

ATIVIDADE DAS ENZIMAS GUAIACOL PEROXIDASE E ASCORBATO PEROXIDASE EM DUAS VARIEDADES DE *Coffea arabica* L. SUBMETIDAS AO ESTRESSE INDUZIDO POR ALUMÍNIO

Bárbara Regina Bazzo¹; ² Daiane de Laat; ³ Paula Feliciano de Lima, ⁴ Carlos Colombo.

¹ Mestranda, Instituto Agronômico de Campinas-SP, barbarareginabazzo@gmail.com

² Pesquisadora, Pós Doc., Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP, daianelaat@gmail.com

³ Iniciação Científica, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP, paulalima.usp@gmail.com

⁴ Pesquisador, D. Sc., Instituto Agronômico de Campinas, Campinas-SP, iac.colombo@gmail.com

RESUMO: O alumínio é um dos principais fatores abióticos limitantes na agricultura. Os primeiros efeitos do alumínio são vistos nas raízes e seu sítio de toxicidade está localizado no ápice. Os mecanismos de defesa da planta contra o alumínio são os de tolerância e resistência, sendo os mecanismos de tolerância, aqueles que permitem o acúmulo do alumínio em locais específicos da planta. O trabalho neste trabalho foi avaliar a atividade das enzimas envolvidas na resposta antioxidativa à altas concentrações de alumínio, fornecendo um modelo para futuros estudos moleculares e bioquímicos. Plântulas com raízes de três centímetros foram colocadas em solução hidropônica com concentração de 0,370 mM de alumínio e avaliações foram realizadas ao longo de 48 horas. O material vegetal foi analisado em espectrofotômetro para as enzimas Guaiacol Peroxidase e Ascorbato Peroxidase. As análises de absorvância indicam que, em relação a atividade destas enzimas, a variedade Icatu é a que apresenta melhor resposta ao estresse induzido por alumínio, sendo esta resposta maior nas primeiras horas. Estudos envolvendo enzimas do sistema antioxidativo têm grande importância e servem como base para estudos mais avançados envolvendo bioquímica e biologia molecular, para futuros estudos de adaptação de plantas à condições ambientais estressantes.

Palavras-Chave: café, estresse oxidativo, APX, GPX

GUAIACOL PEROXIDASE AND ASCORBATE PEROXIDASE ACTIVITY IN TWO VARIETIES OF *Coffea Arabica* L. STRESS-INDUCED BY ALUMINUM

ABSTRACT: Aluminum is a major abiotic factors limiting agriculture. The first effects are seen in root and the toxicity site is located at the apexes. The mechanisms of plant defense against aluminum are the tolerance and resistance, being the tolerance mechanisms those that allow the accumulation of aluminum in specific locations of the plant. This study aimed to observe the enzymes activity involved in antioxidative response over time at high aluminum concentration, providing a model for molecular and biochemical studies. Seedlings with three centimeters roots were placed in hydroponic solution with concentration of 0.370 mM of aluminum over 48 hours. The plant material was then analyzed by spectrophotometer for the Guaiacol peroxidase and Ascorbate peroxidase enzymes. The absorbance analysis indicate that for the activity of these enzymes, the variety Icatu shows better response than Catuai to stress-induced by aluminum, higher in the first time tested. Studies of the antioxidative system enzymes are of great importance and serve as a basis for larger studies involving biochemical and molecular biology for future development of plants adapted to stressful environmental conditions.

Key words: coffee, oxidative stress, APX, GPX

INTRODUÇÃO

O alumínio é um dos principais fatores abióticos limitantes na agricultura e quando em solos ácidos, torna-se solúvel e disponível para as plantas, na forma tóxica Al^{+3} . Os solos brasileiros possuem pH de aproximadamente 5.1, níveis não recomendáveis para o cultivo do cafeeiro (COOXUPÉ, 2008; Von Uexküll; Mutert, 1995).

Os primeiros efeitos do alumínio são vistos nas raízes e seu sítio de toxicidade está localizado nos ápices. Desta forma, as pesquisas de tolerância ao Al são focadas nestas regiões (Ryan *et al.*, 1993; Sivaguru *et al.*, 1999), e têm diferenciado os mecanismos de defesa ao alumínio em duas classes principais os mecanismos de resistência e os de tolerância.

