TAN, D. X., & REITER, R. J. Phytomelatonin: a review. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 1, p. 57-69, 2009.

PARK, S.; BACK, K. Melatonin promotes seminal root elongation and root growth in transgenic rice after germination. **Journal of pineal research**, v. 53, n. 4, p. 385-389, 2012.

PELAGIO-FLORES, R.; MUÑOZ-PARRA, E.; ORTIZ-CASTRO, R.; LÓPEZ-BUCIO, J. Melatonin regulates *Arabidopsis* root system architecture likely acting independently of auxin signaling. **Journal of pineal research**, v. 53, n. 3, p. 279-288, 2012.

POSMYK, M. M.; BAŁABUSTA, M.; WIECZOREK, M.; SLIWINSKA, E.; JANAS, K. M. Melatonin applied to cucumber (*Cucumis sativus* L.) seeds improves germination during chilling stress. **Journal of pineal research**, v. 46, n. 2, p. 214-223, 2009.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking molecule. **Progress in brain research**, v. 181, p. 127-151, 2010.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; ZHOU, Z.; CRUZ, M. H. C.; FUENTES-BROTO, L.; GALANO, A. Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7396-7437, 2015.

ROSA, M.; PRADO, C.; PODAZZA, G.; INTERDONATO, R.; GONZÁLEZ, J. A.; HILAL, M.; PRADO, F. E. Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 5, p. 388-393, 2009.

SALEKJALALI, M.; HADDAD, R.; JAFARI, B. Effects of soil water shortages on the activity of antioxidant enzymes and the contents of chlorophylls and proteins in barley. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v. 12, n. 1, p. 57-63, 2012.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant physiology**, v. 101, n. 1, p. 7, 1993.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, 2012.

SHIDA, C. S.; CASTRUCCI, A. M. L.; LAMY-FREUND, M. T. High melatonin solubility in aqueous medium. **Journal of pineal research**, v. 16, n. 4, p. 198-201, 1994.

SZAFRAŃSKA, K.; GLIŃSKA, S.; JANAS, K. M. Changes in the nature of phenolic deposits after re-warming as a result of melatonin pre-sowing treatment of *Vigna radiata* seeds. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 1, p. 34-40, 2012.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R.; PRADO, F. M.; REITER, R. J. Novel rhythms of N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine and its precursor melatonin in water hyacinth: importance for phytoremediation. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 8, p. 1724-1729, 2007.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J.; PLUMMER, B. F.; LIMSON, J.; WEINTRAUB, S. T.; QI, W. Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin

biotransformation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 11, p. 1177-1185, 2000.

WAGHORN, M. J.; WHITEHEAD, D.; WATT, M. S.; MASON, E. G.; HARRINGTON, J. J. Growth, biomass, leaf area and water-use efficiency of juvenile *Pinus radiata* in response to water deficits. **New Zealand Journal of Forestry Science**, New Zealand v. 45, n. 1, p. 3, 2015.

WANG, L.; ZHAO, Y.; REITER, R. J.; HE, C.; LIU, G.; LEI, Q.; ZUO, B.; ZHENG, X. D.; LI, Q.; KONG, J. Changes in melatonin levels in transgenic 'Micro-Tom' tomato overexpressing ovine AANAT and ovine HIOMT genes. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 2, p. 134-142, 2014.

WANG, P.; YIN, L.; LIANG, D.; LI, C., MA, F.; YUE, Z. Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. **Journal of pineal research**, v. 53, n. 1, p. 11-20, 2012.

XU, W.; CUI, K.; XU, A.; NIE, L.; HUANG, J.; PENG, S. Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 37, n. 2, p. 1-11, 2015.

XU, Z.; ZHOU, G.; & SHIMIZU, H. Plant responses to drought and rewatering. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 6, p. 649-654, 2010.

YAMAMOTO, Y. et al. Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. **Photosynthesis Research**, v. 98, n. 1-3, p. 589-608, 2008.

YAMASHITA, A. et al. Quality control of photosystem II reactive oxygen species are responsible for the damage to photosystem II under moderate heat stress. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 283, n. 42, p. 28380-28391, 2008.

YARDANOV, I.; VELIKOVA, V.; TSONEV, T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Bulgaria Journal Plant Physiology**, Bulgaria, n. Special Issue, p. 187-206, 2003.

YIN, L.; WANG, P.; LI, M.; KE, X.; LI, C.; LIANG, D.; WU, S.; MA, X.; LI, C.; ZOU, Y.; MA, F. Exogenous melatonin improves *Malus* resistance to Marssonina apple blotch. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 4, p. 426-434, 2013.

ZHANG, N.; SUN, Q.; ZHANG, H.; CAO, Y.; WEEDA, S.; REN, S.; GUO, Y. D. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. **Journal of Experimental Botany**, p. eru336, 2014.

ZHANG, N.; ZHAO, B.; ZHANG, H. J.; WEEDA, S.; YANG, C.; YANG, Z. C.; REN, S.; GUO, Y. D. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 15-23, 2013.

ZHAO, H.; SU, T.; HUO, L.; WEI, H.; JIANG, Y.; XU, L.; MA, F. Unveiling the mechanism of melatonin impacts on maize seedling growth: sugar metabolism as a case. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 2, p. 255-266, 2015.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

ARTIGO 1 Melatonina reduz estresse oxidativo e promove tolerância à seca em plantas jovens de *Coffea arabica* L.

Normas da revista Crop Science (Versão preliminar)

Cleide Nascimento Campos^{1*}, Roniel Geraldo Ávila¹, Kamila Dázio Rezende de Souza¹, Cinthia Aparecida Andrade¹, Jose Donizeti Alves¹

¹ Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas, Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal, Universidade federal de Lavras

***Autor Correspondente:** Departamento de Biologia, Setor de Fisiologia Vegetal – Campus Universitário, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, Minas Gerais, Brasil. Telefone: (35) 3829 – 1620, e-mail: cleidecampos@hotmail.com.

Resumo: O objetivo desse trabalho foi investigar a ação da melatonina na indução de tolerância à seca em mudas de *Coffea arabica* L. da cultivar Catuaí 144. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado realizado em esquema fatorial, sendo quatro tratamentos e duas épocas de coleta, com três repetições, em que cada unidade experimental era constituída por um vaso contendo uma planta. Foram impostos quatro tratamentos: controle, em que as plantas eram irrigadas e cuja umidade do substrato era mantida próxima à capacidade de campo; déficit hídrico, cujas plantas eram mantidas a 40% da capacidade de campo; melatonina a 300 μ M + déficit hídrico, em que a melatonina foi aplicada no solo e as plantas foram mantidas a 40% da capacidade de campo; e melatonina a 500 μ M + déficit hídrico, cuja melatonina foi aplicada no solo e as plantas foram mantidas a 40% da capacidade de campo. As coletas foram realizadas aos 20 dias de imposição dos tratamentos e 24 horas após reirrigação. Para efeito de avaliação foi realizada uma análise de variância e as médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \geq 0,05$). Foram avaliados o crescimento, potencial hídrico, trocas gasosas, conteúdo de carboidratos, atividade do sistema antioxidante, conteúdo de ascorbato e prolina. A dose de 300 μ M de melatonina induziu o crescimento de raízes e parte aérea e impediu a redução do potencial hídrico, promoveu proteção ao aparato fotossintético, permitindo maiores trocas gasosas, conteúdos de clorofila e por proporcionar menor estresse, reduziu o conteúdo de prolina. O conteúdo de açúcares solúveis totais e amido reduziu com o estresse hídrico, aumentando os níveis de açúcares redutores, enquanto observou-se uma alocação desses carboidratos da parte aérea para as raízes.

Palavras-chave: Antioxidante, déficit hídrico, trocas gasosas, metabolismo de carboidrato, café

Introdução

O café tem grande importância para a economia mundial, sendo considerado como o quinto produto agrícola mais comercializado do Brasil (CONAB, 2015). Devido à grande extensão territorial de cultivo e à expansão para novas áreas, essa cultura está exposta a adversidades edafoclimáticas (MELO et al., 2014), sendo a deficiência hídrica o principal fator limitante à produção cafeeira.

Em geral, as respostas ao déficit hídrico se iniciam com a redução da condutância estomática (g_s), que por sua vez, reduz a concentração interna de

gás carbônico (C_i), bem como a atividade de carboxilação da enzima ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) (YARDANOV et al., 2003; GHANNOUM et al., 2003; GHANNOUM et al., 2009; XU et al., 2010). Com isso, a fotossíntese pode ser severamente afetada, interferindo na síntese de clorofilas e alterando o potencial hídrico das folhas.

Em função dessa redução na atividade de carboxilação da Rubisco, há um acúmulo de NAPH e indisponibilidade de $NADP^+$ para receber os elétrons oriundos do final da etapa fotoquímica, acarretando em acúmulo de elétrons. Esses elétrons que serão então, doados ao O_2 originando radicais superóxido, que juntamente com outras espécies reativas podem causar danos ao aparato fotossintético, bem como peroxidação de membranas lipídicas (YAMAMOTO et al, 2008; YAMASHITA et al, 2008; NISHIYAMA et al, 2011). Em virtude dessa baixa assimilação fotossintética, ocorre uma redução na síntese de sacarose, e privação do fornecimento de açúcares solúveis para o sustento do metabolismo (HAMMOND; WHITE, 2008). Adicionalmente, esses dissacarídeos podem ser hidrolisados a hexoses e alocados para órgãos de reserva para usos posteriores (XU et al., 2015; ROSA et al., 2009). Essa alocação de assimilados da parte aérea para as raízes, pode permitir maior crescimento radicular, aumentando a absorção de água pelas raízes.

Para controlar esses desequilíbrios ocasionados pela baixa assimilação fotossintética, e outros processos fisiológicos que levam à formação de EROs, as plantas dispõem de um sistema celular de defesa antioxidante constituído por enzimas, como a dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT), e por componentes não enzimáticos como, ascorbato e glutathione, que juntos atuam na neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROs), protegendo as células dos possíveis danos oxidativos (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; BARBOSA et al., 2014; SHARMA et al., 2012). Em contrapartida, a capacidade das plantas em tolerar os estresses,

em particular o déficit hídrico, envolve, além desses mecanismos de defesa antioxidante, o acúmulo de solutos orgânicos como a prolina, com a função de manter o ajustamento osmótico (DE FATIMA FUMIS; PEDRAS, 2002). Dessa forma, durante a seca, as plantas acumulam esses solutos, a fim de reduzir o potencial osmótico, elevando o potencial hídrico e mantendo o turgor celular em condições ótimas.

