

Universidade Estadual de Campinas

Silvia Balbão Filippi

**PAPEL DA ALANTOÍNA NA NUTRIÇÃO NITROGENADA E
RESPOSTAS ANTIOXIDATIVAS DE CÉLULAS DE CAFÉ EM
SUSPENSÃO**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

2004

Data da Defesa: 22/11/2004

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (Orientador) _____

Prof. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato _____

Prof. Dr. Angelo Luiz Cortelazzo _____

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo _____

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo _____

Prof. Dr. Ladaslav Sodek _____

Prof. Dra. Cláudia Regina Baptista Haddad _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Paulo Mazzafera pela orientação.

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pela oportunidade de realização deste projeto.

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

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) pelo fornecimento de mudas de café.

Aos professores e alunos do Departamento de Fisiologia Vegetal pelo apoio e colaboração.

Aos professores Ladaslav Sodek, Ricardo Antunes de Azevedo, Angelo Luiz Cortelazzo e Carlos Augusto Colombo pelos valiosos comentários e sugestões.

Aos funcionários Denise, Carlos, Paiola e Dulcinéia pela colaboração no projeto.

À funcionária Dulce e a colega Ilka pela colaboração na obtenção de suspensão celular de café.

A colega Rúbia pela colaboração no projeto.

Aos meus pais, Ana Maria e Eduardo, a minha avó Olga e a todos os meus familiares pelo apoio em todas as horas.

Aos meus sogros, Domingos e Maria Perpétua, e aos seus familiares e a Lúcia por ajudarem a cuidar da minha filha Mariana.

Ao meu marido Marcelo pelo companheirismo, amor e carinho e a nossa filha Mariana.

ÍNDICE

BANCA EXAMINADORA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
ÍNDICE	v
ABREVIATURAS	vii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
CAPÍTULO 1. ALANTOÍNA NA NUTRIÇÃO NITROGENADA DE CÉLULAS DE CAFÉ EM SUSPENSÃO	01
1. INTRODUÇÃO	02
1.1. Nutrição nitrogenada de plantas.....	02
1.2. Ureídeos	04
1.3. Glutamina sintetase e a assimilação do NH_4^+	09
1.4. Ureídeos em <i>Coffea</i>	11
1.5. Considerações sobre o uso de suspensão celular	12
2. OBJETIVO	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Estabelecimento da suspensão celular de café	14
3.2. Inoculação, tratamentos e coleta das células	15
3.3. Delineamento experimental	17
3.4. Extrações para determinações analíticas	18
3.5. Determinações analíticas	18
3.5.1. Análises de ureídeos, NO_3^- , NH_4^+ e aminoácidos livres solúveis	18
3.5.2. Análise qualitativa de aminoácidos por HPLC	19
3.5.3. Quantificação de AOX por HPLC	19

3.5.4. Análise de nitrogênio total	19
3.6. Atividade enzimática da GS e perfil eletroforético de extratos protéicos	20
3.7. Atividade enzimática da alantoinase	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
CAPÍTULO 2. ESTRESSES ABIÓTICOS E ENZIMAS ANTIOXIDATIVAS EM	
CÉLULAS DE CAFÉ EM SUSPENSÃO	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. OBJETIVO	57
3. MATERIAL E MÉTODOS	58
3.1. Estabelecimento da suspensão celular de café	58
3.2. Inoculação, tratamentos e coleta das células	59
3.3. Extração enzimática	60
3.4. Determinação das atividades enzimáticas de SOD, CAT, GR e APX	61
3.5. Determinação de proteínas	61
3.6. Análises estatísticas	62
3.7. Obtenção dos ESTs do Genoma Café	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. Atividades de enzimas do sistema antioxidativo em células de café em suspensão	63
4.2. ESTs de enzimas antioxidativas em bibliotecas do projeto Genoma Café ...	74
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
ANEXO 1	91

ABREVIATURAS

ALA	ácido alantóico
ALN	alantoína
AOX	ácido oxônico
APX	Ascorbato peroxidase
Asp	aspartato
Asn	asparagina
CAT	Catalase
DHAR	Deidroascorbato redutase
DTT	ditiotreitól
EBR	24-Epibrassinolídeo
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
GCS	Glutaciona cisteína ligase
Gln	glutamina
GLS	Glutaciona sintase
Glu	glutamato
Gly	glicina
GOGAT	Glutamato sintetase
GPX	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GS	Glutamina sintetase
GST	Glutaciona S-transferase
HCL	ácido clorídrico
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho
NADH	β -nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida

OPA	orto-fitaldialdeído
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
Phytoche	Fitoquelatina sintetase
PVPP	polivinilpolipirrolidona
ROS	espécies reativas de oxigênio
SDS	dodecil sulfato de sódio
Ser	serina
SOD	Superóxido dismutase
TRIS	hidroximetil aminometano

RESUMO

Foi usada células de café em suspensão como modelo para estudar o papel de alantoína na nutrição nitrogenada e o efeito de estresses abióticos sobre enzimas antioxidativas em café. Vários trabalhos têm relatado a importância dos ureídeos como fonte de nitrogênio em algas e leveduras. No entanto, sabendo-se que alantoína é uma fonte de nitrogênio em plantas fixadoras de N_2 , quase não há informações sobre a mesma função em plantas vasculares que não fixam N_2 . Assim, no primeiro capítulo verificou-se o papel de alantoína na nutrição nitrogenada em café, uma vez que esta planta acumula este ureídeo e ácido alantóico como produtos oriundos da degradação de cafeína. Apesar de absorvida pelas células, alantoína pouco contribui para o crescimento celular. Em todas as análises efetuadas ficou evidente a incapacidade das células em adaptarem seu metabolismo a esta fonte de nitrogênio. Assim, parece que por si só, alantoína provocou algum tipo de desbalanço metabólico. Ácido Oxônico (AOX) foi usado para inibição de uricase, a enzima que produz alantoína a partir de ácido úrico, mas mostrou-se tóxico na ausência de alantoína. Porém, em alguns casos com alantoína no meio de cultivo, parece ter ocorrido algum tipo de interação entre inibidor e ureídeo, mudando o metabolismo de maneira bastante diferente ao observado com o inibidor, mas sem alantoína no meio. Isto talvez possa ter ocorrido devido a redução acentuada de AOX no meio de cultivo, porém, como não foi analisado o seu teor nas células não podemos inferir que este inibidor tenha sido degradado de fato. Portanto, concluímos que alantoína tem papel pouco importante na economia de nitrogênio em células de café. A atividade e expressão de genes que codificam enzimas antioxidativas podem sofrer alterações mediante condições ambientais desfavoráveis. Assim, no segundo

capítulo, foram investigadas as alterações na atividade específica de algumas enzimas antioxidativas em células de café em suspensão mediante várias condições de estresse abióticos. Os resultados obtidos foram confrontados com a ocorrência de seqüências semelhantes de ESTs de café (projeto Genoma Café) obtidos através de “Northern eletrônico”. Diferentes respostas foram observadas em relação às atividades de enzimas antioxidativas em células de café em suspensão dependendo do tipo de estresse abiótico imposto. No entanto, pode ser validado o uso de células em suspensão como um modelo para o estudo do efeito de estresses abióticos sobre o sistema de defesa antioxidativo em café.

SUMMARY

Cellular suspension of coffee was used as model to study the role of allantoin in nitrogen nutrition of coffee and the effect of abiotic stress on antioxidant enzymes in coffee. Some studies have reported on the importance of the ureides as nitrogen source in algae and yeast. However, knowing that allantoin is a nitrogen source of N_2 -fixing plants, information is scarce on the same function in plants that do not fix N_2 . Thus, in the first chapter the role of allantoin in the nitrogen nutrition of coffee was verified, in view of the fact that this plant accumulates ureides and allantoic acid as products derived from the catabolism of caffeine. Although absorbed by the cells, allantoin contributes little to cellular growth. In all the analyses carried out the incapacity of the cells to adapt their metabolism to this nitrogen source was evident. Thus, it seems that alone, allantoin provoked some type of metabolic alteration. Oxonic acid (AOX) was used to inhibit uricase, the enzyme that produces allantoin from uric acid, but was found to be toxic in the absence of allantoin. However, in some cases with allantoin in the culture medium, it seems that some type of interaction occurred between inhibitor and the ureide, changing the metabolism in a different way to that observed with inhibitor, but without allantoin in the medium. Perhaps this is related to the fact that AOX was strongly reduced in the culture medium, however, as its levels in the cells was not analyzed, it cannot be inferred that it was in fact degraded of fact. Therefore, we conclude that allantoin is of little importance in the nitrogen economy of coffee cells. The activity and expression of genes that codify antioxidant enzymes can suffer alterations by means of adverse ambient conditions. Thus, in the second chapter, the alterations in the specific activity of some antioxidative enzymes were investigated in cells of coffee in suspension in

relation to several abiotic stress conditions. The results were confronted with the occurrence of identical sequences of ESTs of coffee (Genome project Coffee) taken from “Northern electronic”. Different responses were observed in relation to the activities of antioxidative enzymes in cells of coffee in suspension depending on the type of abiotic stress abiotic applied. However, the use of cells in suspension can be validated as a model for the study of the effect of abiotic stress on the antioxidative system of defense in coffee.