Os mecanismos de resistência impedem a entrada do metal pela raiz, protegendo os sítios intracelulares sensíveis ao ataque deste íon e incluem a imobilização do Al na parede celular, permeabilidade seletiva da membrana

plasmática, formação de uma barreira de pH na rizosfera, exsudação de quelantes e efluxo de Al (Taylor, 1988; Kochian *et al.*, 2004). Os mecanismos de tolerância são os que permitem acumular o alumínio em locais específicos da planta, em que o Al entraria no simplasto e a tolerância seria alcançada através de sua imobilização, compartimentalização ou detoxificação. Tal via incluiria quelação do Al no citosol, compartimentalização no vacúolo e expressão de proteínas ligantes de Al (Taylor, 1988; Kochian, 1995; Delhaize & Ryan, 1995).

Os efeitos causados pelo alumínio nas raízes são visíveis com pouco tempo de indução do estresse, que são seguidos por efeitos secundários em longo prazo, não causados diretamente pelo alumínio, mas como consequência a esse estresse. Neste contexto, o estresse oxidativo pode ser considerado um efeito secundário importante causado pelo alumínio. É uma condição biológica causada pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a desintoxicação do organismo. Para minimizar os efeitos do estresse oxidativo, as plantas possuem um sistema antioxidante, composto por moléculas como a guaiacol peroxidase (GPX) e a ascorbato peroxidase (APX), que participam ativamente da eliminação e quebra das moléculas de H₂O₂. (Foyer & Noctor, 2003)

O café (*Coffea arabica* L.) caracteriza-se por ser uma espécie vegetal não muito sensível ao alumínio, mas altas saturações deste metal podem comprometer o desenvolvimento de raízes nas camadas subsuperficiais do solo (Rodrigues *et al.*, 2001). Como consequência podem ocorrer retardamento do crescimento e desenvolvimento radicular, aumento do diâmetro das raízes e diminuição do número de raízes laterais (Pavan & Binghan, 1982).

Assim, o objetivo nesta pesquisa foi avaliar a atividade de enzimas envolvidas na resposta antioxidativa à altas concentrações de alumínio, fornecendo um modelo para futuros estudos moleculares e bioquímicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o ensaio biológico foram utilizadas cerca de 3500 plântulas (valor estimado a partir da taxa de germinação) de duas variedades de *Coffea arabica*, cv. Catuaí Amarelo IAC 62 e Icatu vermelho IAC 4045 com aproximadamente 40 dias de idade e três centímetros de raiz.

As plântulas foram mantidas em solução nutritiva Hoagland & Arnon (1950) adaptado conforme Braccini *et al.*, 1998 por 24 horas para aclimação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

No primeiro momento, 100 raízes foram coletadas como controle do tempo zero. A partir de então, uma solução de Al⁺³ à concentração de 0,370 mM na forma de AlCl₃³⁺ foi adicionada. Após empregar o estresse, 100 plântulas foram coletadas nos tempos 5 minutos, 1 hora, 12 horas, 24 horas e 48 horas. Para as análises de atividade enzimática, foram coletadas amostras controles nos tempos de 24 horas e 48 horas, totalizando oito tratamentos (amostras de 1 a 8 a partir do primeiro controle). As plântulas foram mantidas em pH 4,2, corrigido diariamente com NaOH 0,1 mol.L⁻¹, sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas durante o estresse.

Os ápices das raízes foram excisados e macerados em 1,2 mL de tampão de extração adaptado de Azevedo *et al.* (1998) contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio, 1 mM de EDTA e 4% (p/p) de PVP 40. O extrato foi centrifugado a 3200 rpm por 30 minutos a 10°C e o sobrenadante filtrado, com produto final de 1 mL.

Para Ascorbato Peroxidase, foi adicionado 2.810 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, 30 µL EDTA 10 mM pH 8, 10 µL de ácido ascórbico 50 mM, 10 µL de peróxido de hidrogênio 100 mM e 100 µL do extrato bruto. A reação foi iniciada com a adição do ácido ascórbico e foi monitorada a cada 10 segundos durante três minutos em absorvância de 290 nm.