Devido à ocorrência de restrição hídrica, fato que se torna cada vez mais comum, existem perdas à produção vegetal. Visando a melhor produção de diferentes culturas, o uso de substâncias que melhorem a performance dessas plantas sob déficit hídrico se torna cada dia mais comum. Dentre essas moléculas destaca-se a melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), cuja concentração nas plantas varia nos diferentes tecidos e de acordo com o estágio de desenvolvimento (REITER et al., 2015).

A melatonina é descrita como promotora de tolerância a estresses em plantas (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2006; ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2007; ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2009; ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2014), uma vez que sua síntese é indutível nos vegetais, quando estes estão expostos a estresses bióticos e abióticos, limitando o estresse oxidativo pela indução da expressão de genes relacionados a estresses, redução da peroxidação lipídica e dos níveis de H_2O_2 , e aumento do sistema antioxidante enzimático (ZHANG et al., 2014; REITER et al., 2015). Além disso, em maçã (WANG et al., 2013a) foi observado uma redução nos teores de peróxido de hidrogênio e aumento na atividade das enzimas antioxidantes. Em pepino (WANG et al., 2015), além da atividade das enzimas antioxidantes, observou-se aumento nos níveis de ascorbato e glutatona. Em milho (ZHAO et al., 2015), a melatonina promoveu crescimento das mudas, pelo aumento do metabolismo de açúcares e das taxas fotossintéticas.

Em meio aos benefícios fornecidos pela melatonina às plantas, ressalta-se que plantas sob estresse hídrico tratadas com melatonina, apresentam maior tolerância, uma vez que, aumentam as respostas à seca, aumentando seus níveis de clorofila, bem como do sistema antioxidante, reduzindo os danos ao aparato fotossintético (WANG et al., 2014; REITER et al., 2015). Dessa forma, a melatonina pode ser uma alternativa para o aumento da tolerância de cultivares de café ao déficit hídrico, no entanto, seus efeitos ainda não estão descritos para *Coffea arabica*. Diante disso, o presente estudo teve o intuito de investigar a ação da melatonina exógena na indução de tolerância à seca em mudas de *Coffea arabica* L. da cultivar Catuaí 144.

Material e métodos

Condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Setor de Fisiologia Vegetal da UFLA, com condições controladas, em que foram utilizadas mudas *Coffea arabica* cv. Catuaí 144 obtidas de viveiro comercial. Estas mudas foram transferidas para vasos de polipropileno contendo 3kg de substrato padrão para mudas de cafeeiro, constituído de terra de subsolo peneirada, areia e esterco de curral curtido e peneirado nas proporções de 2:1:1, acrescido de fertilizante contendo nitrogênio, fósforo e potássio nas proporções 4:14:8 (GUIMARÃES; MENDES; SOUZA, 2002).

As plantas, após transplantadas passaram por um período de aclimação de 4 semanas, em que, após o término desse período, foram impostos quatro tratamentos: controle, em que as plantas eram irrigadas e cuja umidade do substrato era mantida próxima à capacidade de campo; déficit hídrico, cujas plantas eram mantidas a 40% da capacidade de campo; melatonina a 300 μM + déficit hídrico, em que a melatonina foi aplicada no solo e as plantas foram mantidas a 40% da capacidade de campo; e melatonina a 500 μM + déficit

hídrico, cuja melatonina foi aplicada no solo e as plantas foram mantidas a 40% da capacidade de campo.

A determinação da condição controle, solo próximo à capacidade de campo, foi realizada pelo método direto, em que uma amostra foi seca em estufa, pesada e colocada em um recipiente com água, com a superfície coberta por um plástico para evitar a evaporação, até atingir a saturação por capilaridade. Pela diferença de peso seco e encharcado foi determinada a máxima capacidade de retenção de água.

A solução de melatonina foi preparada dissolvendo-se a melatonina em etanol e completando -se o volume para 100 mL com água destilada. Em cada vaso foram aplicadas 100 mL de solução diretamente no solo, em uma única aplicação. Antes da imposição dos tratamentos todos os vasos foram pesados para manutenção da capacidade de campo, mantendo-os a 100%. Seguido desse procedimento, foi realizada a aplicação de melatonina nas concentrações de 300 e 500 μM , monitorando-se diariamente o peso dos vasos, afim de mantê-los a 40% da capacidade de campo. Nas plantas do tratamento de déficit hídrico não tratadas com melatonina foi aplicada 100 mL de água destilada, para que estas estivessem com a mesma umidade do solo que aquelas tratadas com melatonina.

As doses de melatonina foram estabelecidas com base nas doses propostas por Zang et al.(2013), Meng et al. (2014), Wang et al. (2016), Wang et al. (2012), Liu et al. (2015) e Zhao et al. (2015). Embasado nesses trabalhos, doses de melatonina variando de 100 a 500 μM foram aplicadas em mudas de cafeeiro, com quatro pares de folhas, tanto no solo quanto na parte aérea, e com base nos sintomas visuais de seca (murcha das folhas), percebeu-se que as doses de 300 e 500 μM , quando aplicadas no solo, se sobressaíram às demais, promovendo maior resposta de tolerância à seca nessas plantas, uma vez que induziram menor murcha das folhas.

As avaliações e coletas de dados foram realizadas em dois períodos, sendo o primeiro 20 dias após impostos os tratamentos, quando apareceram os primeiros sintomas, e o segundo, 24 horas após o primeiro, uma vez que nesse período realizou-se a reidratação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), realizado em esquema fatorial, sendo quatro tratamentos e duas épocas de coleta, com três repetições, em que cada unidade experimental era constituída por um vaso contendo uma planta. As variáveis foram analisadas quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p \geq 0,05$). Aquelas variáveis que não se enquadravam na normalidade foram transformadas pelo método de Box-Cox e submetidas à análise de variância usando o programa estatístico ASSISTAT 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2002). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Monitoramento das condições da casa de vegetação

Durante o período experimental monitorou-se a cada 30 segundos a temperatura (T °C) e umidade relativa do ar (UR %) da casa de vegetação, com auxílio de um termohigrômetro Extech Instruments, modelo RHT10.

Potencial hídrico

O potencial hídrico das plantas foi medido no período antemanhã com o auxílio de uma câmara de pressão (PMS Instruments Company, EE.UU.), segundo o método descrito por Scholander et al. (1964,1965).

Crescimento vegetativo

As plantas foram divididas em parte aérea (caules e folhas) e raiz, e a determinação da massa seca foi realizada após secagem das amostras em estufa de ventilação forçada a 65°C até peso constante.

A área foliar total foi estipulada pela fórmula $AF = [(comprimento \times largura)] 0,667 \times \text{número total de folhas por planta}$ (BARROS et al., 1973; GOMIDE et al., 1977).

Teores de clorofila

Os teores de clorofila foram quantificados com auxílio de um clorofilômetro portátil (Chlorophyll Meter, SPAD-501, da Minolta Co. Japão), sendo realizadas 4 leituras por repetição, em pares de folhas totalmente expandidas, para cada tratamento, no período da manhã (MINOLTA CAMERA LTDA, 1989).

Trocas gasosas

As avaliações de trocas gasosas foram realizadas entre 9 e 11 horas, com o auxílio de um analisador de gás infravermelho (IRGA; Li-Cor Li-6400XT). Sua câmara de *led* foi programada para uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram determinados os valores de fotossíntese líquida (A ; $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração (E ; $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s ; $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e eficiência de carboxilação (A/C_i). Para essa análise foram utilizadas o segundo par de folhas totalmente expandidas, avaliando-se ambas as folhas do par.

Teores de carboidratos

Folhas e raízes foram secas em estufa de circulação forçada a 65°C e moídas em moinho de facas. Em seguida 200 mg desse material foi homogeneizadas em 5 mL tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0 seguido de banho-maria a 40°C por 30 minutos, e centrifugação a 10.000 g por 20 minutos, sendo o processo repetido uma vez e os sobrenadantes combinados. Destes sobrenadantes foram utilizadas alíquotas para análises de açúcares solúveis pelo método de antrona (YEMM; WILLIS, 1954) e açúcares redutores, pelo método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959), sendo o conteúdo de sacarose estimado pela diferença entre o conteúdo de açúcares solúveis totais e açúcares redutores. Após os processos de homogeneização e centrifugação dos tecidos vegetais já descritos anteriormente para obtenção dos extratos brutos, o pellet foi ressuspenso em 8 mL de tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8. Feito isso,

foi adicionado às amostras 2 mL da solução da enzima amiloglucosidase 1 mg/mL (1 mg da enzima em 1 mL de tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8), e levadas ao banho-maria a 40 °C por 2 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 20 minutos, sendo o sobrenadante coletado e seu volume completado para 15 mL com água destilada. O amido então, foi quantificado pelo método da antrona (YEMM; WILLIS, 1954).

Metabolismo Antioxidante

Para a determinação da atividade das enzimas do sistema antioxidante, o extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 200 mg de material vegetal acrescido de 50% de PVPP, procedendo-se com o protocolo de extração segundo Biemelt, Keetman e Albrecht (1998), cujo tampão de extração era composto por tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, EDTA 0,1 mM e ácido ascórbico a 10 mM. O extrato então, foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998) e para a quantificação das proteínas totais (BRADFORD, 1976).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da mesma em inibir a fotoredução o azul de nitrotetrazólio (NBT) proposta por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de incubação, composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. O meio de incubação foi incubado em banho-maria a 30 °C antes da quantificação da atividade enzimática. As amostras foram colocadas em placas de ELISA, e aquelas contendo meio de incubação mais amostra ou somente o meio de incubação com água (branco), foram iluminadas com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos. Feito isso, as leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima

feito com a seguinte equação: % de inibição = (A560 amostra com extrato enzimático – A560 controle sem enzima)/(A560 controle sem enzima). Nessa reação uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

Para determinação da atividade da APX alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 500 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM, peróxido de hidrogênio 1,0 mM e água (KOSHIBA, 1993). O meio de incubação foi incubado em banho-maria a 30 °C antes da quantificação da atividade enzimática. A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi 2,8 mM⁻¹cm⁻¹.

