

SISTEMA ANTIOXIDATIVO DE *COFFEA* sp. NA CAPACIDADE DE ACLIMATAÇÃO A ESTRESSE SIMULTÂNEO DE FRIO E SECA¹

Ana Sofia Fortunato²; Luis Filipe Goulao²; Ana Dias Rodrigues³; Phil Jackson⁴; Fábio Luiz Partelli⁵; Ana Isabel Ribeiro²; José Cochicho Ramalho²

¹ Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia – FCT/MCTES (proj. PTDC/AGR-AAM/64078/2006 e bolsa SFRH/BPD/47563/2008)

² Pesquisadores, D.Sc., Centro Eco-Bio/IICT, Oeiras, Portugal, anasofia@itqb.unl.pt; goulao@iict.pt; aribeiro@itqb.unl.pt; cochichor@iict.pt

³ Pesquisador, M.Sci., Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, anadr@isa.utl.pt

⁴ Pesquisador, D.Sc., Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal, phil@itqb.unl.pt

⁵ Professor, D.Sc., do CEUNES/UFES, São Mateus-ES, Brasil, partelli@yahoo.com.br

RESUMO: O estresse oxidativo é um problema de ocorrência comum nas plantas quando sujeitas a condições ambientais adversas. A produção de espécies reativas de oxigênio aumenta ao nível dos fotossistemas quando a absorção de energia luminosa excede o seu uso através da fotossíntese, quer devido a elevados valores de irradiância, quer devido a danos diretos ou indiretos ao nível do aparelho fotossintético. Desta forma, a existência e o reforço de mecanismos antioxidativos em condições do estresse ambiental são determinantes para a aquisição de mecanismos de tolerância que permitam a sobrevivência das plantas e persistência nos seus habitats. O café é normalmente cultivado em áreas tropicais e sub-tropicais onde episódios de ocorrência simultânea de seca e frio são frequentes, tendo enorme impacto negativo ao nível da produção. Apesar da conhecida sensibilidade do género *Coffea* ao estresse, alguma capacidade de tolerância foi já demonstrada, nomeadamente no genótipo 'Icatu'. Com base nos resultados apresentados, esta capacidade de aclimação poderá estar relacionada com a ocorrência de uma transcrição e atividades enzimáticas constitutivamente mais elevadas das enzimas responsáveis pelos mecanismos de proteção antioxidante, juntamente com o aumento da expressão e atividade em condições de estresse, em condições em que o sistema antioxidativo é insuficiente. Estes resultados promissores podem contribuir para o desenvolvimento de ferramentas de seleção de germoplasma a serem exploradas em programas de melhoramento para tolerância a estresses abióticos.

Palavras-chave: café, estresse abiótico, estresse oxidativo, melhoramento.

THE ANTIOXIDANTIVE SYSTEM IN *COFFEA* SP. IN THE ACCLIMATION TO SIMULTANEOUS CHILLING AND DROUGHT STRESS¹

ABSTRACT: Oxidative stress has been considered a common problem in plants growing in adverse environmental conditions. Excess photon energy caused by such abiotic stress conditions exert, at least part, their effect by overproducing reactive oxygen species (ROS), which results in detrimental oxidative damage to the cells. Increasing the antioxidant defense mechanisms helps to promote acclimation and recovering responses being, therefore, crucial for plant survival. Coffee is grown in tropical and sub-tropical areas where environmental conditions like drought and cold often causes important yield reductions. Some acclimation ability to cold has been reported within the *Coffea* genus namely in 'Icatu'. The results here reported suggest that the superior ability to cope with stress may reflect the constitutively higher gene expression and enzyme activity of several members and families of the anti-oxidative core network that confer protection, together with an increased expression and activity under those conditions in which the anti-oxidative system is insufficient to control the damage caused by the stress. These promising results can contribute to the development of useful tools to identify suitable stress tolerant genotypes in coffee breeding programs.

Key words: coffee, abiotic stress, oxidative stress, breeding.

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é hoje considerado um problema de ocorrência comum nas plantas quando sujeitas a condições ambientais adversas. A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) aumenta ao nível dos fotossistemas quando a absorção de energia luminosa excede o seu uso através da fotossíntese, quer devido a elevados valores de irradiância, quer devido a um menor nível de funcionalidade do aparelho fotossintético decorrente de processos de regulação ou de danos diretos ou indiretos.