A enzima Guaiacol Peroxidase começa sua reação com guaiacol e em espectrofotômetro foram adicionados 300 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM, 2900 µL de guaiacol 0,05%, 100 µL de peróxido de hidrogênio 2% e 200 µL de extrato concentrado. Para a medição da atividade, os mesmos tempos foram utilizados em absorvância de 470 nm. A atividade catalítica da enzima foi calculada de acordo com as absorvâncias obtidas e expressa em µmol.min⁻¹.mg⁻¹MF.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que os valores de atividade das enzimas Guaiacol Peroxidase e da Ascorbato Peroxidase foram próximos nos tempos de 5 minutos, 24 horas e 48 horas para as duas variedades. As maiores diferenças entre as duas ocorreram nos tempos de uma hora (GPX) e 12 horas (APX) (Figura 1 e 2), onde a variedade Catuaí apresentou os menores valores de UC para as duas enzimas em relação à variedade Icatu.

Como apresentado por Foyer & Noctor (1998), as enzimas guaiacol peroxidase e ascorbato participam da eliminação direta do H₂O₂, sendo que a primeira age no citosol, vacúolo e parede celular e a segunda nas organelas onde a detoxificação é necessária.

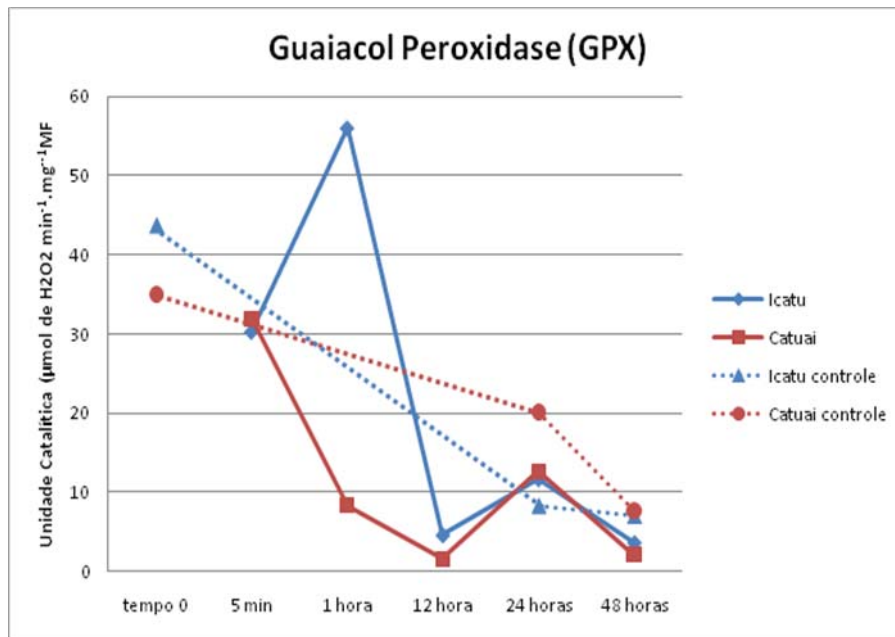


FIGURA 1 - Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase nas plântulas de Icatu e Catuai durante o período de 48 horas de estresse por alumínio.

Nota-se que, num primeiro momento, as enzimas têm um aumento de atividade com queda no tempo 12 horas e posterior aumento no tempo 24 horas, o que também foi observado por Gratao (2003) em plantas de *Nicotiana tabacum* estressadas com diferentes doses de cádmio ao longo do tempo. De acordo com o observado, as iniciais altas atividades podem estar relacionados à grande disponibilidade de H_2O_2 produzidos pelo estresse, e desta forma a guaiacol seria a principal enzima para a quebra do peróxido, já que está localizada na parede celular.