A atividade da CAT foi avaliada pelo método proposto por Mengutay et al. (2013), em que alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de incubação contendo tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 7,6, acrescido de Na₂EDTA 0,1 mM, dissolvido no tampão, e peróxido de hidrogênio 10 mM. O meio de incubação foi incubado em banho-maria a 30 °C antes da quantificação da atividade enzimática. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm, a cada 15 segundos, por três minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 36 mM⁻¹cm⁻¹.

Os teores de ascorbato foram determinados conforme descrito por Arakawa et al. (1981), em que 50 mg de tecido fresco de folhas e raízes foram macerados em TCA 5% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, a 4°C, por 15 minutos. Feito isso, alíquotas (20 µL) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de incubação composto por TCA 5% (m/v), etanol 98,8%, H₃PO₄ 0,4% em etanol, bathophenantrolina 0,5% em etanol (p/v) e FeCl₃ 0,03%

em etanol (m/v). A mistura foi homogeneizada vigorosamente e incubada a 30°C por 90 minutos. Após, as leituras foram feitas a 534 nm em espectrofotômetro.

Teores de prolina

Para a quantificação de prolina foi utilizado o método descrito por Bates (1973), com pequenas modificações. Para tanto, amostras de 100 mg de matéria seca foram homogeneizadas manualmente em graal de porcelana com parte do extrator, ácido sulfosalicílico 3%, cujo volume final foi 10 mL. Feito isso, as amostras ficaram sob agitação à temperatura ambiente por 60 minutos, sendo em seguida filtradas em papel de filtro. Em tubo de ensaio contendo 2 mL de sobrenadante, foram adicionados 2 mL de ninhidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial, seguindo-se de banho-maria fervente. Após resfriamento por imersão em banho de gelo, a intensidade da cor foi medida a 520 nm e as absorbâncias obtidas, foram comparadas com curva padrão de prolina e os resultados expressos em μmol de prolina/g de matéria fresca.

Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada conforme descrito por Buege e Aust (1978), por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. Para tanto, 200 mg de folhas e raízes frescas, foram maceradas em nitrogênio líquido, acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m,v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos, e alíquotas de 250 μL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação, composto por 0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA, incubando-se, em seguida, a 95°C por 30 minutos. A reação foi paralisada pelo resfriamento rápido em gelo, e as leituras determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. Nessa reação, o TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixo peso molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada de acordo

com a seguinte equação: $[MDA] = (A535 - A600) / (\xi \cdot b)$, em que ξ , é o coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5}$, e “b” o comprimento ótico = 1.

Resultados

Durante o período experimental a casa de vegetação apresentou temperaturas máximas e mínimas de 29,58°C e 23,6°C, respectivamente, com médias de 26,87°C (Figura 1). A umidade relativa, nesse mesmo período, variou entre 67,05 – 83,61%, com médias de 74,21 % (Figura 1).

Após 20 dias de déficit hídrico, todas as plantas, independente do tratamento, apresentaram valores de potencial hídrico menores do que aquelas mantidas próximas à capacidade de campo (Figura 2). No entanto, plantas sob déficit hídrico tratadas com 300 μM de melatonina apresentaram valores maiores que as plantas em condições de déficit hídrico não tratadas e déficit hídrico tratadas com 500 μM de melatonina. Contudo após reidratadas, as plantas que estavam sob déficit hídrico recuperaram seu status hídrico, alcançando valores antes observados apenas nas plantas irrigadas normal.

Aos 21 dias de imposição dos tratamentos, pôde-se observar, que o acúmulo de massa seca na parte aérea (Tabela 1) foi semelhante entre as plantas do controle irrigado e déficit hídrico tratadas com 300 μM de melatonina, uma vez que ambas apresentaram valores mais pronunciados de massa seca, quando comparadas às plantas submetidas ao déficit hídrico não tratadas com melatonina e aquelas tratadas com 500 μM de melatonina. Em relação à massa seca de raiz (Tabela 1), os maiores incrementos foram observados nas raízes das plantas que estavam sob déficit hídrico, enquanto os menores observados nas raízes de plantas do controle irrigado. Neste aspecto, o tratamento com 300 μM de melatonina promoveu maiores incrementos de massa seca, do que raízes de plantas sob déficit hídrico não tratadas com melatonina ou tratadas com 500 μM de melatonina. Somado a esses resultados, notou-se nesse estudo que as plantas

que estavam sob restrição hídrica apresentaram maior razão massa seca raiz/parte aérea que as plantas do tratamento controle irrigado.

Ainda nesse período, foi possível observar, que os indivíduos do controle irrigado apresentaram maior área foliar total (Tabela 1) que aqueles sob déficit hídrico. Para tanto, as plantas tratadas com 300 μM de melatonina apresentaram valores de área foliar total menores que o controle, porém, mais elevados que as plantas de déficit hídrico não tratadas com melatonina e aquelas tratadas com melatonina a 500 μM .

Aos 20 dias de estresse plantas controle e de déficit hídrico tratadas com 300 μM de melatonina apresentaram valores mais acentuados de clorofila (Figura 3), quando comparadas às de déficit hídrico não tratadas ou tratadas com 500 μM de melatonina, não diferindo entre si. Após a reidratação, plantas de déficit hídrico, independente do tratamento, aumentaram os valores de clorofila, sendo os maiores valores observados nas plantas tratadas com 300 μM , seguidos pelas tratadas com 500 μM de melatonina. Nessa condição, plantas controle e de déficit hídrico não tratadas com melatonina, não apresentaram diferença no conteúdo de clorofila.

Em relação às trocas gasosas, aos 20 dias de estresse hídrico, as plantas submetidas déficit hídrico apresentaram uma redução nas taxas fotossintéticas (A) em relação ao controle (Figura 4A). Todavia, entre essas plantas, àquelas tratadas com 300 μM de melatonina apresentaram maiores taxas fotossintéticas que aquelas não tratadas ou tratadas com 500 μM de melatonina. Após a reidratação, as plantas que estavam sob déficit hídrico aumentaram suas taxas fotossintéticas, sendo os maiores valores apresentados pelas plantas tratadas com 300 μM de melatonina. Apesar disso, esse aumento não foi suficiente para alcançar os valores demonstrados pelo controle irrigado.

Resultados semelhantes foram encontrados para a condutância estomática (Figura 4B) e transpiração (Figura 4C), uma vez que, as plantas

submetidas ao déficit hídrico apresentaram menor condutância estomática e transpiração, quando comparadas ao controle irrigado. Assim sendo, vale ressaltar, que entre essas plantas, aquelas tratadas com 300 μM de melatonina apresentaram valores superiores dessas variáveis, e após a reidratação, as plantas que estavam sob déficit hídrico aumentaram a condutância estomática e transpiração, atingindo valores semelhantes, contudo inferiores aos apresentados pelas plantas controle.

Quanto à eficiência de carboxilação (Figura 4D), durante o período de estresse, foi observado o mesmo comportamento que a variável fotossíntese, uma vez que houve uma redução da eficiência de carboxilação nas plantas sob déficit hídrico em relação às do controle, destacando-se as plantas tratadas com 300 μM de melatonina, pois se sobressaíram às demais. Em contrapartida, após 24h de reidratação, pôde-se observar um aumento na eficiência de carboxilação das plantas que foram submetidas ao déficit hídrico, em que, aquelas tratadas com 300 μM de melatonina recuperaram sua eficiência carboxilativa alcançando valores próximos aos apresentados pelas plantas do tratamento controle.

Além da influência nas trocas gasosas, o estresse hídrico também influenciou no metabolismo de carboidratos, uma vez que houve redução no conteúdo de sacarose (Figura 5A) em folhas de plantas submetidas ao déficit hídrico, cuja aquelas tratadas com 500 μM de melatonina apresentaram valores superiores aos das demais plantas do estresse. Após 24h de reidratação, o tratamento com 300 μM de melatonina promoveu aumento nos conteúdos de sacarose, os quais atingiram valores semelhantes aos das tratadas com 500 μM , porém inferiores aos apresentados pelas plantas controle.

Avaliando-se a sacarose na raiz (Figura 5B), foi possível perceber que aos 20 dias de estresse hídrico, os resultados foram inversos aos apresentados pelas folhas. Uma vez que, plantas sob déficit hídrico não tratadas ou tratadas

com 300 μM de melatonina apresentaram valores de sacarose mais elevados que aquelas do controle irrigado ou tratadas com 500 μM de melatonina.

No que se refere aos açúcares solúveis totais (AST), apresentaram o mesmo comportamento observado para sacarose, tanto de folha (Figura 5C) como de raiz (Figura 5D). Em contrapartida, os açúcares redutores (AR) nas folhas (Figura 5E), durante o estresse hídrico, plantas tratadas com 500 μM apresentaram menores conteúdos de AR que qualquer um dos demais tratamentos. Quando reidratadas, as plantas que estavam sob déficit hídrico reduziram o conteúdo de AR, não diferindo entre os tratamentos.

Nas raízes (Figura 5F), os açúcares redutores tiveram seus conteúdos aumentados nas plantas de déficit hídrico não tratadas ou tratadas com 300 μM de melatonina, seguido de redução nas plantas controle ou tratadas com 500 μM de melatonina. Posteriormente à reidratação, houve uma redução nos teores dessas açúcares, nas plantas que estavam sob déficit hídrico, as quais atingiram valores estatisticamente iguais aos das plantas do controle irrigado.

Durante o estresse hídrico observou-se que houve um consumo de amido (Figura 5G), visto que plantas estressadas, em relação às plantas controle, reduziram os teores de amido em suas folhas. Ainda nesse período, foi possível perceber que entre as plantas estressadas, aquelas tratadas com 300 μM de melatonina obtiveram valores mais elevados desse polissacarídeo. Subsequente ao período de estresse, com a reidratação das plantas, observou-se um aumento nos teores de amido daquelas que foram submetidas ao déficit hídrico, independente do tratamento. Assim sendo, foi observado que o tratamento controle ou sem aplicação de melatonina influenciou em maiores valores de amido, seguidas das plantas tratadas com 300 μM de melatonina, e daquelas tratadas com 500 μM de melatonina, cujos valores foram os menores.