Em situações de seca e frio, que normalmente ocorrem em simultâneo nas áreas tropicais e sub-tropicais onde o café é cultivado, as reações químicas e enzimáticas sofrem decréscimos devido a limitações impostas pelo fecho estomático e também, normalmente numa fase posterior, devido a limitações ao nível do mesófilo. A ação conjunta

destes dois eventos resulta num aumento da diferença entre a captura e a utilização de energia que se traduz frequentemente numa maior produção de EROs ao nível celular.

A existência e reforço de mecanismos antioxidativos em condições de estresse ambiental são, deste modo, determinantes para a aquisição de mecanismos de tolerância que permitam a sobrevivência das plantas e persistência nos seus habitats. Este controle pode ser exercido principalmente por meio de 3 estratégias: 1) minimizar a absorção de energia; 2) aumento da dissipação dessa energia por via de processos fotoquímicos e não fotoquímicos; 3) controlar a produção e/ou promover a desintoxicação por meio da eliminação de EROs. Estes mecanismos devem ser considerados como atuando em conjunto quando se pretende estudar as estratégias de aclimação de uma planta a condições de estresse.

Dados anteriores referem a existência de diferenças na capacidade de tolerância ao estresse dentro do género *Coffea*. Neste contexto pretende-se investigar o sistema antioxidativo de *Coffea* e avaliar se a sua dinâmica poderá estar na base das diferenças observadas em génotipos distintos no que diz respeito à sua diferente capacidade de resposta ao estresse de frio e seca ocorrendo em simultâneo. Neste sentido, foi realizada uma abordagem ao nível bioquímico e molecular que englobou a determinação da atividade de enzimas antioxidantes, nomeadamente: peroxidases de ascorbato, catalases, Cu/Zn-superóxido dismutase e redutases do glutationa, bem como os níveis de expressão de genes relacionados.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e imposição de estresse conjunto de seca e frio: Foram usadas plantas cultivadas em vasos com aproximadamente 1,5 anos, de 2 génotipos com capacidades distintas de tolerância a baixas temperaturas positivas: 'Icatu' (IAC 2944 - *C. canephora* x *C. arabica*) e 'Apoatã' (IAC 2258 - *C. canephora*), mostrando o primeiro uma menor sensibilidade ao frio (Ramalho et al., 2003; Fortunato et al., 2010; Batista-Santos et al., 2011). As plantas foram transferidas para câmaras de crescimento (10000 EHHF, ARALAB, Portugal) e mantidas com um fotoperíodo de 12 h, uma humidade relativa de 65-70% e uma irradiância de 750-850 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Após um período de aclimação, as plantas foram divididas em dois grupos: um grupo controle mantido bem irrigado (em torno de 80% da capacidade de campo) e um grupo submetido a estresse (em torno de 15% da capacidade de campo). Os níveis desejados de água no solo foram verificados e mantidos diariamente. O grupo de plantas em estresse foi então submetido sucessivamente a: i) um decréscimo gradual da temperatura (0,5 °C/dia) desde os 25/20 °C (dia/noite) até aos 13/8 °C (frio 1) durante 24 dias, de modo a permitir a expressão da capacidade de aclimação; ii) três dias de "chilling" (13/4°C; frio 2), onde as plantas foram sujeitas a 4 °C durante a noite e as primeiras 4 h da manhã, seguindo-se um incremento da temperatura para 13 °C aplicados durante o resto do período diurno; iii) um período de 15 dias de recuperação do frio de novo até condições de 25/20 °C (recup. frio); e iv) restabelecimento do nível de hidratação para 80% da capacidade de campo por mais 7 dias (recup. seca). Em cada ponto recolheram-se amostras de folhas recentemente maduras de 5 plantas por génotipo. O material vegetal foi congelado em N₂ líquido e armazenado a -80 °C.

Determinação de atividades enzimáticas: As atividades enzimáticas de Cu/Zn-superóxido dismutases (SOD), redutases de glutatona (GR), catalases (CAT) e peroxidases de ascorbato (APX) foram determinadas de acordo com métodos previamente otimizados para folhas de café (Ramalho et al., 1998; Lima et al., 2002). Os resultados são apresentados em termos de diferença na atividade medida na cultivar 'Icatu' em função da atividade medida na cultivar 'Apoatã', expressa como o valor do log₂ da atividade normalizada.