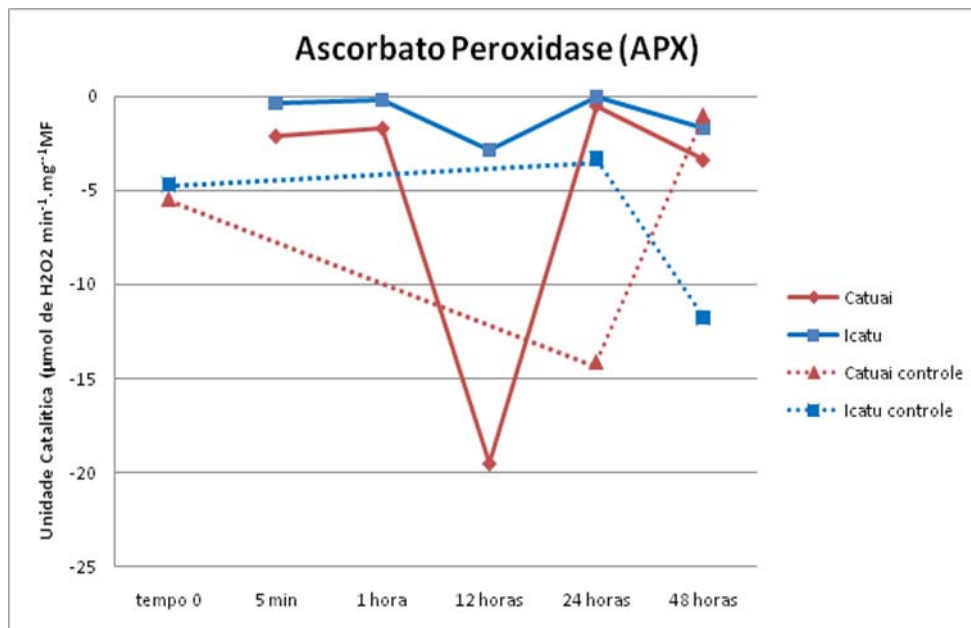


FIGURA 2 - Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase nas plântulas de Icatu e Catuai durante o período de 48 horas de estresse por alumínio.

Além disso, a variedade Icatu teve um desempenho melhor quanto à atividade das enzimas em relação ao Catuai. Isso pode ser explicado pelo *background* genético daquela variedade, já que possui genes de *Coffea canephora*, espécie mais rústica e com bom comportamento em relação a estresses abióticos, como colocado por Pavan e Bingham, 1982. Braccini *et al.* (2000) estudando linhagens de café oriundas de diferentes genótipos, concluíram que aquelas com cruzamento de origem do Icatu Vermelho 4045 apresentavam melhor crescimento radicular, e segundo os autores, foram classificadas como as mais tolerantes. Com a mesma concentração de alumínio usada nesta pesquisa, Mistro *et al.* (2007) demonstraram que a mesma variedade apresentou bom crescimento radicular em condição de estresse, considerando Icatu com índice de tolerância relativa de 61%.

Esse *background* genético pode ser a explicação para os altos valores iniciais de atividade das enzimas do sistema antioxidante nos controles (plântulas sem estresse). Tanto para Guaiacol Peroxidase quanto para a Ascorbato Peroxidase, a variedade Icatu (43,6918/-4,704 – GPX/APX) apresentou valores maiores de atividade em relação a Catuaí (34,98/-5,46 – GPX/APX), que pode ser a contribuição necessária para a detoxificação interna quando submetidas ao alumínio. Essa relação também foi estudada por Castilhos (2010) em que, genótipos tolerantes de aveia branca apresentaram altos valores de atividade enzimática sem a aplicação do estresse.

As diferenças quanto a tolerância entre os genótipos pode ter explicação para as diferentes vias de tolerância e resistência ao estresse. Rodrigues *et al.* (2006) mostraram que os genótipos Catuaí e Icatu apresentam diferentes mecanismos para adaptação ao alumínio. O primeiro mantém inalteradas as concentrações de alumínio nas folhas, mas as concentrações radiculares aumentam com a crescente saturação de alumínio, enquanto que o segundo mantém as concentrações radiculares de alumínio fixas, transportando-o para a parte aérea. Isso mostra que, em Catuaí, mecanismos de compartimentalização e exclusão estão atuando na raiz, ao passo que, em Icatu, mecanismos de tolerância, como a ação de enzimas antioxidantes, estão agindo no mesmo órgão.