Nas raízes (Figura 5H), como observado nas folhas, também houve redução nos teores de amido das plantas submetidas ao déficit hídrico, em que os

tratamentos de 300 e 500 μM de melatonina influenciaram em maiores teores. Após a reidratação, foi verificado que não houve diferença significativa nos teores de amido entre os tratamentos. No entanto as plantas que estavam sob déficit hídrico e sem aplicação de melatonina aumentaram os teores de amido em relação as condições anteriores.

No que se refere as enzimas antioxidantes, foi observado que aos 20 dias de estresse hídrico, a atividade da SOD nas folhas (Figura 6A) aumentou em todos os tratamentos de déficit hídrico. Nesse contexto, as plantas tratadas com 300 μM de melatonina apresentaram menor atividade dessa enzima do que as demais, na mesma condição de déficit hídrico. No entanto, após a reidratação, a atividade da SOD foi reduzida em todas as plantas independente do tratamento. Ainda assim, as plantas sob déficit hídrico não tratadas com melatonina, permanecerem com sua atividade mais elevada que as demais, por ainda haver estresse nessas plantas.

Nas raízes (Figura 6B), a atividade da SOD, aos 20 dias de déficit hídrico, seguiu um padrão de comportamento semelhante ao observado nas folhas, uma vez que as plantas de déficit hídrico não tratadas ou tratadas com 500 μM de melatonina apresentaram maior atividade desse enzima do que as plantas controle ou tratadas com 300 μM de melatonina. Contudo, 24h após a reidratação, as plantas que estavam sob déficit hídrico sem tratamento de melatonina ou com tratamento de 300 μM , apresentaram maior atividade da SOD do que as demais.

Com relação a atividade da APX, nas folhas (Figura 6C), foi verificado que após os 20 dias de estresse hídrico as plantas tratadas com 300 e 500 μM de melatonina apresentaram um aumento na atividade da APX, em relação aos demais tratamentos. Pôde-se observar ainda que após 24 de reidratação a aplicação de 300 μM de melatonina reduziu a atividade da APX a valores apresentados pelo controle. Em contrapartida, nas plantas não tratadas ou

tratadas com 500 μM de melatonina a atividade dessa enzima foi aumentada após a reidratação.

Com relação às raízes (Figura 6D), aos 20 dias de estresse a atividade da APX em plantas tratadas com 500 μM de melatonina foi menor em relação às plantas controle e tratadas com 300 μM de melatonina. Por outro lado, após a reidratação a atividade da APX foi aumentada nas plantas que estavam sob déficit hídrico não tratadas e naquelas tratadas com 500 μM de melatonina, sendo que aquelas tratadas com 300 μM de melatonina reduziram a atividade dessa enzima.

Além da APX, uma outra peroxidase importante na neutralização do peróxido de hidrogênio é a CAT, que nesse estudo também teve seus padrões de atividade alterados em função do estresse e da melatonina. Nas folhas (Figura 6E) aos 20 dias de estresse observou-se um aumento na atividade da CAT em todas as plantas que estavam sob déficit hídrico, sendo os maiores valores observados nas plantas tratadas com 300 μM de melatonina, seguida pelas tratadas com 500 μM de melatonina. Após a reidratação, as plantas sob déficit hídrico e não tratadas com melatonina exibiram maiores valores, contrastando com o controle. No entanto, plantas tratadas com 500 μM de melatonina reduziram sua atividade em relação ao período de estresse.

Nas raízes (Figura 6F), aos 20 dias de estresse hídrico, notou-se um aumento na atividade da CAT nas plantas submetidas ao estresse hídrico não tratadas ou tratadas com 500 μM de melatonina, seguidas daquelas tratadas com 300 μM de melatonina. Já, com a reidratação, as plantas sob déficit hídrico sem o tratamento de melatonina foram as que exibiram as maiores atividades da catalase.

O níveis de ascorbato nas folhas (Figura 7A), foram maiores nas plantas sob déficit hídrico, porém, os maiores valores foram observados nas plantas tratadas com 300 μM de melatonina. Com a reidratação, as plantas sob déficit

hídrico ainda apresentaram os maiores níveis de ascorbato, e embora isso tenha ocorrido, as plantas tratadas com 300 μM de melatonina reduziram os níveis desse antioxidante nessas condições, permanecendo porém, com níveis mais elevados que nos demais tratamentos.

Nas raízes (Figura 7B), aos 20 dias de déficit hídrico, foi observado um aumento de 53,5% nos teores de ascorbato das plantas tratadas com 300 μM de melatonina, quando comparadas às tratadas com 500 μM . No entanto, após reidratadas esses conteúdos de ascorbato foram reduzidos, porém se mantendo mais elevados que nas plantas controle ou naquelas de déficit hídrico não tratados com melatonina.

No que se refere à prolina, nas plantas controle ou tratadas com 300 μM de melatonina não houve diferença nos teores desse aminoácido em suas folhas (Figura 8A), aos 20 dias de déficit hídrico. Contudo entre as plantas não tratadas ou tratadas com 500 μM de melatonina, essa última teve o maior valor. Com a reidratação foi observado, que todos os tratamentos de déficit hídrico tiveram seus níveis de prolina aumentados em comparação ao controle irrigado, destacando-se as plantas tratadas com 300 μM ou não tratadas com melatonina, pois aumentaram seus conteúdos de prolina em relação ao período de estresse. Já nas raízes (Figura 8B), obteve-se um padrão semelhante ao observado nas folhas, exceto pra a condição de reidratação, uma vez que as plantas tratadas com 300 μM de melatonina aumentou o conteúdo de prolina, se igualando às demais plantas que estavam em condição de seca.

Tendo em vista o comportamento apresentado pelas enzimas do sistema antioxidante, avaliou-se os níveis de peroxidação lipídica para verificar a efetividade do sistema antioxidante na neutralização das EROs, evitando danos às membranas celulares. Dentre as plantas sob déficit hídrico, aquelas tratadas com 300 μM de melatonina tiveram níveis menores de malondialdeído em suas folhas (Figura 9A), no entanto, não alcançando o controle, pois nesses os níveis

de malondialdeído foram ainda menores. Comportamento semelhante foi observado com a reidratação, posto que, apenas as plantas de déficit hídrico não tratadas com melatonina tiveram os níveis de MDA reduzidos alcançando os valores exibidos pelas plantas tratadas com 300 μM de melatonina, que assim como os demais tratamentos não alteraram os níveis de MDA após a reidratação.

Nas raízes (Figura 9B), assim como em folhas, o tratamento de 300 μM de melatonina proporcionou um menor estresse oxidativo durante o período de déficit hídrico, uma vez que os teores de malondialdeído nessas plantas foram iguais aos do controle e inferiores às plantas de déficit hídrico não tratadas com melatonina ou tratadas com 500 μM de melatonina. Passados 24h de reidratação, foi observada uma redução nos teores de MDA nas plantas de déficit hídrico não tratadas e naquelas tratadas com 500 μM de melatonina. Ainda assim, as plantas desses tratamentos não atingiram os níveis demonstrados pelas plantas controle ou tratadas com 300 μM de melatonina, pois estas não sofreram alteração nos teores de MDA após a reidratação.

Discussão

O tratamento de 300 μM de melatonina reduziu o estresse oxidativo causado pela seca em mudas de café, proporcionando melhor desempenho fisiológico a essas plantas. Esse melhor desempenho pôde ser observado devido ao incremento no crescimento de parte aérea e raiz, quando comparado aos demais tratamentos que estavam sob restrição hídrica. Além disso, essas plantas tratadas com 300 μM de melatonina apresentaram a maior massa seca de raiz dentre todos os tratamentos, porém não diferindo na razão raiz/parte aérea, devido ao aumento na parte aérea apresentado por essas plantas. O mesmo não foi observado para o tratamento de 500 μM de melatonina, pois houve indícios de um efeito inibidor da tolerância ao estresse nas plantas desse tratamento.

Esse cenário está de acordo com o proposto por Park; Back (2012), pois o mesmo sugere que a melatonina tem efeitos bimodais dependente da concentração utilizada. Para confirmar esses efeitos dependentes da concentração de melatonina, plântulas de milho foram cultivadas na presença e ausência de várias concentrações de melatonina (ZHAO et al., 2015), percebendo-se que, após 6 dias de tratamento com doses menores de melatonina, essas plantas exibiram maior crescimento, maior comprimento de folha e raiz e maior biomassa de raiz que plantas controle sem melatonina. Em contrapartida, as plantas tratadas com doses mais elevadas de melatonina tiveram seu crescimento inibido, indicando que os benefícios da melatonina às plantas dependem da dose aplicada, podendo ser prejudicial às plantas.

Durante o período de déficit hídrico ocorrem alterações nas raízes, e essas liberam diversos sinais para as demais partes da planta, através de mensageiros, como por exemplo, o ácido abscísico (ABA), um fitormônio relacionado a diversos estresses abióticos. Dentre as respostas desencadeadas por esse regulador de crescimento, destaca-se, o fechamento estomático e o crescimento de raiz em condições de déficit hídrico (SHARP; LENOBLE, 2002).

Nesse trabalho, a restrição hídrica por 20 dias desencadeou redução nas taxas fotossintéticas, condutâncias estomáticas, taxas transpiratórias e eficiência de carboxilação. Entretanto, os efeitos foram menos pronunciados nas plantas tratadas com 300 μM de melatonina para todas essas variáveis, em relação aos demais tratamentos que estavam sob déficit hídrico. Isso provavelmente se deve à menor variação do potencial hídrico nas plantas desse tratamento. Ressalta-se ainda, que a maior taxa fotossintética, aliada a maior área foliar total, observadas nas plantas tratadas com 300 μM de melatonina, explicam o melhor desempenho de crescimento demonstrado nessas plantas.

Em plantas submetidas à seca ocorrem alterações nas raízes, aumentando a biossíntese de ABA, que é então, transportado via corrente transpiratória no xilema até a parte aérea, onde se une ao ABA hidrolisado e aqueles produzidos pelas folhas aumentando o pool desse hormônio nas folhas (SCHACHTMAN; GOODGER, 2008). Nesse órgão, o ABA se liga ao seu receptor, localizado nas células-guarda, desencadeando uma série de reações que resultam em redução da condutância estomática (KANG et al., 2010). Esse processo é um mecanismo de adaptação das plantas à seca, em que reduz a transpiração, reduzindo com isso, a desidratação. Juntamente com a redução da condutância estomática ocorre a diminuição da concentração interna de carbono, comprometendo a atividade de carboxilação da carboxilase/oxigenase da Ribulose – 1,5 - bifosfato pela falta de substrato, caracterizando redução nas taxas fotossintéticas pela limitação estomática (YARDANOV et al., 2003; GHANNOUM et al., 2009; XU et al., 2010).