Capítulo 1

**ALANTOÍNA NA NUTRIÇÃO NITROGENADA DE
CÉLULAS DE CAFÉ EM SUSPENSÃO**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nutrição nitrogenada de plantas

Em muitos solos, o nitrogênio (N) é um fator limitante para o desenvolvimento das plantas, sendo considerado, após a deficiência de água, um dos principais fatores que controlam o crescimento e a produtividade das plantas. Na agricultura, nitrato e amônia, são fontes de N inorgânico, predominantemente necessárias para a nutrição das culturas (Von Wirén *et al.*, 2000).

A presença de N orgânico nos solos é uma alternativa à usual forma inorgânica de nutrição das plantas (Näsholm & Persson, 2001). Em particular, quando a concentração de N inorgânico na solução do solo fica muito baixa e, sob estas condições o N orgânico, na forma de aminoácidos, pode constituir-se na maior fonte de N absorvido pelas raízes (Hartung & Rarcliffe, 2002). Este processo é um importante fator para a nutrição nitrogenada de plantas de habitats montanhosos e de regiões árticas (Chapin *et al.*, 1993; Kielland, 1994; Lipson & Monson, 1998; Raab *et al.*, 1999), como também em plantas de regiões quentes (Schimidt & Stewart, 1997) e em pastagens (Falkengren-Grerup *et al.*, 2000).

Muitos solos contém um amplo espectro de compostos orgânicos, incluindo aminoácidos, açúcares aminados, e heterocíclicos nitrogenados (Schulten & Schnitzer, 1998). Em termos orgânicos uma molécula heterocíclica tem o anel de átomos de carbono com um ou mais átomos de oxigênio ou de N. A característica identificadora do anel heterocíclico nitrogenado seria, então, o átomo de N substituindo um de carbono.

Um grupo de heterocíclicos nitrogenados, as nucleobases, é majoritariamente produzido durante a degradação da matéria orgânica ou a partir da excreção de animais, podendo representar uma fonte alternativa de N e de baixo custo à agricultura (Desimone *et al.*, 2002).

Estima-se que heterocíclicos nitrogenados (incluindo purinas e pirimidinas) representam cerca de 35% do N reduzido nos solos (Schulten & Schnitzer, 1998). Deste modo, é fundamental estudar a relevância dos compostos orgânicos, entre eles os heterocíclicos nitrogenados, na nutrição de plantas.

Desimone *et al.* (2002) demonstraram que heterocíclicos nitrogenados, como a alantoína (ALN), podem servir como fonte alternativa de N em plantas que não fixam N₂. Os autores utilizaram sementes de *Arabidopsis thaliana* em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com alantoína (ALN) ou com NH₄NO₃, sendo que na presença de ALN houve germinação das sementes e desenvolvimento de plântulas, mas estas exibiam determinadas características fenotípicas, como pequeno porte e raízes alongadas.

A importância de ureídeos como fonte de N tem sido demonstrada em algas e leveduras. Bastante anterior ao trabalho de Desimone *et al.* (2002) com *Arabidopsis thaliana*, Antia *et al.* (1980) observaram que os ureídeos excretados por animais e zooplânctons são importantes fontes de N em algas. Adenina, guanina, ácido úrico, hipoxantina, xantina, (Pineda & Cardenas, 1996) e alantoína (Piedras *et al.*, 1998), são boas fontes de N para o crescimento de algas, como *Chlamydomonas*. Leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, acumulam e usam alantoína como fonte de N (Chisholm *et al.*, 1987). Desta forma, há um número muito maior de trabalhos sobre a importância dos ureídeos como fonte de nitrogênio em algas e

leveduras e um número mais restrito para plantas vasculares, principalmente aquelas não fixadoras de N_2 .

1.2. Ureídeos

Os três compostos baseados na estrutura da uréia que ocorrem em várias espécies de plantas são os ureídeos: ALN, ALA (Figura 1) e citrulina (CIT) (Lea, 1999). Estes compostos possuem papel essencial na assimilação, metabolismo, transporte e acúmulo de N em plantas fixadoras de N_2 . (Schubert & Boland, 1990).

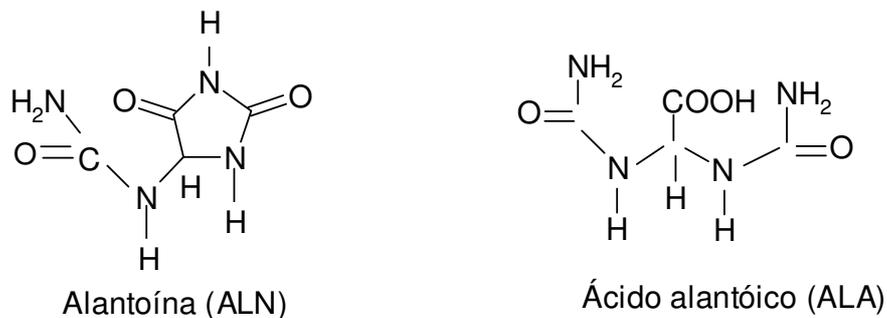


Figura 1. Estrutura dos ureídeos mais encontrados em plantas (Adaptado de Schubert & Boland, 1990).

Em plantas superiores N é transportado a partir de raízes para a parte aérea, principalmente como NO_3^- , aminoácidos, amidas e ureídeos (Pate, 1973). Alantoína (ALN) e ácido alantóico (ALA) são utilizados para o transporte de N em uma ampla variedade de vegetais, principalmente entre as leguminosas que fixam N_2 .

Alantoína e ácido alantóico representam cerca de 50 a 90% do N orgânico presente no xilema de plantas leguminosas da tribo Phaseoleae, como feijão, soja e feijão-de-corda (Lea, 1999). Em quantidades menores são encontradas as amidas asparagina (Asn) e glutamina (Gln). No entanto, no xilema de muitas leguminosas de clima temperado, bem como em todas as leguminosas não simbióticas e em plantas

não leguminosas, as amidas asparagina (Asn) e glutamina (Gln) são os principais constituintes nitrogenados, sendo que baixos níveis de ureídeos estão presentes nessas espécies (Pate & Atkins, 1983).

O uso de ureídeos, ao invés de amidas, no transporte de N a partir de raízes para a parte aérea, via xilema, resulta em maior economia de carbono, uma vez que a relação C:N é 1:1, diminuindo o gasto com a assimilação de carbono pela planta (Sprent, 1980; Schubert & Boland, 1990). Esta proposta é consistente com o aumento da produção e transporte de alantoína e ácido alantoíco sob condições em que o substrato carbono (energia) encontra-se limitante (Polayes & Schubert, 1984). Além disso, muitas leguminosas, como feijão, soja e feijão-de-corda, que requerem alta quantidade de N para a produção de sementes, usam ureídeos como sua principal forma de transporte, o que sugere uma conservação de carbono nestas plantas (Thomas & Schrader, 1981).

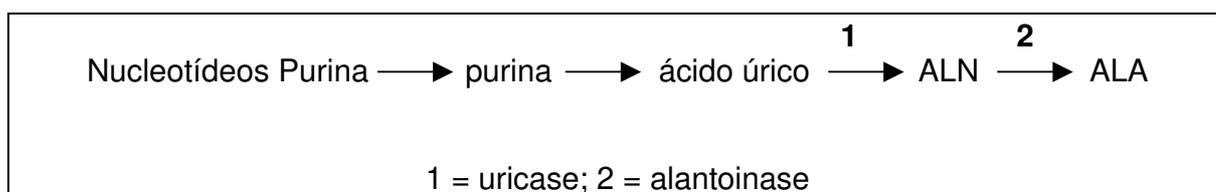
A menor solubilidade dos ureídeos quando comparados a aminoácidos, implica na necessidade de um requerimento de água 2,6 vezes maior para o transporte de N que a necessária para transportar quantidades equivalentes de N na forma de Asn (Sprent, 1980). Deste modo, o uso de ureídeos como transportadores de N pode ser restrito às espécies situadas em regiões tropicais e/ou em determinados nichos ecológicos, podendo ser uma desvantagem em espécies de clima temperado ou em regiões áridas, especialmente sob condições de estresse, como baixos teores de água e de temperatura (Schubert & Boland, 1990).

Esta característica de ter mais átomos de N na molécula parece estar relacionada à destoxificação de NH_4^+ em tecidos radiculares. Plantas nutridas com sais de amônio, quando comparadas com aquelas crescidas com nitrato, têm maior quantidade de ureídeos na seiva do xilema e em todos os órgãos da planta, exceto

nas raízes. Isto sugere que os ureídeos podem ser produzidos nas raízes em resposta à toxicidade da NH_4^+ , e exportados para outras partes da planta (Thomas *et al.*, 1980).

Muito do conhecimento atual sobre a biossíntese de ureídeos em plantas foi traçado por analogia a partir de estudos com animais e microorganismos (Schubert & Boland, 1990).

A via convencional para a formação de ALN e ALA em animais e microorganismos envolve o catabolismo oxidativo dos nucleotídeos da purina, como indicado no esquema abaixo (Schubert & Boland, 1990).



Esta hipótese de semelhança da via em animais e em plantas foi aplicada pelo fato que as enzimas do catabolismo da purina, uricase (urate:O₂ oxidoreductase, EC 1.7.3.3) e alantoinase (EC 3.5.2.5), estão presentes em várias espécies de plantas superiores.