A próxima etapa do projeto será corroborar os resultados obtidos nesta pesquisa, com análises de expressão gênica, cujos genes poderão ser utilizados para futuras transformações genéticas e obtenção de plantas responsivas contra o estresse ao alumínio.

CONCLUSÕES

As diferenças de tolerância ao alumínio e atividade da guaiacol e ascorbato peroxidase devem estar ligadas aos diferentes mecanismos de ajuste ao estresse ao alumínio. Enquanto a atividade de peroxidases está classificada como respostas de tolerância, a planta possui outros meios de evitar danos celulares, como a compartimentalização ou mesmo vias de impedimento da entrada do metal.

O genótipo Icatu apresenta um melhor comportamento ao estresse por alumínio, devido ao *background* genético, explicando os diferentes valores de atividade ao longo do tempo para as duas enzimas.

Nas primeiras horas de estresse ao alumínio, as variedades reagiram com um aumento significativo de atividade das enzimas peroxidase, explicado pela alta disponibilidade de peróxidos internos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIC- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO CAFÉ *Exportação - Programa Setorial Integrado – PSI*. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/exportacao.html>> Data de Acesso: 28 abril 2011.
- BRACCINI M.C.L., *et al.* Tolerância de genótipos de cafeeiro ao alumínio em solução nutritiva. I. Crescimento e desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 22, p. 435-442, 1998.
- BRACCINI, M.C.L. *et al.* Avaliação de Linhagens de Cafeeiro Quanto à Tolerância ao Alumínio Pelo Método do Papel-Solução. **Bragantia**, Campinas, v. 59, n 2, 221-226, 2000.
- CASTILHOS, G. Estresse Oxidativo em Resposta ao Alumínio em Aveia Branca. 81p. 2010.
- COOXUPÉ. *Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé LTDA*. Disponível: <https://www.cooxupe.com.br/cafe/calendario4.htm> Data de Acesso: 10 jun. 2010.
- DELHAIZE E., RYAN P. Aluminum toxicity and tolerance in plants. **Plant Physiol**. V. 107, p. 115-121, 1995.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiol. Plant**. 119: 355-364, 2003.
- GRATÃO, P. L. Análise da Resposta Antioxidativa de Células de *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 submetidas ao cádmio. 109p. 2003.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The Water Culture Method for Growing Plants without Soil. Berkeley, Cal. Agric. Exp. Station, 347 p. (Cal. Agric.exp. Station, Cir.), 1950.
- KOCHIAN LV. Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. V. 46, p. 237-260, 1995.
- KOCHIAN L.V *et al.* How do crop plants tolerate acid soils Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency? **Annual Review of Plant Biology**. V. 55, p. 459-493, 2004.
- MISTRO, J.C., FAZUOLI, L.C., GALLO, P.B. Comportamento de cultivares de café arábica em solos ácidos e corrigidos. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, 2007.
- PAVAN, M.A. & BINGHAN, F.T. Toxidez de alumínio em cafeeiros cultivados em solução nutritiva. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 17, p.1293-1302, 1982.

- RODRIGUES, L.A. *et al.* Respostas Nutricionais de Cafeeiro Catuaí e Icatu a Doses de Calcário em Subsuperfície. **R. Bras. Ci. Solo**, 30:985-995, 2006
- RYAN, P.R. *et al.* Aluminum toxicity in roots – An investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.44, n.2, p.437-446, 1993
- SIVAGURU, M. *et al.* Impacts of aluminum on the cytoskeleton of maize root apex: short-term effects on the distal part of the transition zone. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, n.3, p.1073-1082, 1999.
- TAYLOR, G.J. The physiology of aluminum phytotoxicity. In: *Metal Ions in Biological System. Aluminum and Its Role in Biology*, Edited by Sigel, H. and Sigel, A. New York: Marcel Dekker. 1988 p. 123–163.
- VON UEXKÜLL, H. R. & MUTERT, E. Global extend, development and economic – impact of acid soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.171, n.1, p.5-19, 1995.
- RODRIGUES, L.A. *et al.* Growth response of coffee tree shoots and roots to subsurface liming. **Plant Soil**. V. 234, p.207-214, 2001.