Nesse trabalho, a aplicação de 300 mM de melatonina proporcionou uma menor limitação estomática da fotossíntese, uma vez que as plantas desse tratamento apresentaram maiores taxas fotossintéticas e condutâncias estomáticas do que os outros tratamentos que estavam submetidos ao déficit hídrico. E isso se deve provavelmente, aos potenciais hídricos maiores apresentados por essas plantas. Após 24 horas de reidratação todos os tratamentos que estavam sob condições de seca, apresentaram ainda menores valores nas variáveis de trocas gasosas em relação ao controle, no entanto, plantas tratadas com 300 μ M de melatonina demonstraram o maior valor de fotossíntese e eficiência de carboxilação, sem diferenças significativas para transpiração e condutância estomática, quando comparadas às plantas dos demais tratamentos que estavam sob restrição hídrica.

Resultados sugerem que a redução na condutância estomática durante os 20 dias de estresse limitou a chegada de CO₂ nos sítios de carboxilação da

Rubisco, comprometendo, dentre outros, o ciclo de Calvin, havendo, portanto menor consumo de poder redutor (NADPH) para formação de trioses fosfatos e provocando um feedback negativo no processo fotossintético (YARDANOV et al., 2003; GHANNOUM et al., 2009; XU et al., 2010). Com a redução do consumo de NADPH, os elétrons da ferredoxina reduzida não encontram seu acceptor NADP^+ , sendo transferidos para moléculas de oxigênio, as quais podem ser oriundas da hidrólise da água ou de outras reações nos tilacóides (YAMAMOTO et al, 2008; YAMASHITA et al, 2008), reduzindo - o a radicais superóxido, que em estresses elevados podem ser reduzidos a outras espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas EROS comprometem dentre outros processos, a síntese de novo da proteína D1 no fotossistema II, podendo ocasionar a peroxidação das membranas dos tilacóides, e conseqüentemente, impossibilitando o transporte de elétrons, e impedindo a formação de poder redutor e síntese de ATP (KARABAL; YÜCEL; ÖKTEM, 2003; FOYER; NOCTOR, 2000; SCANDALIOS, 1993; TAKAHASHI; MURATA, 2006). Com a baixa concentração de ATP a regeneração da ribulose - 1,5 - bisfosfato, molécula chave para entrada do CO_2 no ciclo de Calvin, é comprometida, levando uma redução na taxa fotossintética por falhas bioquímicas (TAKAHASHI; MURATA, 2006).

Deste modo é possível observar que plantas tratadas com 300 μM de melatonina sofreram menores danos ao aparato fotossintético durante a condição de seca, uma vez que, quando reidratadas apresentaram os mesmos valores de condutância estomática, porém maiores valores de fotossíntese e eficiência de carboxilação, que plantas não tratadas ou tratadas com 500 μM de melatonina. Além disso, plantas tratadas com 300 μM de melatonina, em condições de seca, apresentaram valores de clorofila iguais aos de plantas irrigadas, contrapondo-se àquelas não tratadas ou tratadas com 500 μM de melatonina, pois sofreram oxidação nas moléculas de clorofilas e assim apresentaram menor conteúdo

desse pigmento. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com cevada, onde observou-se o efeito protetor da melatonina sobre a perda de clorofilas, uma vez que o teor de clorofila retida nas folhas foi dependente da concentração de melatonina em que era exposta, observando-se ainda que concentrações mais elevadas de melatonina provocaram efeitos negativos, provavelmente por se apresentarem como níveis tóxicos (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2009).

Quanto ao menor potencial hídrico verificado nas plantas tratadas com 300 μM de melatonina, durante o período de seca, pode-se relacionar sua ocorrência ao maior crescimento das raízes, otimizando a captura de água no solo e proporcionando melhores condições hídricas para essas plantas. Como mencionado anteriormente, durante a seca as plantas aumentam o crescimento de suas raízes por indução do ABA. Nesse sentido, a melatonina provavelmente desempenha um papel regulador no crescimento e desenvolvimento de plantas, particularmente das raízes, podendo se relacionar com a auxina e fitocromos, induzindo o crescimento desse órgão (PARK; BACK, 2012).

Observou-se ainda, que as raízes das plantas que estavam sob restrição hídrica constituíram um forte dreno, uma vez que houve maior alocação de carbono das folhas para esses órgãos, influenciando em maiores conteúdos de açúcares redutores tanto em folhas quanto em raízes. Essas respostas foram mais evidentes nas plantas tratadas com 300 μM e sem tratamento de melatonina, uma vez que, aparentemente, essas plantas reduziram o teor de sacarose e açúcares solúveis totais nas folhas e aumentaram nas raízes, justificando assim, o menor crescimento da parte aérea em função do incremento no sistema radicular. Resultados semelhantes foram encontrados por Xu et al., (2015), em que o estresse hídrico levou à redução do acúmulo de açúcares solúveis, visto que os açúcares são bastante sensíveis às mudanças nas condições hídricas das plantas, sendo sua síntese e degradação coordenadas por diversas enzimas. Assim sendo,

a redução no conteúdo de carboidratos pode ser atribuída tanto à redução da síntese, pela inibição da atividade da sintase da sacarose-fosfato, quanto ao aumento da degradação, por ação da invertase ácida as quais tornam esses carboidratos disponíveis para consumo (SILVA et al., 2011, KOCH, 2004).

Apesar dessa variação nos teores desses carboidratos, o conteúdo de amido apresentou o mesmo padrão para folhas e raízes, no entanto com o déficit hídrico, todas as plantas que estavam sob essa condição de tratamento apresentaram menores incrementos de amido do que aquelas sob irrigação normal. Esses resultados vão de encontro aos apresentados por Silva et al., (2011), pois os autores relatam, que sob baixos potenciais hídricos a sacarose sofre forte redução e a concentração de amido reduz em até 70%, numa resposta bem caracterizada para cafeeiros sob déficit hídrico. Ressalta-se ainda, que esse fato pode estar relacionado à necessidade de as plantas sob déficit hídrico alocarem mais sacarose para as raízes como uma resposta de adaptação à seca e a queda na fotossíntese. A menor concentração de carboidratos nas plantas tratadas com 300 μM de melatonina pode ser atribuída, por um lado, à sua menor alocação quanto menor for o estresse, evidenciando com isso, que as menores doses de melatonina induzem um menor acúmulo de carboidratos, como observado em *Prunus avium*, *Prunus cerasus* (SARROPOULOU et al., 2012) e *Malus hupehensis* (WANG et al., 2013b), e por outro lado pelo fato de as respostas à melatonina exógena serem dependes da dose aplicada, indicando mais uma vez, que altas concentrações de melatonina induzem a toxidez ao invés de indução de tolerância.

Levando-se em consideração os benefícios da dose 300 μM de melatonina ao aparato fotossintético, pode-se considerar também, os efeitos benéficos desse tratamento sob o sistema antioxidante enzimático e não enzimático. Nesse sentido, foi observada uma menor atividade da SOD nas plantas tratadas com 300 μM de melatonina aos 20 dias de estresse hídrico,

notando-se uma redução da atividade dessa enzima após a reidratação, em todos os tratamentos de restrição hídrica, corroborando com o potencial hídrico maior apresentado pelas plantas tratadas com essa dose. Em contrapartida, nas raízes, constatou-se um aumento na atividade dessa enzima com a reidratação, fato que se deve, provavelmente, à retomada dos processos metabólicos, o que pode ter resultado em maior formação de superóxido nas raízes dessas plantas durante reações de oxirredução.

Destaca-se ainda, que a concentração de 300 μM de melatonina pode ter induzido uma dupla defesa contra os efeitos nocivos do peróxido de hidrogênio, durante o estresse hídrico, nas folhas das plantas deste tratamento, em que pôde-se notar, um aumento na atividade tanto da CAT quanto da APX, contribuindo para a baixa peroxidação encontrada nas folhas dessas plantas. Sugere-se ainda, que os níveis de peróxido de hidrogênio nas folhas dessas plantas foram baixos, uma vez que, a enzima mais ativa nessas condições foi a APX, que atua em baixas concentrações de seu substrato, enquanto em plantas de déficit hídrico não tratadas e tratadas com 500 μM de melatonina, foi a CAT, enzima que atua em altas concentrações de peróxido. Com a reidratação pôde-se notar que plantas tratadas com 300 μM de melatonina tiveram uma redução do estresse oxidativo, e que a alta atividade da CAT nas plantas pode estar relacionado com a produção de peróxido de hidrogênio pela atividade da oxidase do glicolato nos peroxissomos, durante o processo de fotorrespiração, visto que o processo fotossintético não havia sido recuperado por completo. Já nas raízes o oposto foi observado, uma vez que as atividades das enzimas CAT e APX foram reduzidas a valores iguais aos de plantas controle, reduzindo nessas plantas o estresse oxidativo.

A melatonina é uma molécula sensível às mudanças ambientais, podendo ter suas concentrações nas plantas aumentadas com a exposição dessas a estresses, assim melhorando as respostas das plantas às condições adversas.

Dentre as respostas desencadeadas pela melatonina, o aumento do sistema antioxidante enzimático pode ser a principal delas. Diante desses efeitos da melatonina, em plântulas de tomate pré-tratadas foi observada uma minimização dos impactos negativos da seca pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes, induzida por concentrações menores de melatonina (LIU et al., 2015). Também em pepino, foi verificado que a atividade das enzimas SOD e CAT foram reduzidas em 40,6% nas plantas sob restrição hídrica, contrapondo-se àquelas tratadas com melatonina, pois exibiram aumentos na atividade dessas enzimas (ZHANG et al., 2013). Além disso, em plantas de maçã sob seca, foram mostradas atividades significativamente mais elevadas da CAT nas plantas tratadas com melatonina, em relação às que estavam sob condição de seca não tratadas ou mesmo as plantas bem irrigadas (WANG et al., 2013).