Alantoína e ácido alantóico são derivados de inosina monofosfato (IMP), a qual é formada a partir da ribose-5-fosfato (R-5-P), requerendo a entrada de N a partir de Gln, Asp e glicina (Gly) conforme mostrado na figura 2 (Lea, 1999).

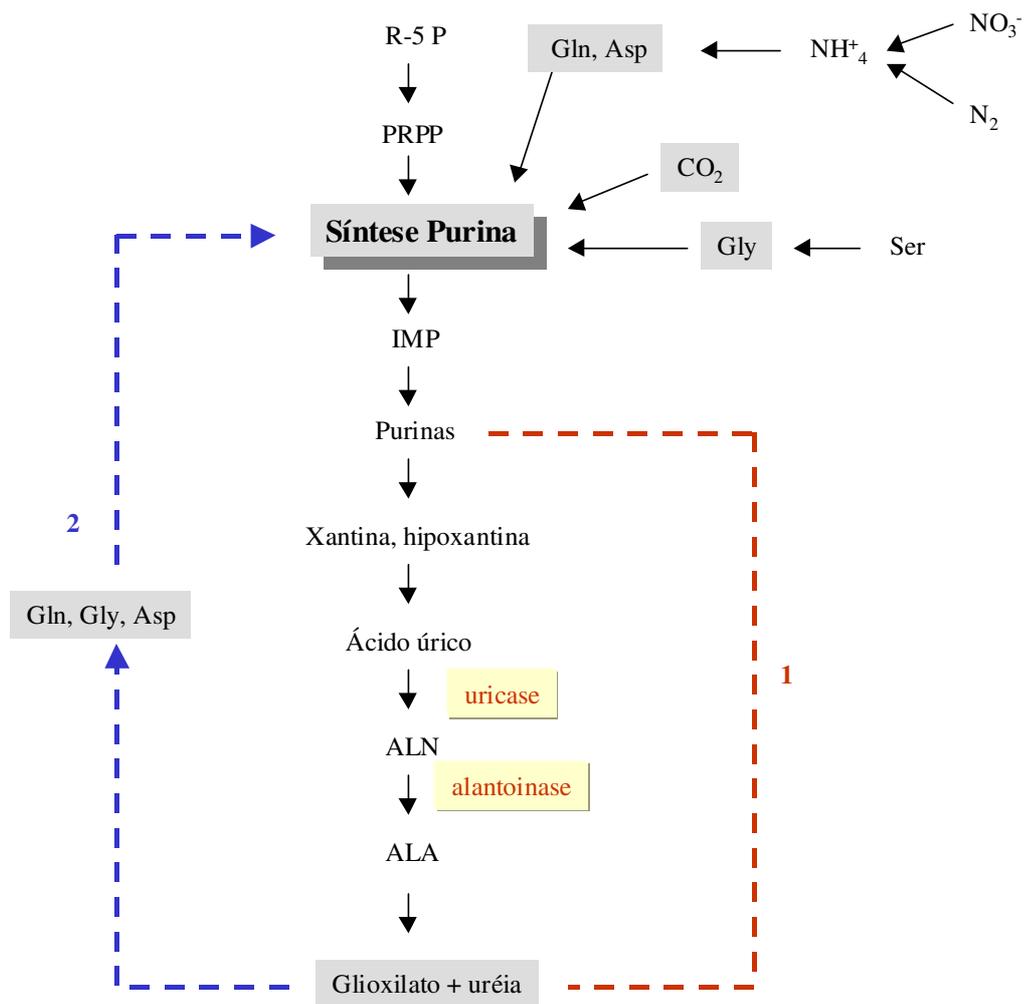


Figura 2. Possível via biossintética de ureídeos em plantas superiores. 1) Degradação da purina; 2) Reciclagem do glioxilato. R-5-P = ribose-5-fosfato; PRPP = fosforibosilpirofosfato; IMP = Inosina monofosfato; ALN (alantoína); ALA (ácido alantóico) (adaptado de Thomas & Schrader, 1981).

A xantina produzida pode ser metabolizada pela enzima xantina desidrogenase (EC 1.2.1.37), resultando em ácido úrico. Posteriormente, ácido úrico será convertido para alantoína pela enzima uricase. Sob ação da enzima allantoinase, alantoína poderá então ser convertida a ácido alantóico (Schubert & Boland, 1990). Além de ser um produto formado durante a degradação de nucleotídeos da purina, xantina também é um produto da degradação de cafeína em

café (Suzuki *et al.*, 1992; Ashihara & Crozier, 1999). Em ambos os casos, ácido úrico, alantoina e ácido alantóico são produzidos (Mazzafera, 2004).

A maior parte da produção de ureídeos é associada com a assimilação do NH_4^+ . Deste modo, o suplemento de Gln e Asp não é problema em nódulos de leguminosas, por que o primeiro passo para a assimilação de NH_4^+ envolve a formação de Gln e Glu, por ação das enzimas glutamina sintetase (GS; EC 6.3.1.2) e glutamato sintetase (GOGAT; EC 1.4.1.13). Além disso, nódulos contêm alto nível de aspartato aminotransferase, produzindo Asp, a partir de Glu, e oxaloacetato (Ryan *et al.*, 1972). Contudo, Gly não é uma consequência da imediata assimilação de NH_4^+ , porém, é produzida a partir de Ser por ação das enzimas serina hidroximetil transferase e metilenotetrahidrofolato dehidrogenase, durante a fotorrespiração (Schubert & Boland, 1990).

Schlee & Reinbothe (1963) sugeriram a reciclagem do glioxilato via degradação de purina, verificando que em folhas de *Pelargonium*, o glioxilato foi reintroduzido na síntese de purina via Gly e, possivelmente, via Ser.

A degradação de ácido alantóico em plantas pode ocorrer por duas vias distintas. A principal delas é mediada pela enzima alantoato amidoidrolase (EC 3.5.3.9), que converte ácido alantóico a ureideoglicina, CO_2 e NH_4^+ . Ureidoglicina pode ser desaminada pela enzima ureidoglicina aminohidrolase ou espontaneamente (já que é um composto instável), resultando em ureidoglicolato e NH_4^+ . Na segunda via, ácido alantóico é convertida a ureidoglicolato e uréia pela enzima alantoicase (alantoato amidinohidrolase, EC 3.5.3.4). O ureidoglicolato, resultante das duas vias formará glioxilato e uréia. O glioxilato pode ser transaminado para Gly. A uréia formada será metabolizada a $2\text{NH}_4 + \text{CO}_2$ pela enzima urease (Schubert & Boland, 1990). Urease não é essencial para a degradação de ureídeos via alantoato

amidoidrolase, uma vez que nesta rota ocorre a liberação direta de NH_4^+ . Stebbins & Polacco (1995), estudando plantas de soja urease-negativas, apóiam esta via.

1.3. Glutamina sintetase e a assimilação do NH_4^+

O NH_4^+ , produto da redução do nitrato ou da absorção direta do solo, ou ainda, derivado da fixação simbiótica de N_2 , não pode ser acumulado nos tecidos. Como mencionado, o NH_4^+ é tóxico para as células vegetais, promovendo a dissociação entre a formação de ATP e o transporte de elétrons na respiração e na fotossíntese.

Logo após ser formado ou absorvido pelas raízes, o NH_4^+ é assimilado pelas enzimas GS e GOGAT, através de duas reações seqüenciais e inter-dependentes, formando os aminoácidos Gln e Glu, respectivamente (Hirel & Lea, 2001).

Além de representarem a principal via de entrada de N orgânico proveniente do ambiente, as enzimas GS/GOGAT também participam da reciclagem do NH_4^+ gerado em diversos processos metabólicos, tais como a fotorrespiração, o “turnover” de proteínas, o metabolismo de compostos nitrogenados translocados (aminoácidos e ureídeos), reações de biossíntese envolvendo aminoácidos e a biossíntese de lignina (Lea, 1999).

As moléculas de N incorporadas à Gln e ao Glu no ciclo GS/GOGAT são inicialmente distribuídas através do metabolismo por reações de transaminação, formando novos aminoácidos necessários à síntese de proteínas. Como visto anteriormente, uma vez sintetizada parte da Gln poderá também participar da síntese de outros compostos nitrogenados, como os ureídeos (Lea & Ireland, 1999).

Em plantas superiores, a GS é uma enzima chave na assimilação de N inorgânico em forma orgânica (O'Neal & Joy, 1973). Esta enzima possui alta afinidade para NH_4^+ e está presente em todos os tecidos da planta.

Dois grupos de isoenzimas da GS foram bem identificadas em plantas superiores, a GS plastídica e GS citosólica (McNally *et al.*, 1983). Na maioria das plantas superiores, GS plastídica é predominante em muitos tecidos clorofilados e está localizada no estroma do cloroplasto (Botella *et al.*, 1988; Brangeon *et al.*, 1989), embora em algumas espécies de leguminosas, esta isoenzima também esteja associada aos plastídios nas raízes (Vézina & Langlois, 1989) ou a nódulos radiculares (Brangeon *et al.*, 1989). GS citosólica está localizada predominantemente nas raízes, nódulos radiculares (Brangeon *et al.*, 1989; Peat & Tobin, 1996) e em órgãos florais (Dubois *et al.*, 1996).

Em plantas superiores, as atividades das isoenzimas da GS podem sofrer importantes variações no decorrer do ciclo da planta, dependendo do estágio de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo dos órgãos vegetais. Além disso, vários estímulos ambientais, como qualidade e quantidade de luz, ou a nutrição nitrogenada, contribuem para a regulação da expressão destas isoenzimas (Hirel & Lea, 2001).