Isolamento do RNA e síntese de cDNA: O RNA total foi isolado com recurso ao kit "RNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, Germany) seguindo as instruções do fabricante. A eventual contaminação com DNA genómico foi ultrapassada com o uso do kit "Qiagen DNase" de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi verificada em gel 1% de agarose e a concentração e grau de pureza foram determinados num espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies; Thermo Scientific). Usaram-se 650 μg de RNA total para síntese de cada cDNA, com o primer oligo-(dT)₁₈ e o sistema "SuperScript II first-strand synthesis" (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

Análise da expressão de genes por PCR quantitativo em tempo real: A expressão dos genes selecionados foi avaliada por PCR quantitativo num iQTM5 Real-Time Detection System (BioRad) com SYBR Green como fluoróforo e iniciadores específicos desenhados para a sequência de cada gene alvo. Selecionaram-se 14 genes alvo, em função do seu papel conhecido na modulação dos níveis de EROs a nível celular. As sequências das 4 Cu/Zn-superóxido dismutases, as 2 redutases de monodehidroascorbato (MDHAR), as 2 redutases de dehidroascorbato (DHAR), a redutase de glutatona e as 3 catalases estudadas foram identificadas nas bases de dados de EST ("Expressed Sequence Tags") de *Coffea* (Vidal et al., 2010). As sequências dos transcriptos da peroxidase de ascorbato citosólica (APXc) e do tilacóide (APXt) foram obtidas através de clonagem por homologia com ortólogos identificados noutras espécies (Goulao et al., 2008). Os valores da expressão génica foram normalizados em função da média geométrica de 4 genes de referência (Vandesompele et al., 2002), cuja expressão é constante no material e condições usadas: ubiquitina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, ciclofilina e actina (dados não apresentados). Os resultados são apresentados como a variação da abundância de cada transcripto (em log₂) em função da expressão em condições controle de frio e seca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que os 2 genótipos estudados responderam de forma diferente à imposição controlada de estresse simultâneo de frio e seca. Quando retomadas as condições de crescimento ótimas, após os períodos de recuperação de frio e de seca para os níveis de controle, a globalidade das plantas da cultivar ‘Icatu’ apresentavam um desenvolvimento semelhante àquele que demonstravam antes do estresse, semelhante ao das condições de controle (Figura 1). As plantas sujeitas a estresse hídrico mostraram frequentemente melhor aspecto (menor área necrosada) após exposição ao frio do que as plantas mantidas bem regadas. Por outro lado, a generalidade das plantas da cultivar ‘Apoatã’ mostraram que foram visivelmente afetadas em resultado do estresse a que foram sujeitas (Figura 1).

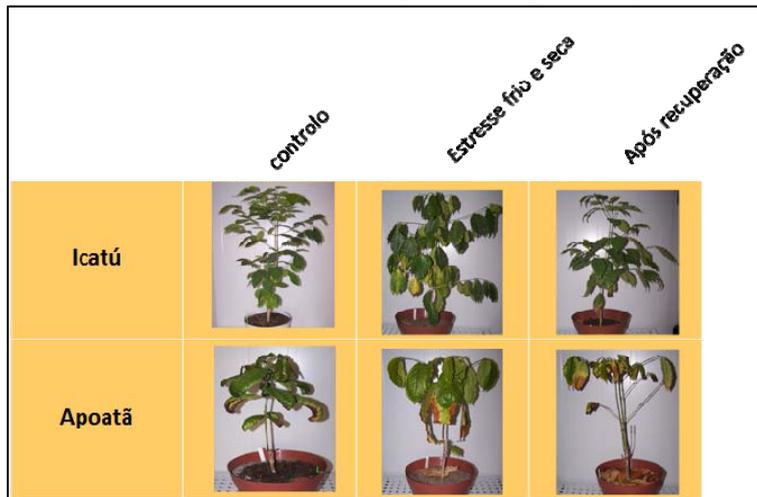


Figura 1 – Aspecto de plantas representativas de genótipos com capacidade contrastante de tolerância, em condições de estresse múltiplo e após retorno às condições ótimas de desenvolvimento.

Estas observações visuais indicam uma maior capacidade de aclimatação e de tolerância a condições ambientais adversas, nas condições do ensaio, por parte da cultivar ‘Icatu’, confirmando resultados anteriores do nosso grupo, em trabalhos envolvendo outros estresses abióticos (Ramalho et al., 2003; Fortunato et al., 2010; Batista-Santos et al., 2011). Esta maior capacidade de tolerância a estresses abióticos poderá estar ligada, em larga medida, à capacidade de controlar o estresse oxidativo e, por isso, os seus danos ao nível celular (Fortunato et al., 2010).