Além do sistema antioxidante enzimático, em geral a melatonina induziu um aumento na síntese de ascorbato, um antioxidante não enzimático que participa do ciclo ascorbato-glutationa na neutralização de EROs. Diante disso, o tratamento com 300 μM de melatonina foi o que promoveu maior estímulo para a síntese desse antioxidante, em folhas e raízes, durante condições de seca e reidratação, contribuindo para o menor estresse oxidativo observado nessas plantas. Resultados semelhantes foram encontrados em folhas de maçã tratadas com melatonina (WANG et al., 2012), em que o conteúdo de ascorbato aumentou nas folhas expostas à melatonina, ainda nas primeiras 12 horas de tratamento. Esses resultados nos confirmam que a melatonina além de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes, induz o aumento de outros antioxidantes, afim de reduzir os danos oxidativos causados pelos estresses.

Somados a esses mecanismos de defesa antioxidante, a capacidade das plantas em tolerar a seca envolve o acúmulo de solutos, com o intuito de reduzir o potencial osmótico, mantendo o turgor celular em condições ótimas. Nesse sentido, a prolina produzida sob estresses, é acumulada no citosol das células

contribuindo para o ajustamento osmótico. Nesse estudo foi observado que o tratamento com 300 μM de melatonina reduziu os efeitos do estresse hídrico, visto que o conteúdo de prolina durante condições de estresse hídrico, em plantas que receberam esse tratamento foi menor nas folhas e raízes, em comparação com plantas não tratadas ou tratadas com 500 μM de melatonina. Esse resultado se deve, provavelmente, ao menor potencial hídrico foliar apresentado por essas plantas tratadas com 300 μM de melatonina. Corroborando com esse panorama, Silva et al. (2011) notaram que em pés-francos dos clones 109A de *Coffea canefora* os níveis de prolina aumentavam a medida em que o potencial hídrico diminuía, e assim plantas com potencial de -3,0 MPa apresentaram maiores conteúdos de prolina do que plantas cujo potencial hídrico era -1,5 MPa. Podemos inferir, com isso que a dose de 300 μM de melatonina, atenuou o estresse hídrico, contribuindo para um menor acúmulo de prolina, como observados em estudos de *Prunus avium*, *Prunus cerasus* (SARROPOULOU et al., 2012).

Visto os resultados observados para o sistema antioxidantes, proporcionadas pela dose de 300 μM de melatonina, pode-se inferir que esse tratamento contribuiu para um menor estresse oxidativo nessas plantas, dado que as plantas desse tratamento demonstraram menores valores de peroxidação lipídica em suas folhas do que aquelas de outros tratamentos que estavam nas mesmas condições de seca, justificando assim, os menores danos bioquímicos à fotossíntese, representados pela maior eficiência de carboxilação das plantas desse tratamento. Além disso, nas raízes aos 20 dias de estresse hídrico, a peroxidação lipídica foi considerada normal, uma vez que, essas plantas apresentaram conteúdos de malondialdeído iguais aos de plantas sob irrigação próxima a capacidade de campo. Esse resultado, explica o maior crescimento dessas raízes e o menor potencial hídrico encontrado nesse tratamento, pois, aparentemente, as raízes dessas plantas não sofreram danos com o estresse

hídrico, ao contrário de plantas de déficit hídrico não tratadas ou tratadas com 500 μM de melatonina, que tiveram cerca de 50% a mais de peroxidação lipídica. Esse aumento na peroxidação observado nessas plantas pode ter causado problemas na condutividade hidráulica das suas raízes, comprometendo a absorção e transporte de água e fazendo com que essas plantas apresentassem maior estresse hídrico.

Alterações nos níveis de peroxidação lipídica servem para demonstrar a extensão do dano causado pelo estresse oxidativo. De modo geral, em plantas tratadas com melatonina são notadas reduções nos conteúdos de MDA, como observado em *Cucumis sativus* L. (ZHANG et al., 2013), e *Vigna radiata* (SZAFRANSKA et al., 2012). Arelado a isso, evidências apontam que a suplementação com melatonina beneficia o desempenho das plantas frente aos estresses abióticos, promovendo aumento no sistema antioxidante e impedindo com isso os efeitos nocivos das EROs (ARNAO; HERNÁNDEZ-RUIZ, 2014; ZHANG et al., 2014).

Uma vez que a melatonina proporciona tolerância a estresses em plantas, os resultados desse estudo sugerem que sob estresse hídrico, a dose de 300 μM de melatonina promove um aumento de componentes do sistema antioxidante enzimático e não enzimático, contribuindo para menores danos celulares, permitindo a manutenção da integridade do aparato fotossintético e crescimento vegetal.

Considerações Finais

Diante desses resultados sugere-se que a melatonina pode ter uma aplicação prática na implantação de lavouras cafeeiras, uma vez que durante o plantio, as mudas são mais sensíveis às restrições hídricas. Em contrapartida, estudos em campo devem ser realizados para comprovar esses resultados obtidos em casa de vegetação.

Conclusão

1. A dose de 300 μM de melatonina promoveu tolerância à seca em mudas de *Coffea arabica* L., uma vez que induziu o crescimento de raízes evitando a redução do potencial hídrico.
2. Sob estresse hídrico, a concentração de 300 μM melatonina promoveu proteção ao aparato fotossintético, permitindo maiores trocas gasosas e maiores conteúdos de clorofila, promovendo ainda, após a reidratação, melhor recuperação dessas plantas, uma vez que exibiram maior eficiência de carboxilação e síntese de clorofila.
3. A melatonina possui efeito bimodal, uma vez que a dose mais alta (500 μM) provocou efeitos negativos na tolerância ao estresse, provavelmente por se apresentar como nível tóxico.

Referências

- Arakawa, Y.; Wada, O.; Yu, T. H. Dealkylation and distribution of tin compounds. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 60, n. 1, p. 1-7, 1981.
- Arnao, M. B.; Hernández-Ruiz, J. Melatonin promotes adventitious-and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. **Journal of pineal research**, v. 42, n. 2, p. 147-152, 2007
- Arnao, M. B.; Hernández-Ruiz, J. Melatonin: plant growth regulator and/or biostimulator during stress? **Trends in plant science**, v. 19, n. 12, p. 789-797, 2014.
- Arnao, M. B.; Hernández-Ruiz, J. Protective effect of melatonin against chlorophyll degradation during the senescence of barley leaves. **Journal of pineal research**, v. 46, n. 1, p. 58-63, 2009.
- Arnao, M. B.; Hernández-Ruiz, J. The physiological function of melatonin in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 1, n. 3, p. 89-95, 2006.

- Awad, J.; Stotz, H. U.; Fekete, A.; Krischke, M.; Engert, C.; Havaux, M.; Berger, S.; Mueller, M. J. 2-Cysteine Peroxiredoxins and Thylakoid Ascorbate Peroxidase Create a Water-Water Cycle That Is Essential to Protect the Photosynthetic Apparatus under High Light Stress Conditions. **Plant physiology**, v. 167, n. 4, p. 1592-1603, 2015.
- Barbosa, M. R.; Silva, M. M. D. A.; Willadino, L.; Ulisses, C.; Camara, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- Barros, R. S.; Vieira, M.; M Braga Filho, L. J. Determinação da área de folhas do café (*Coffea arabica* L. cv. Bourbon Amarelo). **Revista Ceres (Brasil)** v. 20 (107) p. 44-52, 1973.
- 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.
- Biemelt, S.; Keetman, U.; Albrecht, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- 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, 1976.
- Buege, J. A.; Aust, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- CONAB . Acompanhamento da safra brasileira de café, v. 2 - Safra 2015, n. 2 - Segundo Levantamento, Brasília, p. 1-59, jun. 2015
- De Fátima Fumis, T.; Pedras, J. F. Variação nos níveis de prolina, diamina e poliaminas em cultivares de trigo submetidas a déficits hídricos. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 37, n. 4, p. 449-453, 2002.
- Foyer, C. H.; Noctor, G. Tansley review no. 112. **New phytologist**, v. 146, n. 3, p. 359-388, 2000.

- Ghannoum, O. C4 photosynthesis and water stress. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 635-644, 2009.
- Ghannoum, O.; Conroy, J. P.; Driscoll, S. P.; Paul, M. J.; Foyer, C. H.; Lawlor, D. W. Nonstomatal limitations are responsible for drought-induced photosynthetic inhibition in four C4 grasses. **New Phytologist**, v. 159, n. 3, p. 599-608, 2003.
- Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.
- Gomide, M. B.; Lemos, O. V.; Tourino, D.; Carvalho, M. D.; CARVALHO, J. D.; Duarte, C. D. S. Comparação entre métodos de determinação de área foliar em cafeeiros Mundo Novo e Catuaí. **Ciência Prática**, v. 1, n. 2, p. 118-123, 1977.
- Guimarães, R. J.; Mendes, A. N. G.; Souza, C. A. S. **Cafeicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 317 p. 2002.
- Hammond, J. P.; White, P. J. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. **Journal of experimental botany**, v. 59, n. 1, p. 93-109, 2008.
- Kang, J.; Hwang, J. U.; Lee, M.; Kim, Y. Y.; Assmann, S. M.; Martinoia, E.; Lee, Y. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. **Proceedings of the National Academy of sciences**, v. 107, n. 5, p. 2355-2360, 2010.
- Karabal, E.; Yücel, M.; Öktem, H. A. Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. **Plant Science**, v. 164, n. 6, p. 925-933, 2003.
- Karuppanapandian, T.; Moon, J. C., Kim, C.; ManOHARAN, K.; Kim, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.

- Koch, K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 3, p. 235-246, 2004.
- Koshiha, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, v. 34, n. 5, p. 713-721, 1993.
- Liu, J.; Wang, W.; Wang, L.; Sun, Y. Exogenous melatonin improves seedling health index and drought tolerance in tomato. **Plant Growth Regulation**, v. 77, n. 3, p. 317-326, 2015.
- Melo, E. F.; Fernandes-Brum, C. N.; Pereira, F. J.; Castro, E. M. D.; Chalfun-Júnior, A. Anatomic and physiological modifications in seedlings of *Coffea arabica* cultivar Siriema under drought conditions. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 1, p. 25-33, 2014.
- Mengutay, M.; Ceylan, Y.; Kutman, U. B.; Cakmak, I. Adequate magnesium nutrition mitigates adverse effects of heat stress on maize and wheat. **Plant and soil**, v. 368, n. 1-2, p. 57-72, 2013.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- Minolta, C. Manual for chlorophyll meter SPAD-502. **Osaka: Minolta Radiometric Instruments Divisions**, 1989.
- Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- Nishiyama, Y.; Allakhverdiev, S. I.; Murata, N. Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Physiologia Plantarum**, v. 142, n. 1, p. 35-46, 2011.
- Park, S.; Back, K. Melatonin promotes seminal root elongation and root growth in transgenic rice after germination. **Journal of pineal research**, v. 53, n. 4, p. 385-389, 2012.

- Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Zhou, Z.; Cruz, M. H. C.; Fuentes-Broto, L.; Galano, A. Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7396-7437, 2015.
- Reiter, R. J.; Tan, D. X.; Zhou, Z.; Cruz, M. H. C.; Fuentes-BroTO, L.; Galano, A. Phytomelatonin: assisting plants to survive and thrive. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 7396-7437, 2015.
- Rosa, M.; Prado, C.; Podazza, G.; Interdonato, R.; González, J. A.; HilaL, M.; Prado, F. E. Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. **Plant signaling & behavior**, v. 4, n. 5, p. 388-393, 2009.
- Sarropoulou, V.; Dimassi-Theriou, K.; Therios, I.; Koukourikou-Petridou, M. I. Melatonin enhances root regeneration, photosynthetic pigments, biomass, total carbohydrates and proline content in the cherry rootstock PHL-C (*Prunus avium*× *Prunus cerasus*). **Plant physiology and biochemistry**, v. 61, p. 162-168, 2012.
- Scandalios, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant physiology**, v. 101, n. 1, p. 7, 1993.
- Schachtman, D. P.; Goodger, J. QD. Chemical root to shoot signaling under drought. **Trends in plant science**, v. 13, n. 6, p. 281-287, 2008.
- Scholander, P. F. et al. Hydrostatic pressure and osmotic potentials in 67 leaves of mangroves and some other plants. **Proceedings of National Academy Science of the United States of America**, Washington, v. 52, n. 1, p. 119-125, Jul. 1964.
- Sharma, P.; Jha, A. B.; Dubey, R. S.; Pessarakli, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, 2012.

- Sharp, R. E.; Lenoble, M. E. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 33-37, 2002.
- Silva, F. AS.; Azevedo, CAV de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2002.
- Silva, V. A.; Antunes, W. C.; Guimarães, B. L. S.; Paiva, R. M. C.; De Fátima Silva, V.; Ferrão, M. A. G.; Damatta, F. M.; Loureiro, M. E. Resposta fisiológica de clone de café Conilon sensível à deficiência hídrica enxertado em porta-enxerto tolerante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 5, p. 457-464, 2011.
- Szafrańska, K.; Glińska, S.; Janas, K. M. Changes in the nature of phenolic deposits after re-warming as a result of melatonin pre-sowing treatment of *Vigna radiata* seeds. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 1, p. 34-40, 2012.
- Takahashi, S.; Murata, N. Glycerate-3-phosphate, produced by CO₂ fixation in the Calvin cycle, is critical for the synthesis of the D1 protein of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1757, n. 3, p. 198-205, 2006.
- Wang, L. Y.; Liu, J. L.; Wang, W. X.; Sun, Y. Exogenous melatonin improves growth and photosynthetic capacity of cucumber under salinity-induced stress. **Photosynthetica**, v. 54, n. 1, p. 19-27, 2015.
- Wang, P.; Yin, L.; Liang, D.; Li, C., Ma, F.; Yue, Z. Delayed senescence of apple leaves by exogenous melatonin treatment: toward regulating the ascorbate–glutathione cycle. **Journal of pineal research**, v. 53, n. 1, p. 11-20, 2012

- Wang, P.; Sun, X.; Li, C.; Wei, Z.; Liang, D.; Ma, F. Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 292-302, 2013a.
- Wang, P.; Sun, X.; Chang, C.; Feng, F.; Liang, D.; Cheng, L.; Ma, F. Delay in leaf senescence of *Malus hupehensis* by long-term melatonin application is associated with its regulation of metabolic status and protein degradation. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 4, p. 424-434, 2013b.
- Wang, L.; Zhao, Y.; Reiter, R. J.; He, C.; Liu, G.; Lei, Q.; Zuo, B.; Zheng, X. D.; Li, Q.; Kong, J. Changes in melatonin levels in transgenic 'Micro-Tom' tomato overexpressing ovine AANAT and ovine HIOMT genes. **Journal of Pineal Research**, v. 56, n. 2, p. 134-142, 2014.
- Xu, W.; Cui, K.; Xu, A.; Nie, L.; Huang, J.; Peng, S. Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 37, n. 2, p. 1-11, 2015.
- Xu, Z.; Zhou, G.; Shimizu, H. Plant responses to drought and rewatering. **Plant signaling & behavior**, v. 5, n. 6, p. 649-654, 2010.
- Yamamoto, Y. et al. Quality control of photosystem II: impact of light and heat stresses. **Photosynthesis Research**, v. 98, n. 1-3, p. 589-608, 2008.
- Yamashita, A. et al. Quality control of photosystem II reactive oxygen species are responsible for the damage to photosystem II under moderate heat stress. **Journal of Biological Chemistry**, USA, v. 283, n. 42, p. 28380-28391, 2008.
- Yardanov, I.; Velikova, V.; Tsonev, T. Plant responses to drought and stress tolerance. **Bulgaria Journal Plant Physiology**, Bulgaria, n. Special Issue, p. 187-206, 2003.

- Yemm, E. W.; Willis, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical journal**, v. 57, n. 3, p. 508, 1954.
- Zhang, N.; Sun, Q.; Zhang, H.; Cao, Y.; Weeda, S.; Ren, S.; Guo, Y. D. Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. **Journal of Experimental Botany**, p. eru336, 2014.
- Zhang, N.; Zhao, B.; Zhang, H. J.; Weeda, S.; Yang, C.; Yang, Z. C.; Ren, S.; Guo, Y. D. Melatonin promotes water-stress tolerance, lateral root formation, and seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 15-23, 2013.
- Zhao, H.; Su, T.; Huo, L.; Wei, H.; Jian G, Y.; Xu, L.; Ma, F. Unveiling the mechanism of melatonin impacts on maize seedling growth: sugar metabolism as a case. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 2, p. 255-266, 2015.

APÊNDICE A - Figuras

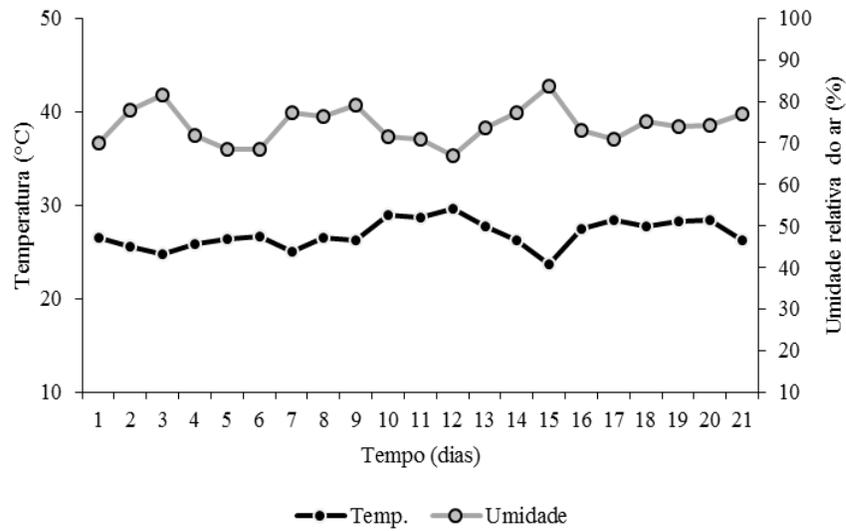


Figura 1: Médias diárias de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) durante o período experimental.

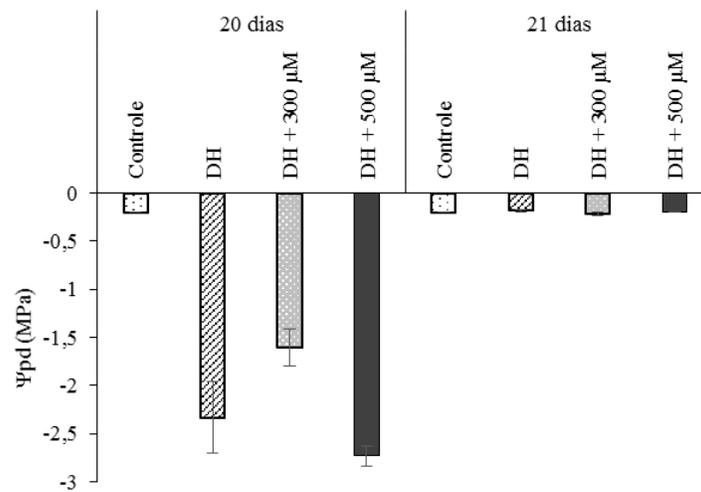


Figura 2: Potencial hídrico foliar antemanhã (Ψ_{pd}) em mudas de cafeeiro submetidas ao déficit hídrico e diferentes tratamentos de melatonina (300 μM e 500 μM). As barras representam o erro padrão das médias de três repetições.

Tabela 1: Massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR) e área foliar total (AFT) de mudas de cafeeiro submetidas ao déficit hídrico e diferentes tratamentos de melatonina (300 μM e 500 μM).

As letras comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

		MS PA (g)	MS Raiz (g)	Raiz/PA	AFT (cm ²)
21 dias	Controle	7,807 a	1,427 c	0,1824 b	818,088 a
	DH	5,061 b	1,657 b	0,3294 a	631,484 c
	DH + 300 μM	7,087 a	2,308 a	0,3257 a	736,488 b
	DH + 500 μM	5,799 b	1,850 b	0,3247 a	644,246 c

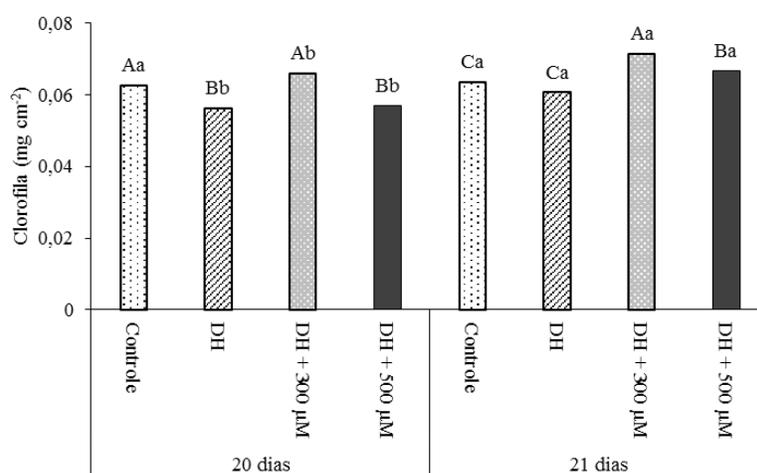


Figura 3: Teores de clorofila em mudas de cafeeiro submetidas ao déficit hídrico e diferentes tratamentos de melatonina (300 μM e 500 μM).