Evidências indicam que a GS está sempre presente nas plantas, com a finalidade de metabolizar qualquer NH_4^+ que possa ser produzido. Deste modo ela evitaria que esse íon acumulasse em níveis tóxicos.

A função da GS plastídica parece ser a de assimilar o NH_4^+ liberado na redução do NO_3^- ou durante o processo de fotorrespiração (Lea & Ireland, 1999). Como GS citosólica é predominante em raízes, é proposto que ela possui um papel central na assimilação de NH_4^+ a partir da redução do NO_3^- (Oaks & Hirel, 1985). A

GS citosólica também pode estar envolvida em resposta a estresses bióticos e abióticos, uma vez que em várias espécies foi observado que esta isoenzima é induzida em folhas senescentes (Pérez-Rodríguez & Valpuesta, 1996), por estresse hídrico (Bauer *et al.*, 1997) ou após infecção por patógeno (Pérez-García *et al.*, 1998).

1.4. Ureídeos em *Coffea*

Consideráveis quantidades de ureídeos alantóina e ácido alantóico, foram encontradas em frutos de *C. arabica* e *C. dewevrei*, cerca de 0,9 µg/mg, enquanto em folhas de ambas as espécies o teor foi de 0,3 µg/mg (Vitória & Mazzafera, 1999). No entanto, em geral, estas quantidades de ureídeos estão um pouco acima dos teores encontrados em sementes de soja, ao redor de 0,3 µg/mg (Mosquim & Sodek, 1992), porém menores daqueles determinados em confrei (*Symphytum officinalis*, 7-25,5 µg/mg em raízes e 1 µg/mg em folhas) (Souza *et al.*, 1991), principalmente se consideramos a ausência de nodulação nesta planta. A presença de níveis endógenos de ureídeos em frutos e folhas de *C. arabica* e *C. dewevrei* pode ser uma conseqüência da reduzida atividade das enzimas alantoinase e alantoato amidohidrolase em tecidos de café (Vitória & Mazzafera, 1999).

Não se sabe qual o papel fisiológico da acumulação de ureídeos em *C. arabica*, porém Mazzafera & Gonçalves (1999) sugeriram que estes compostos podem ser importantes no transporte de N em plantas desta espécie. Análise da seiva do xilema em *C. arabica* revelou que NO₃⁻ foi a principal forma de N transportada, representando mais de 50% do N total identificado, seguido de Asn

(30,5%) e Gln (6,9%). Enquanto que os teores de ácido alantóico e alantoína representaram 1,4% e 4,2%, respectivamente, ou seja, 5,6% do total de N determinado (Mazzafera & Gonçalves, 1999).

Em café, alantoína e ácido alantóico são produtos da degradação de cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (Kalberer, 1965). Deste modo, considerando a estreita relação entre o metabolismo de cafeína e a formação de ureídeos em café e da considerável quantidade de ureídeos em frutos e folhas dessas plantas, é possível que a presença destes ureídeos na seiva do xilema possa ter origem a partir da degradação de cafeína nas raízes (Mazzafera & Gonçalves, 1999).

1.5. Considerações sobre o uso de suspensão celular

Na suspensão celular pode-se obter e proliferar células em meio líquido, sob condição de agitação contínua, propiciando contato integral com o meio e assim, evitando possíveis gradientes nutricionais e gasosos no meio de cultura (Cid, 1998).

Independentemente da espécie a ser utilizada, é essencial que as células da suspensão se dividam e cresçam ativamente. Deste modo, a suspensão celular de café pode servir como modelo para diversos estudos, pois possui alta taxa de multiplicação celular (Neuenschwander & Baumann, 1992).

A suspensão celular possui ampla aplicabilidade nas áreas de bioquímica, fisiologia vegetal e genética de plantas, possuindo várias vantagens em relação ao uso de planta inteira, destacando-se dentre elas: condições estéreis; fácil manipulação; possibilidade de obtenção de material uniforme, livre de clorofila e lignificação; permite controlar os componentes do meio de cultura de maneira uniforme e não sofrer alterações do ambiente externo.

2. OBJETIVO

Estudar o papel da alantoína na nutrição nitrogenada em café, usando-se células em suspensão como modelo experimental.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estabelecimento da suspensão celular de café

Plantas matrizes de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho provenientes de vasos localizados em casa de vegetação, foram previamente tratadas com solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1938), visando a melhoria da qualidade nutricional dos explantes foliares. Folhas do 3° e 4° pares foram coletadas e lavadas em água corrente e desinfectadas com solução de NaOCl (0,4% cloro ativo) em água (1:3, v/v), durante 30 min. Em condições assépticas, o material vegetal foi lavado por três vezes em água destilada autoclavada e cortado tipo pente (Figura 3), visando aumentar a área de contato do explante com o meio de cultura e, conseqüentemente, obter maior quantidade de calos.



Figura 3. Cortes tipo pente, feitos com lâmina, em explante foliar de café.

Foi utilizado meio CIM (Neuenschwander & Baumann, 1992) constituído de sais minerais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), 10 mg/l tiamina-HCl, 100 mg/l inositol, 30 g/l sacarose, 4 mg/l cinetina e 1 mg/l 2,4-D. Acertou-se o pH 5,8 do meio com KOH, adicionou-se 8 g/l ágar e o meio foi autoclavado a 121°C, a 1,3 atm, por 20 minutos.

Após o preparo dos explantes, estes foram colocados com a face abaxial voltada para baixo, em frascos de vidro contendo 30 ml de meio CIM, previamente preparado.

Foram selecionados os calos que apresentaram coloração esbranquiçada, com aspecto friável, sendo transferidos para meio líquido CIM após atingirem um crescimento adequado, o que demorou cerca de oito a nove semanas. Para a homogeneização da suspensão celular, a qual demorou cerca de dois meses, os agregados que se formavam eram descartados, sendo selecionados apenas agregados pequenos de células e com coloração esbranquiçada. A suspensão foi multiplicada através de subcultivos semanais. O material ficou sob agitação constante de 100 rpm, no escuro e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Antes de efetuar os tratamentos, as suspensões celulares foram adaptadas, por 3 semanas, em meio de cultura CIM sem nenhuma fonte de N.

Para verificar a integridade celular da cultura em suspensão, observou-se a morfologia das células em de microscópio óptico invertido.

3.2. Inoculação, tratamentos e coleta das células

Inoculação: Cerca de 2 g de massa fresca de células, previamente filtradas e lavadas em água destilada autoclavada, foram inoculados em erlenmeyer contendo 30 ml de meio líquido CIM, diferenciando o tipo de tratamento empregado. O material foi incubado no escuro, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob agitação constante de 100 rpm.

Tratamentos: Foi utilizado o meio líquido CIM, diferenciando a fonte de N utilizada, acrescentando-se, ou não, um agente inibidor da formação de alantoína (ALN).

Como fonte de N, utilizou-se os sais do meio MS (NMS) (ver Anexo 1) com, ou sem, alantoína (ALN), em 3 combinações diferentes, de modo que em todos os tratamentos a quantidade total de N fosse equivalente ao encontrado nesse meio

MS. Deste modo, as combinações foram: (0% ALN + 100% NMS); (25% ALN + 75% NMS); (100% ALN + 0% NMS). O inibidor utilizado foi o ácido oxônico - AOX (Figura 4), que inibe a enzima uricase que converte de ácido úrico a alantoína (ALN).

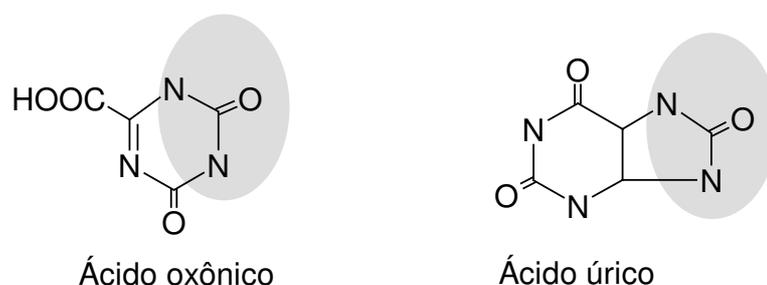


Figura 4. Parte sombreada mostra a estrutura análoga do ácido oxônico (AOX) com o ácido úrico.

Deve-se lembrar que em plantas ocorre produção endógena de alantoína (ALN), e o uso de inibidor torna-se necessário para verificar se o crescimento celular está relacionado ao uso de ALN no meio de cultura, ou se ocorre devido ao aproveitamento endógeno da ALN produzida pelas células.

Ao todo foram realizados 9 tratamentos, incluindo o controle (tratamento 0% ALN + 0 mM AOX), conforme mostra a tabela 1.

Coleta das células: Após 20 dias da inoculação, período final da fase exponencial do crescimento celular, foi determinada a massa fresca final das células. Para tanto, removeu-se o excesso de meio através da filtração a vácuo, seguindo-se a pesagem das células em filtro úmido. Um padrão foi feito com filtro umedecido com água. As células e o meio líquido foram guardados a -20°C para realização posterior das análises bioquímicas.

Tabela 1. Identificação dos tratamentos realizados em células de café em suspensão, mostrando as combinações entre % de ALN (Alantoína) e % de NMS (N presente no sais do meio MS), e a concentração de ácido oxônico (AOX) utilizada. A quantidade total de N foi equivalente ao encontrado no meio MS.