De fato, a maioria dos estresses abióticos, incluindo o frio e a seca, induzem distúrbios no balanço metabólico das células, resultando num incremento na produção de EROs (Miller et al., 2008). A acumulação de EROs é considerada como um sub-produto do metabolismo de estresse. As plantas desenvolveram uma rede eficiente de mecanismos de eliminação destes produtos, permitindo-lhes simultaneamente destoxificar as células e, paralelamente, utilizar algumas destas moléculas como intermediários em cascatas de sinalização, regulando o número de processos biológicos além de tolerância a estresses, como o crescimento, ciclo celular, morte celular programada, sinalização hormonal e desenvolvimento (Mittler et al., 2004). Deste modo, é sabido que plantas que possuem níveis elevados de atividade do seu sistema antioxidativo, quer constitutivos, quer induzidos, revelam maior resistência a estresse que promovem a sobre produção de EROs a nível celular e sub-celular.

Neste trabalho, foram avaliados os níveis de atividade enzimática e de expressão génica dos principais enzimas envolvidos no controle dos níveis celulares de EROs, que permitem às plantas um balanço entre desintoxicação e sinalização. Observa-se que na cultivar ‘Icatu’, em condições de controle, todos os enzimas estudados apresentam maior atividade (Figura 2A) e expressão génica (Figura 2B), o que indica que esta cultivar tem níveis constitutivos de proteção antioxidativa mais elevados. Este fato poderá ser um fator determinante na maior capacidade de tolerância aos estresses impostos observada neste genótipo.

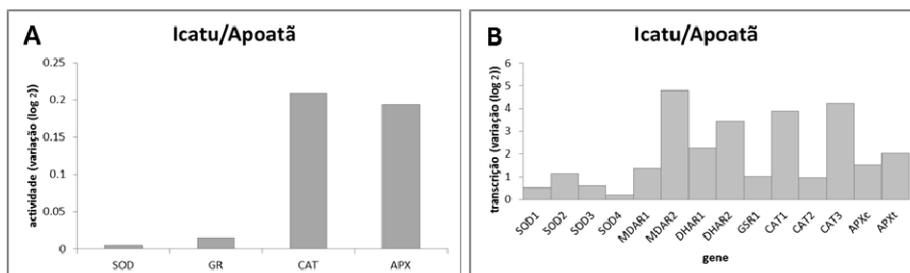


Figura 2 – Diferenças dos níveis constitutivos de atividade enzimática (A) e expressão génica (B) de enzimas do sistema antioxidativo, quantificados na cultivar ‘Icatu’ em relação à cultivar ‘Apoatã’.