As letras comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas fazem comparação entre os tempos dentro de um mesmo tratamento.

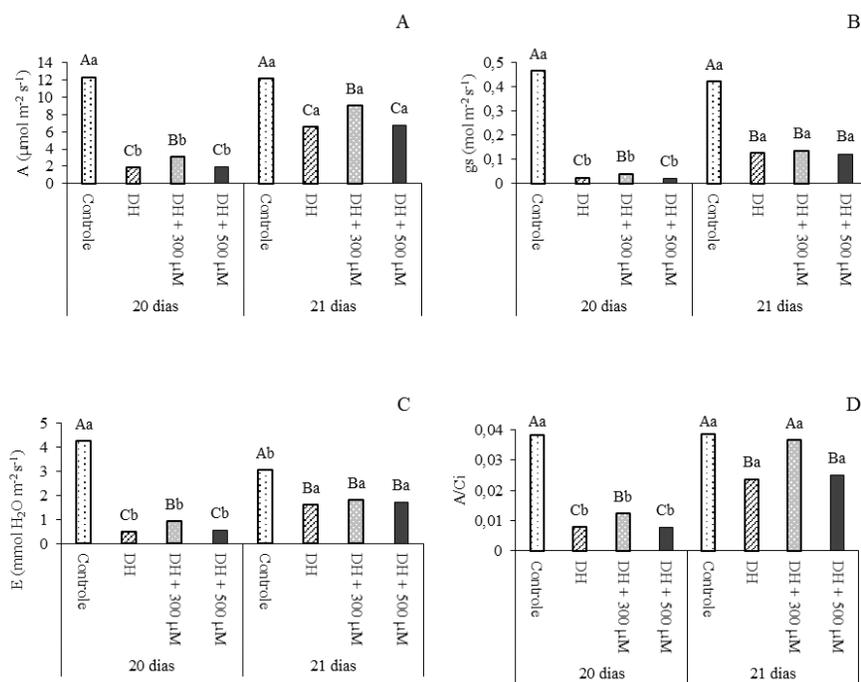


Figura 4: Taxa assimilatória líquida (A), condutância estomática (B), taxa transpiratória (C) e eficiência de carboxilação (D) de mudas de café submetidas ao déficit hídrico e diferentes tratamentos de melatonina (300 μM e 500 μM).

As letras comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas fazem comparação entre os tempos dentro de um mesmo tratamento.

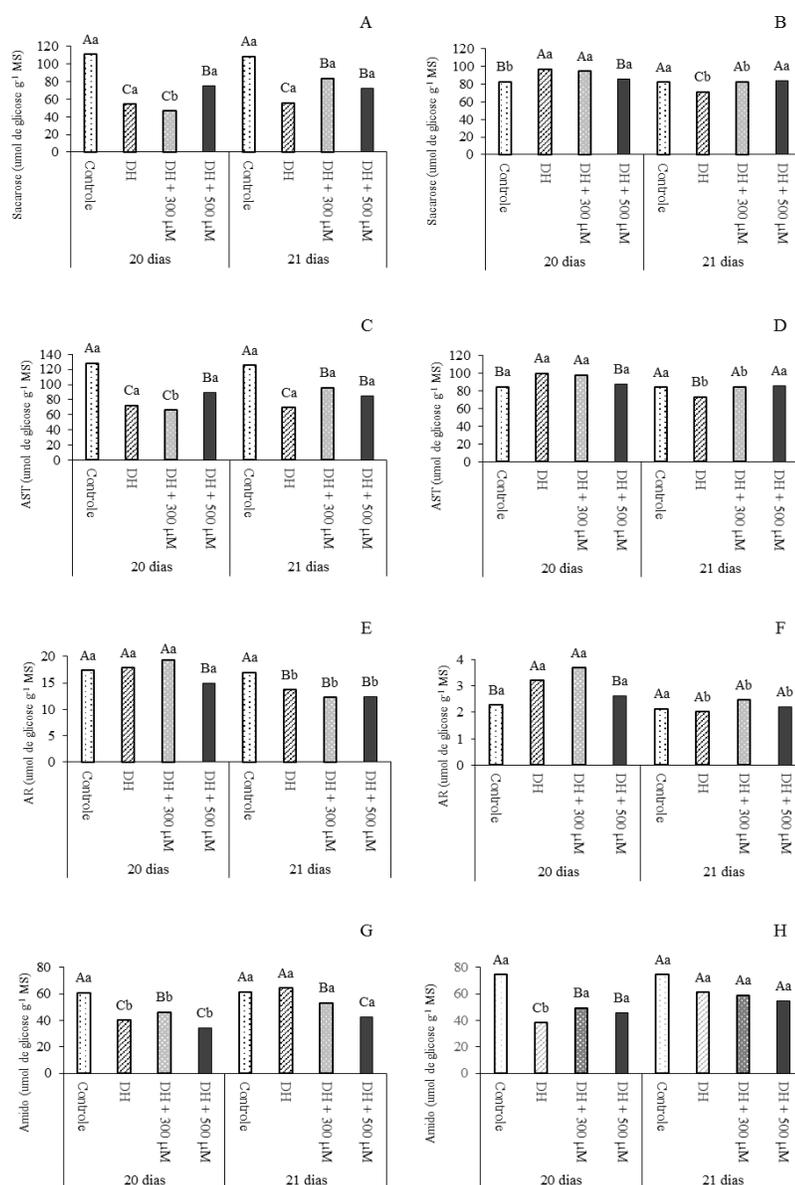


Figura 5: Conteúdo de sacarose (A, B), açúcares solúveis totais (C, D), açúcares redutores (E, F) e amido (G, H) em folhas e raízes de mudas de café submetidas ao déficit hídrico e diferentes tratamentos de melatonina (300 µM e 500 µM).

As letras comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas fazem comparação entre os tempos dentro de um mesmo tratamento.

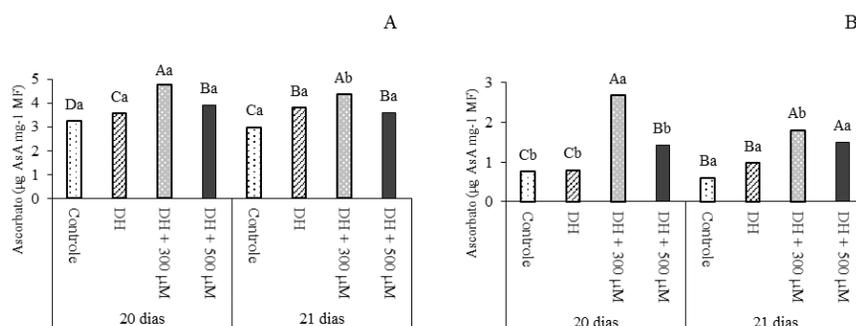


Figura 7: Níveis de Ascorbato em folhas (A) e raízes (B) de mudas de caféiro submetidas ao déficit hídrico e diferentes tratamentos de melatonina (300 µM e 500 µM).

As letras comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas fazem comparação entre os tempos dentro de um mesmo tratamento.

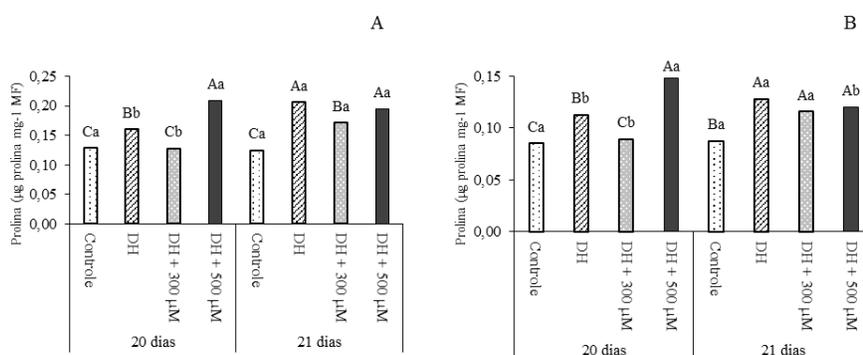


Figura 8: Níveis de prolina em folhas (A) e raízes (B) de mudas de caféiro submetidas ao déficit hídrico e diferentes tratamentos de melatonina (300 µM e 500 µM).

As letras comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas fazem comparação entre os tempos dentro de um mesmo tratamento.

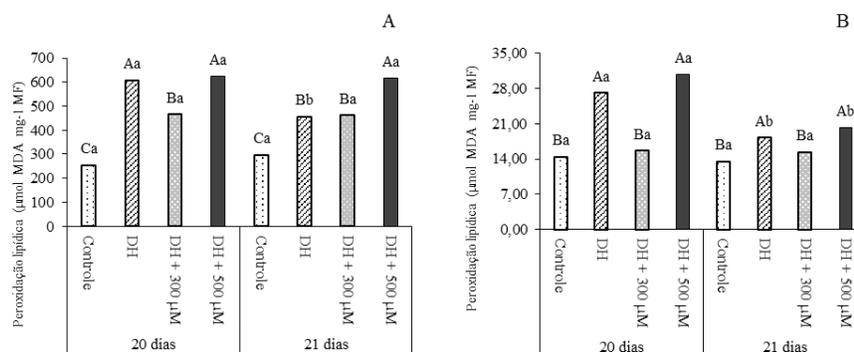


Figura 9: Concentração de malondialdeído em folhas (A) e raízes (B) de mudas de café submetidas ao déficit hídrico e diferentes tratamentos de melatonina (300 µM e 500 µM).

As letras comparam o efeito dos tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. Letras maiúsculas denotam comparações entre os tratamentos dentro de um mesmo tempo, e letras minúsculas fazem comparação entre os tempos dentro de um mesmo tratamento.