Identificação dos tratamentos	ALN (%)	NMS (%)	AOX (mM)
0% ALN + 0 mM AOX	0	100	0
25% ALN + 0 mM AOX	25	75	0
100 % ALN + 0 mM AOX	100	0	0
0% ALN + 1mM AOX	0	100	1
25% ALN + 1mM AOX	25	75	1
100% ALN + 1mM AOX	100	0	1
0% ALN + 5mM AOX	0	100	5
25% ALN + 5mM AOX	25	75	5
100% ALN + 5mM AOX	100	0	5

3.3. Delineamento experimental

O experimento foi feito num delineamento em blocos casualizados num fatorial de 3 x 3, sendo três combinações de fonte de N e três concentrações de AOX. Cada repetição foi constituída de um erlenmeyer, sendo realizadas sete repetições por tratamento. Aos dados quantitativos obtidos foi aplicada análise de variância e, nos casos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2000).

Nos gráficos obtidos pela análise estatística, os quais encontram-se descritos em Resultados e Discussão, comparou-se os tratamentos dentro de ALN e AOX de modo independente (gráficos A e B, respectivamente) e a interação ALN x AOX (gráfico C).

3.4. Extrações para determinações analíticas

Cerca de 1 g de massa fresca de células foi liofilizado e extraído em 10 ml de solução metanol:clorofórmio:água (12:5:3, v/v/v), ficando em repouso a 4°C por 24 horas (Bielek & Turner, 1966). A seguir, foram realizados dois procedimentos distintos, de acordo com o tipo de análise pretendida. 1) para análise em HPLC: uma fração do extrato foi seca em Speed Vac (Savant) e solubilizada em H₂O; 2) para análise de ureídeos, NO₃⁻, NH₄⁺ e aminoácidos solúveis totais: para cada 4 ml do extrato, acrescentou-se 1,0 ml de clorofórmio e 1,5 ml de H₂O. Aguardou-se a separação de fases por 24 horas (fase superior: metanol e H₂O; fase inferior: clorofórmica) e a fração metanólica, contendo os compostos nitrogenados, foi coletada e seca em Speed Vac, sendo posteriormente solubilizada em H₂O.

3.5. Determinações analíticas

3.5.1. Análises de ureídeos, NO₃⁻, NH₄⁺ e aminoácidos livres solúveis

Os ureídeos alantoína e ácido alantóico, presentes no meio de cultura e nos extratos de células, foram determinados segundo o método de Vogels & van der Drift (1970), tomando-se como base uma curva padrão de solução de alantoína (ALN). As dosagens de NO₃⁻ presente no meio de cultura e nos extratos de células foram feitas segundo Cataldo *et al.* (1975), tomando-se como base uma curva padrão de solução de KNO₃. As dosagens de NH₄⁺ presente no meio de cultura e nos extratos de células foram feitas segundo McCullough (1967), tomando-se como base uma curva padrão de solução de (NH₄)₂SO₄. As dosagens de aminoácidos solúveis livres totais presentes no meio de cultura e nos extratos de células foram feitas segundo Yemm & Cocking (1955), utilizando-se como base uma curva padrão de solução de Leu.

3.5.2. Análise qualitativa de aminoácidos por HPLC

A separação e quantificação de aminoácidos presentes nos extratos de células foram feitas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) em coluna de fase reversa C18 após derivação com OPA, baseado no método descrito por Jarret *et al.* (1986). A separação foi efetuada por meio de um gradiente gerado com o solvente A (tampão fosfato pH 7,25: 50 mM acetato de sódio, 50 mM fosfato de sódio, 1,5 ml de HCl 12 N, 20 ml tetrahidrofurano, 20 ml metanol em 1 litro de volume final) e solvente B (metanol 65 %) com fluxo de 0,8 ml/min. Os compostos eluindo da coluna foram monitorados por um detector de fluorescência operando em comprimento de onda de excitação de 250 nm e comprimento de onda de emissão de 480 nm. As concentrações nos extratos foram obtidas por comparação com padrão de aminoácidos com concentrações conhecidas.

3.5.3. Quantificação de AOX por HPLC

AOX foi quantificado no meio de cultura por HPLC em coluna de fase reversa C18, utilizando-se água como fase móvel acetato de sódio 0,5%, no fluxo de 0,8 ml/min. A detecção foi feita por detector de UV a 210 nm. As concentrações foram determinadas por comparação com padrão de concentração conhecida de AOX.

3.5.4. Análise de nitrogênio total

O N total foi determinado em amostras de 100 mg segundo o método de Kjeldahl, como descrito por Nelson & Sommers (1973). A quantidade de N na amostra foi obtida pelo volume gasto de HCl durante a titulação.

3.6. Atividade enzimática da GS e perfil eletroforético de extratos protéicos

Cerca de 1 g de massa fresca de células foi macerado em 2,5 mL de tampão 0,1 M TRIS-HCl pH 7,5, contendo 10 mM MgSO₄.7H₂O, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0,8 mM PMSF e PVPP (aproximadamente 10% do peso da amostra), a 4°C. A suspensão foi centrifugada a 15.000 g por 15 min a 4°C e o precipitado descartado. A atividade da GS foi medida na presença de NH₂OH, como descrito por O'Neil & Joy (1973). Uma fração do extrato enzimático foi utilizada para dosagem de proteínas, usando-se como padrão albumina de soro bovino (Bradford,1976). Parte do sobrenadante foi liofilizada, solubilizada em H₂O e dessalinizada em mini-colunas Sephadex G25 - PD-10 (Pharmacia). As proteínas foram eluídas das colunas com H₂O, liofilizadas e solubilizadas em tampão de desnaturação (20% SDS, 10% glicerol, 1 M TRIS, pH 6,8, alguns cristais de azul de bromofenol, 10 mM DTT) e mantidas em banho-maria fervente por 5 min. Foi aplicado no gel 5 µg de proteína para cada tratamento. Os perfis protéicos foram obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE), utilizando uma concentração de poliacrilamida de 12% no gel de resolução e condições de corrida de 15 mA/gel (Laemmli, 1970). As proteínas do gel foram coradas com Coomassie Blue R250.

3.7. Atividade enzimática da alantoinase

Cerca de 1 g de massa fresca de células foi macerado em 5,0 ml de tampão TRIS-HCl 50 mM pH 7,0, contendo 10 mM EDTA e PVPP (aproximadamente 10% do peso da amostra) a 4°C. A suspensão foi centrifugada a 15.000 g por 15 min a 4°C e o precipitado descartado. Parte do sobrenadante foi desalinizada em mini-colunas Sephadex G25 - PD-10 (Pharmacia). As proteínas foram eluídas das colunas com

tampão TRIS-HCl 50 mM pH 7,5. O ensaio para a enzima alantoinase foi realizado segundo Romanov *et al.* (1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do crescimento em massa fresca das células mostrou que nutrição exclusiva com ALN praticamente dobrou a quantidade de células em relação à quantidade inicial inoculada (2 g), porém ficou muito aquém do observado no tratamento com 0% ALN, que aumentou quase seis vezes (Figura 5 A, C). Aparentemente, ALN ou interferiu ou foi insuficiente para manter o crescimento celular de células de café (Figura 5 C). A presença ou ausência de AOX não afetou significativamente o crescimento celular (Figura 5 B).

Visto só nos tratamentos 25 e 100% ALN, a presença de AOX no meio parece não interferir no crescimento de células, mas o contrário ocorre para 5 mM AOX em 0% ALN (Figura 5 C).

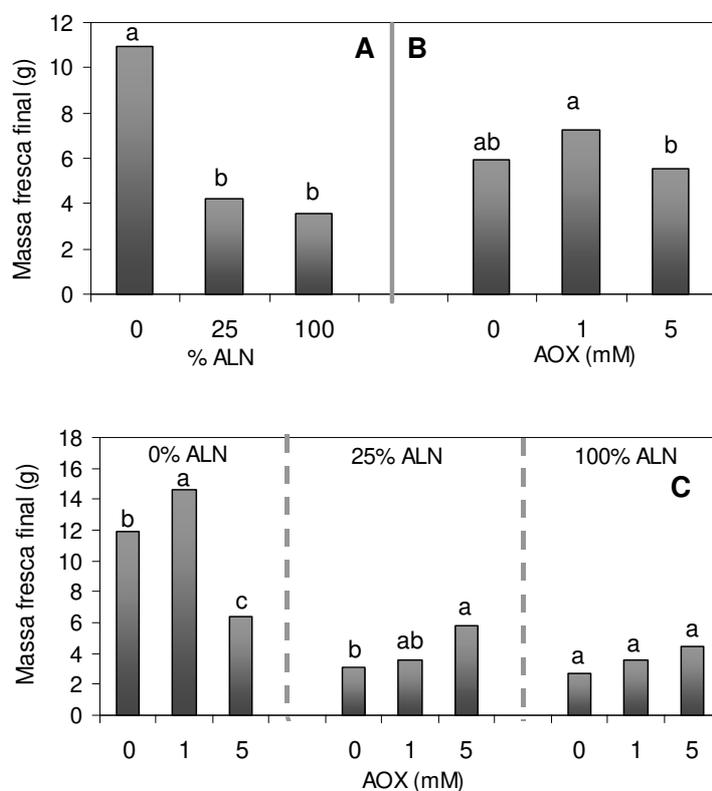


Figura 5. Massa fresca final (g) das células de café em suspensão nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$). Massa fresca inicial = 2 g.