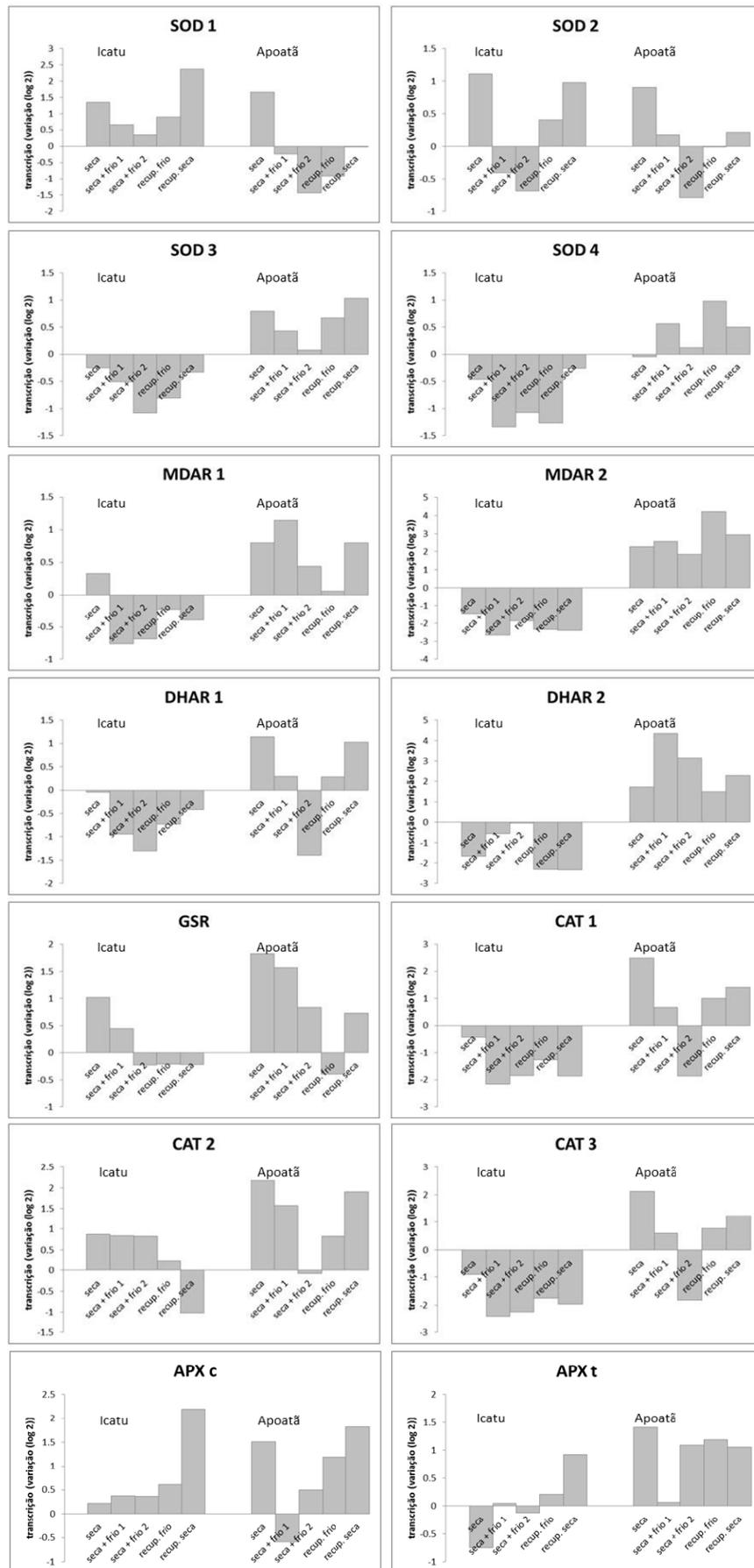


Figura 3 – Diferenças na expressão gênica de membros de famílias de enzimas do sistema antioxidativo quantificadas através de PCR quantitativo durante a imposição dos estresses e recuperação, e expressas em variação (log₂), relativamente a condições de controle de frio e seca.

No que diz respeito à indução ou repressão da expressão de genes em resposta aos estresses impostos, observa-se que, na generalidade dos genes estudados, a expressão é induzida pelo estresse imposto em 'Apoatã', sendo reprimida em 'Icatu' (Figura 3). A expressão dos genes SOD1, SOD2 e APXc (principalmente ao nível do ponto de recuperação de seca) apresenta-se como exceção em Icatu já que são induzidos (Figura 3).

A necessidade de indução da expressão destes genes em resposta ao estresse (Figura 3) poderá estar relacionada com a sua menor expressão constitutiva relativa (Figura 2B). Com a imposição de frio, de um modo geral, a expressão génica é reduzida, provavelmente como resultado de uma redução do metabolismo celular causado pelas baixas temperaturas.

As condições de estresse aplicado de forma gradual poderão explicar as baixas taxas de variação observadas na presença de mRNA para a generalidade dos genes (inferior a 2 (em \log_2), em função das condições de controle. De fato, nestas condições, as respostas da expressão génica de reconhecimento e sinalização não são detetadas. Por outro lado, o número de genes que respondem significativamente a estresse está correlacionado com a intensidade desse mesmo estresse (Cramer et al., 2007; Chaves et al., 2009), resultando em que a aclimação envolva a regulação de uma percentagem relativamente reduzida de genes (Bogeat-Triboulot et al., 2007).

A análise coletiva e global dos resultados sugere que as plantas da cultivar 'Icatu' possuem níveis constitutivos de enzimas de proteção, do sistema antioxidativo, capazes de fazer face às condições de estresse gradual e moderado impostas no trabalho, simulando condições reais de campo, permitindo-lhes uma boa tolerância e consequente recuperação. Por outro lado, os baixos níveis constitutivos dos mesmos enzimas em plantas da cultivar 'Apoatã', obrigam a que, para sobreviver, as células tenham que reforçar a sua maquinaria antioxidativa para remoção de EROs tóxicas, através de uma indução da sua expressão génica. Contudo, em condições de baixa temperatura a síntese dessas proteínas poderá ser dificultada, explicando a manutenção de baixos níveis de atividade (Fortunato et al., 2010).