Analisado o tratamento com 0% ALN, observa-se que houve menor crescimento celular na presença de 5 mM de AOX (Figura 5 C), o que sugere que a adição deste inibidor isoladamente, ou seja, sem o uso de ALN, pode ter ocasionado danos às células. Esperava-se também um maior crescimento celular no tratamento com 25% de ALN (Figura 5 C). Portanto, tanto a presença de ALN como a de AOX afetou o crescimento de células de café em suspensão.

Como era de se esperar, o maior teor de ureídeos nas células de café foi observado no tratamento com 100% ALN, seguido de 25% ALN (Figura 6 A). A presença de AOX no meio de cultura acarretou numa tendência de diminuição do teor de ureídeos nas células, porém não se observou uma diferença significativa (Figura 6 B).

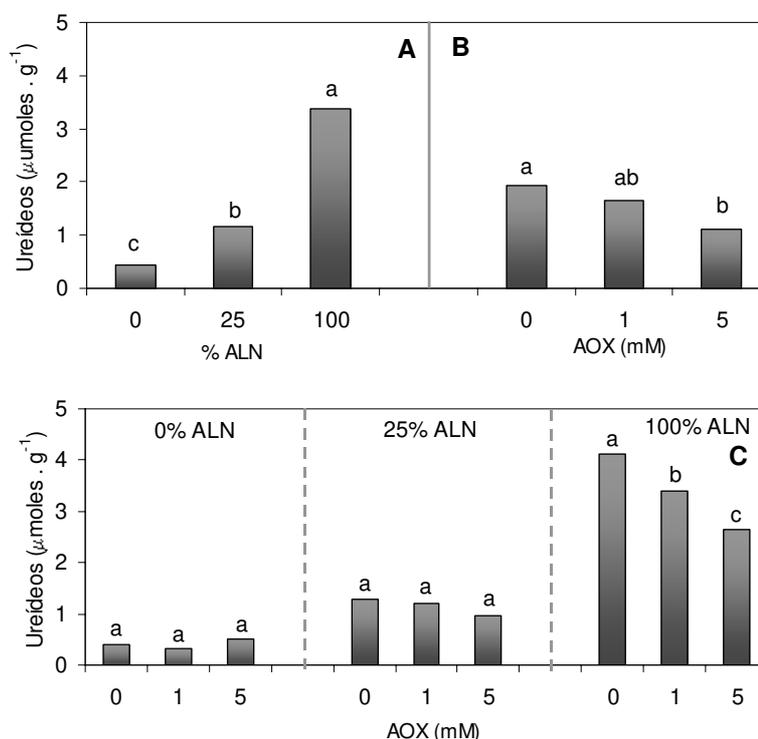


Figura 6. Teor de ureídeos ($\mu\text{moles.g}^{-1}$) nas células de café em suspensão nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

Verificou-se no tratamento com 100% ALN que com maior concentração de AOX no meio de cultura, ocorreu diminuição do teor de ureídeos nas células (Figura 6 C) pelo fato destas células consumirem os ureídeos para o seu próprio crescimento celular.

Em resumo, podemos considerar que ocorreu inibição da biossíntese endógena de ureídeos (Figura 7) nas concentrações maiores de AOX, e o crescimento celular, embora pequeno, foi devido ao uso de ALN presente no meio de cultura.

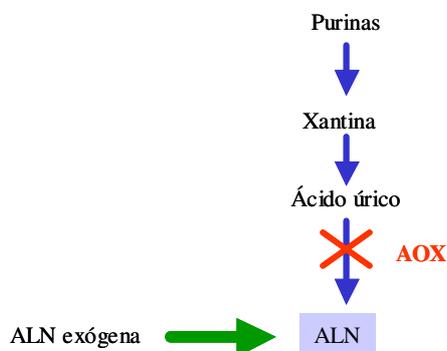


Figura 7. Biossíntese de ureídeos endógeno (seta azul); inibição do AOX na formação de ALN endógena (cruz vermelha). A ALN adicionada no meio de cultura é indicada pela seta verde.

Análises bioquímicas de ureídeos no meio de cultura no tratamento contendo somente ALN, mostraram que houve grande consumo (~65%) da ALN presente no meio (Figura 8 A), a qual deve ter sido requerida para o crescimento celular das células em suspensão de café. Isto mostra que embora a ALN possa ser prejudicial para o crescimento das células (Figura 5 C), estas usaram a ALN adicionada no meio como única fonte de N para o seu crescimento celular. No entanto, no tratamento com 25% ALN, o percentual de ALN consumida foi menor, cerca de 44%, provavelmente pelo fato de que neste tratamento também havia no meio de cultura 75% de NMS (N presente no sais do MS) (Figura 8 A). A presença de AOX não

interferiu significativamente no percentual de ALN consumida no meio de cultura (Figura 8 B). No entanto, se analisado o tratamento com 25% ALN isoladamente, verifica-se que a maior concentração de AOX acarretou maior consumo de ALN presente no meio.

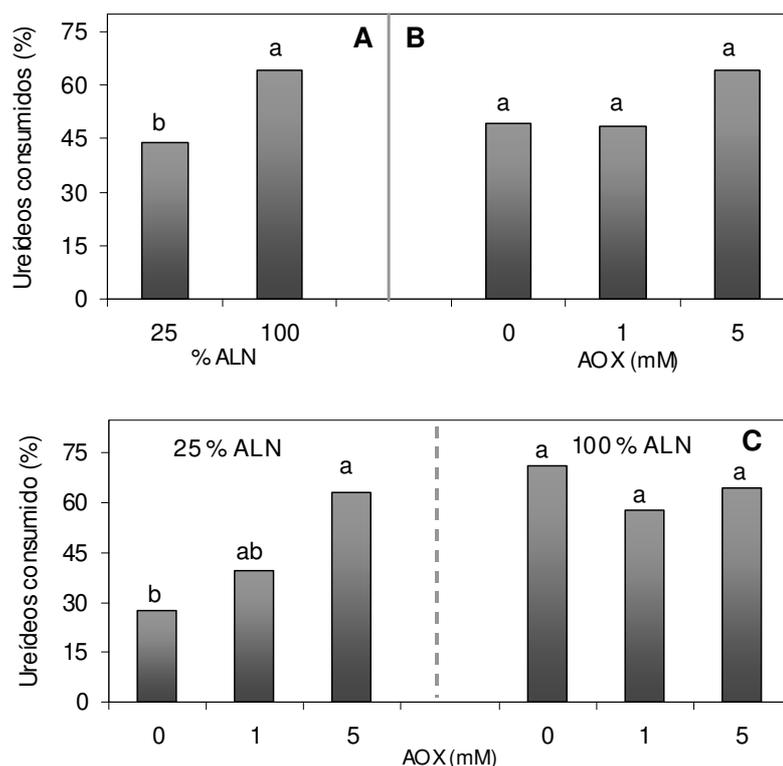


Figura 8. Percentual de ureídeos consumidos no meio de cultura na suspensão de café nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

O teor de AOX no meio de cultura reduziu durante o experimento. Não existe na literatura nenhum trabalho mostrando que este inibidor de uricase é catabolizado por células vegetais. Porém, como não foram feitas determinações do seu conteúdo nas células, não podemos afirmar que isto tenha ocorrido de fato, ou mesmo que AOX foi absorvido e imobilizado intracelularmente. Assim, a variação será tratada apenas como redução de AOX.

Observou-se que ALN não interfere na redução de AOX no meio de cultura (Figura 9 A). Análise bioquímica de AOX no meio de cultura, mostrou que na concentração de 1 mM houve redução de aproximadamente 13% do AOX, enquanto que, curiosamente, na concentração de 5 mM verificou-se grande redução em todos os tratamentos (Figura 9 B, C).

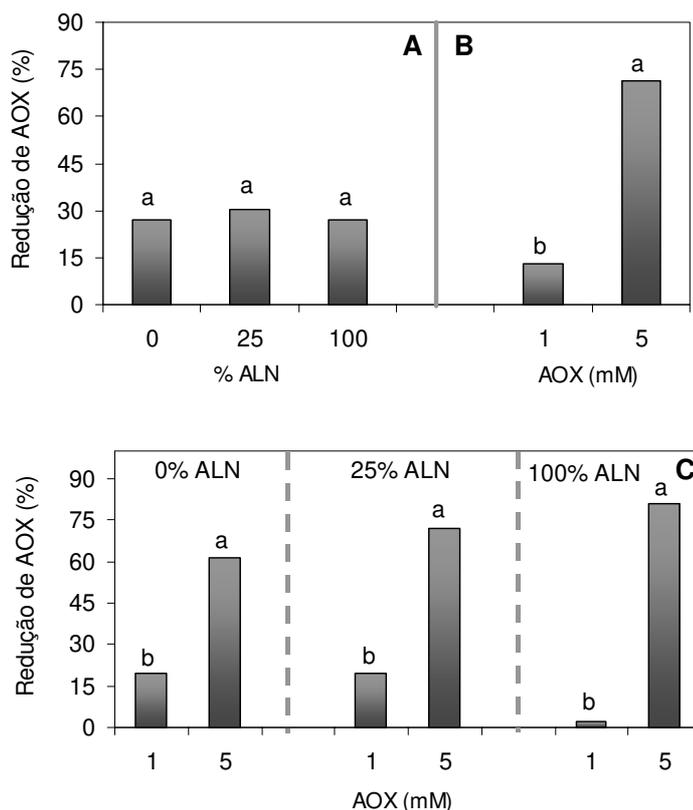


Figura 9. Percentual de redução de AOX no meio de cultura na suspensão de café nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

ALN também interferiu no teor de NH_4^+ presente no meio de cultura (Figura 10). O meio MS tem em sua constituição KNO_3 e NH_4NO_3 , sendo que a concentração de NH_4^+ é de 371 $\mu\text{g/ml}$. Assim, o meio 0% ALN tem este teor de NH_4^+ e o meio 25% ALN tem 278,3 $\mu\text{g/ml}$. Assim, exceto o meio 0% ALN / 5 mM AOX, em todos os outros pouco NH_4^+ foi detectado (Figura 10 C).

É interessante notar que no tratamento com 25% ALN, que também possui 75% de N do meio MS, os valores encontrados do teor de NH_4^+ no meio de cultura não diferiram significativamente com os dados verificados com 100% ALN, que não tinha N inorgânico (Figura 10 A). Esperava-se que o teor de NH_4^+ encontrado no tratamento com 25% ALN deveria estar mais próximo ao teor verificado com 0% ALN. O desaparecimento de NH_4^+ do meio poderia estar associado a uma maior atividade específica de GS (Figura 12), uma vez que esta enzima tem a finalidade de metabolizar qualquer NH_4^+ que possa ser produzido, evitando que se acumule em níveis tóxicos (Ortega, 1996).

Verificou-se que 5 mM de AOX aumentou o teor de NH_4^+ tanto no meio de cultura, como nas células no tratamento com 0% ALN (Figuras 10 C e 11 C), mas não foi acompanhado por aumento de GS (Figura 12 C). Por outro lado, nos tratamentos 25 e 100% ALN, o teor de NH_4^+ é baixo nos meios e nas células (Figuras 10 e 11), mas o aumento de GS ocorreu só na presença de 5 mM AOX (Figura 12 C). Este aumento é particularmente interessante, pois poderia estar indicando que com a inibição de uricase, ALN estaria sendo degradada e gerando NH_4^+ para a atividade de GS. O alto valor de NH_4^+ no tratamento 0% ALN / 5 mM AOX poderia ser, ao contrário de pouca incorporação, aumento da produção celular, havendo sua liberação no meio de cultura. A pouca atividade de GS poderia estar relacionada a um estresse imposto, já que células desse tratamento cresceram pouco (Figura 5 C).

Assim, poderia ser especulado um efeito inibitório do 5 mM AOX sobre GS no meio sem ALN. Por outro lado, a combinação 25% ALN / 5 mM AOX e em menor escala 100% ALN, apresentaram maior atividade de GS e baixo teor de NH_4^+ , indicando a possibilidade de um efeito sinérgico. A alta atividade, portanto, refletiria em menos NH_4^+ livre.

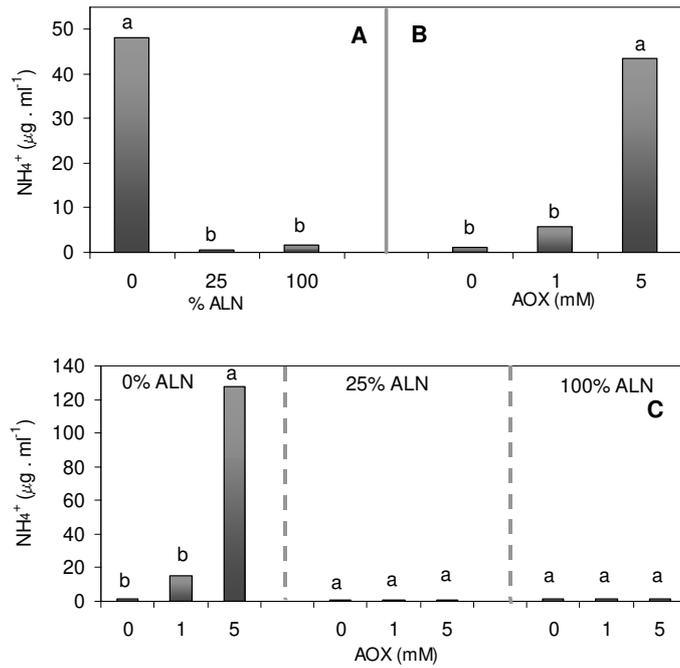


Figura 10. Teor de NH_4^+ ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) no meio de cultura na suspensão de café nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

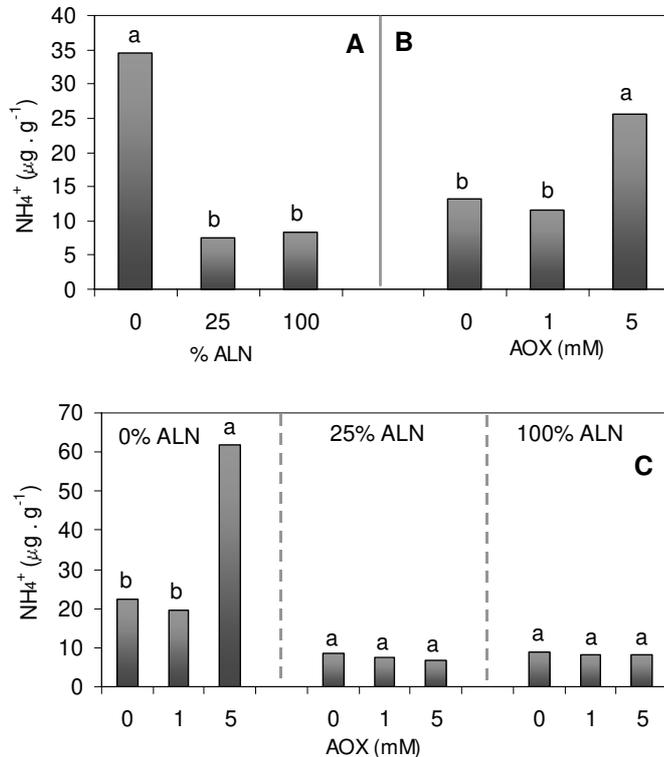


Figura 11. Teor de NH_4^+ ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) nas células de café em suspensão nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

Em plantas superiores, a GS é uma enzima chave na assimilação de N inorgânico em forma orgânica (Lea, 1999). Esta enzima possui alta afinidade por NH_4^+ e está presente em todos os tecidos das plantas.

As enzimas GS e GOGAT também participam da reciclagem do NH_4^+ gerado em diversos processos metabólicos, tais como a fotorrespiração, o “turnover” de proteínas, o metabolismo de compostos nitrogenados translocados (aminoácidos e ureídeos), redução do NO_3^- , reações de biossíntese envolvendo aminoácidos e a biossíntese de lignina (Lea, 1999) (Figura 13).

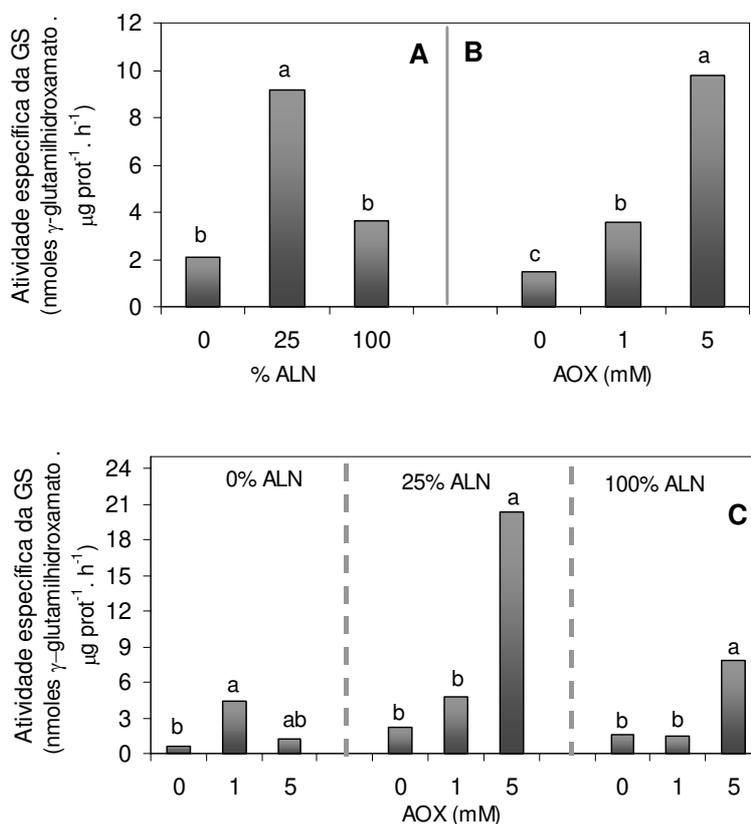


Figura 12. Atividade específica da GS (nmoles γ - glutamilhidroxamato. $\mu\text{g prot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) nas células de café em suspensão nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