CONCLUSÕES

Trabalhos anteriores mostraram que a cultivar 'Icatu' apresentou maior capacidade de controle do estresse oxidativo, apontando para um menor impacto e melhor recuperação do metabolismo fotossintético, bem como um menor impacto na membrana do cloroplasto em condições de frio (Ramalho et al., 2003; Fortunato et al., 2010; Batista-Santos et al., 2011).

No presente trabalho observou-se que a capacidade de aclimação poderá estar relacionada com a ocorrência de uma transcrição e atividade enzimática constitutivamente mais elevadas dos enzimas responsáveis pelos mecanismos de proteção antioxidante, juntamente com o aumento da expressão e atividade em condições de estresse, quando os níveis de funcionalidade do sistema antioxidativo são insuficientes.

Estes resultados são promissores e fornecem uma contribuição para o desenvolvimento de ferramentas de seleção de germoplasma a ser exploradas em programas de melhoramento para tolerância a estresses abióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATISTA-SANTOS, P.; LIDON, F.C.; FORTUNATO, A.; LEITÃO, A.E.; LOPES, E.; PARTELLI, F.; RIBEIRO, A.I.; RAMALHO, J.C., Cold impact on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. – Photosystems sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 792-806, 2011.
- BOGEAT-TRIBOULOT M.-B.; BROSCHE M.; RENAUT J.; JOUVE L.; Le THIEC D.; FAYYA P.; VINOGR B.; WITTERS E.; LAUKENS K.; TEICHMANN T.; ALTMAN A.; HAUSMAN J.-F.; POLLE A., KANGASJÄRVI J. ; DREYER E. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. **Plant Physiology**, v.143, p. 876-892, 2007.
- CHAVES M. M.; FLEXAS J.; PINHEIRO C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v.103, p.551-560, 2009.
- CRAMER G.; ERGÜL A.; GRIMPLET J.; TILLET R.; TATTERSALL E.; BOHLMAN M.; VINCENT D.; SONDEREGGER J.; EVANS J.; OSBORNE C.; QUILICI D.; SCHLAUCH K.; SCHOOLEY D.; CUSHMAN J. Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. **Functional & Integrative Genomics**, v. 7, p. 111-134, 2007.
- FORTUNATO A.S.; LIDON F.C.; BATISTA-SANTOS P.; LEITÃO A.E.; PAIS I.P.; RIBEIRO A.I.; RAMALHO J.C. Biochemical and molecular characterization of the antioxidative system of *Coffea* sp. under cold conditions in genotypes with contrasting tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p.333-342, 2010.
- GOULAO L.F.; VATULESCU A.D.; RIBEIRO A.; RAMALHO J.C.; JACKSON P.A. Developing a high throughput method to identify class III and ascorbate peroxidases of coffee differentially expressed under conditions of stress. **8th International Peroxidase Symposium**, 20-24 August, Tampere, Finland, 2008.
- LIMA A.L.; DaMATTA F.M.; PINHEIRO H.A.; TOTOLA M.R.; LOUREIRO M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239-247, 2002.

- MILLER G.; SHULAEV V.; MITTLER R. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. **Physiologia Plantarum** , v.133, p. 481-489, 2008.
- MITTLER R.; VANDERAUWERA S.; GOLLERY M.; VAN BREUSEGEM F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, v.9, p. 490-498, 2004.
- RAMALHO J.C.; CAMPOS P.S.; TEIXEIRA M.; NUNES M.A. Nitrogen dependent changes in antioxidant systems and in fatty acid composition of chloroplast membranes from *Coffea arabica* L. plants submitted to high irradiance. **Plant Science**, v.135, p.115–124, 1998.
- RAMALHO, J.C.; QUARTIN, V.L.; LEITÃO, E.; CAMPOS, P.S.; CARELLI, M.L.C.; FAHL, J.I.; NUNES, M.A., Cold acclimation ability and photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. **Plant Biology**, v. 5, p. 631-641, 2003.
- VANDESOMPELE J.; DE PRETER K.; PATTYN F.; POPPE B.; VAN ROY N., DE PAEPE A.; SPELEMAN F., Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control gene. **Genome Biology**, v.3, p. 34.31 - 34.11, 2002.
- VIDAL R.O.; MONDEGO J.M.C.; POT D.; AMBRÓSIO A.B.; CARVALHO-ANDRADE. A High-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species Expressed Sequence Tags suggests differential homologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, v.154, p.1053-1066, 2010.