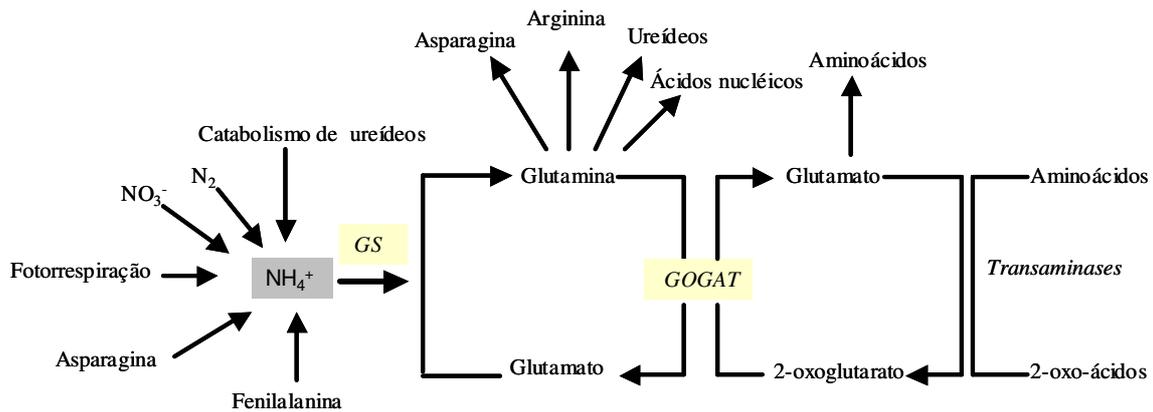


Figura 13. Assimilação de NH_4^+ em plantas superiores via ciclo GS/GOGAT (adaptado de Lea, 1999).

A luz exerce efeito positivo sobre a expressão dos genes que codificam as enzimas GS e GOGAT (Hirel & Lea, 2001). Assim, como a cultura de células em suspensão de café foi mantida no escuro, poderia ocorrer menor atividade de GS. Entretanto, devido à suplementação de sacarose no meio, a disponibilidade de carbono celular exerce efeito regulador sobre os genes da assimilação de N. Este fenômeno é reflexo da interação entre os metabolismos de carbono e N nas plantas.

Análise comparativa da atividade da GS em células em suspensão de soja, nutridas com NH_4/NO_3 ou com ALN, revelou uma alta atividade da GS (cerca de $3,4 \text{ nmoles } \gamma\text{-glutamilhdroxamato} \cdot \mu\text{g prot}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) em ambos os casos, possivelmente como uma adaptação ao alto nível de NH_4^+ no meio contendo sais inorgânicos, em contraste com baixo nível NH_4^+ mantidas em meio com ALN (Stahlhut & Widholm, 1989). Entretanto, estes valores foram menores do que os observados nos tratamentos realizados em células de café em suspensão (Figura 12).

Perfis protéicos dos extratos preparados para a dosagem de GS foram obtidos por SDS-PAGE, mas não mostraram diferenças entre os tratamentos (Figura 14).

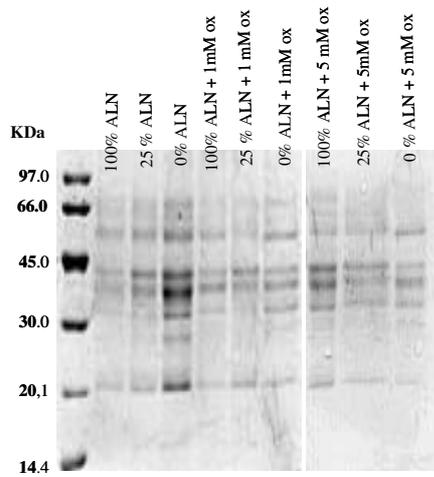


Figura 14. Perfil eletroforético de extratos protéicos nos diferentes tratamentos realizados em células em suspensão de café.

A Figura 15 mostra que o teor de proteínas, determinado nos extratos obtidos para dosagem de GS, foi menor nos tratamentos com ALN, confirmando a pequena incorporação desse ureídeo nas células. Porém, mostra também que nos tratamentos sem ALN, as células que receberam AOX tiveram menos proteínas, embora não diferente significativamente, indicando que o inibidor pode, em parte, ter interferido com a biossíntese de proteínas, mas também, provocado maior degradação, justificando o aumento de NH_4^+ observado para o tratamento 0% ALN / 5 mM AOX (Figuras 10 e 11).

Trabalhos analisando ALN e ALA como fontes de N em cotilédones imaturos de soja cultivados *in vitro* mostraram que estes ureídeos foram fontes pobres de N para a síntese de proteínas de reserva (Coker & Schaefer, 1985; Haga & Sodek, 1987; Tonin, 1988). Segundo Coker & Schaefer (1985), isto pode ocorrer, provavelmente, pelos baixos níveis de atividade da GS ou pelo fato de que o Glu produzido foi insuficiente como substrato de assimilação de NH_4^+ . Deste modo, o

NH_4^+ liberado pela degradação dos ureídeos não foi bem incorporado em proteínas de reserva.

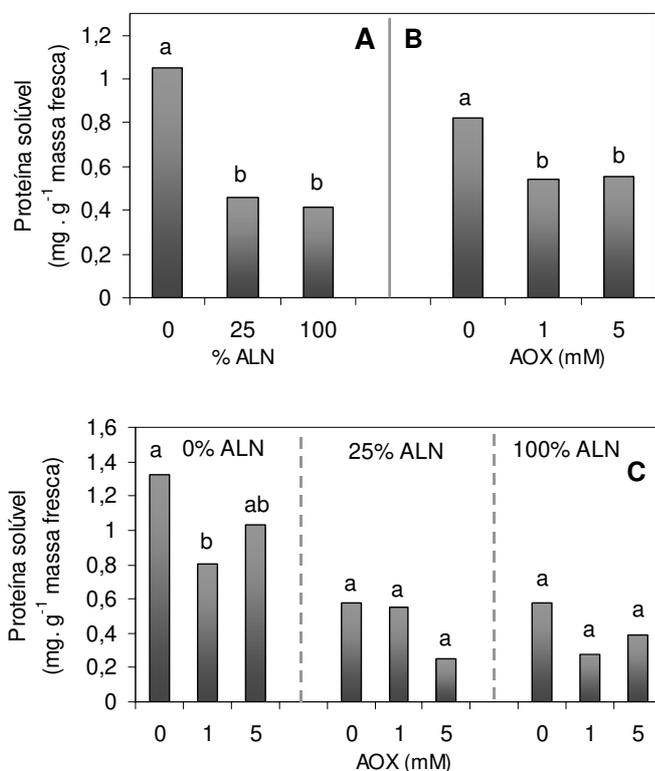


Figura 15. Proteína solúvel (mg.g^{-1} massa fresca) determinada nos extratos obtidos para dosagem da enzima GS nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

Coker & Schaefer (1985) demonstraram, utilizando ALN marcada, que quando usada como única fonte de N, cerca de 50% do NH_4 marcado foi recuperado no meio de cultura. Assim, segundo estes autores, o menor crescimento dos cotilédones *in vitro* na presença de ALN como única fonte de N ocorreu devido ao elevado teor de NH_4^+ e a incapacidade dos cotilédones em acumular N. Outro fator pode estar relacionado com a baixa taxa de absorção dos ureídeos pelo cotilédone *in vitro* (Rainbird *et al.*, 1984).

Porém, Tonin (1988) discorda da proposta de Coker & Schaefer (1985). Esta autora constatou atividades crescentes de GS em cotilédones imaturos de soja mantidos *in vitro*, independente da fonte ser ALN, Asn ou Gln, concluindo que a

atividade da GS foi mais que suficiente para processar todo o N necessário ao acúmulo de proteínas, porém, o menor aproveitamento de ALN pode significar que os processos de transformação deste composto em NH_4^+ são menos eficientes que os de Asn e Gln.

Em cultura de células de algas *Chlamydomonas reinhardtii* foi detectada a atividade da alantoinase, independente da fonte de N utilizada (N inorgânico ou ureídeos). Neste caso, foi observado que a atividade da alantoinase aumentava a medida que as células consumiam ALN presente no meio (Piedras *et al.*, 1998).

Em todos os tratamentos realizados em células de café em suspensão não foi detectada a atividade da enzima alantoinase, provavelmente devido à instabilidade da mesma (dados não mostrados), como verificado por Vitória & Mazzafera (1999) com frutos e folhas de café. No entanto, alguns agentes redutores, tal como cisteína, podem causar inibição da alantoinase (Schubert & Boland, 1990), justificando a falta de atividade desta enzima, já que foi adicionada cisteína ao meio de cultura de células em suspensão de café.

Entretanto, Stahlhut & Widholm (1989), trabalhando com células em suspensão de soja, verificaram que a atividade de alantoinase foi similar em meio contendo ALN, NH_4^+ ou NO_3^- como fontes de N. Tonin (1988) observou que qualquer deficiência que possa existir no metabolismo de ALN, não interfere na alta atividade da alantoinase em cotilédone imaturo de soja.

Além de NH_4^+ , o meio MS também possui NO_3^- , sendo sua concentração de 2.446 $\mu\text{g/ml}$. Da mesma forma que o observado com NH_4^+ (Figura 10 C), o tratamento 0% ALN / 5 mM AOX também apresentou grande quantidade de NO_3^- no meio de cultura (Figura 16 C). Para NH_4^+ sugerimos que neste tratamento poderia

estar havendo toxicidade e assim aumento da produção. Para o NO_3^- , poderia estar ocorrendo baixa absorção.

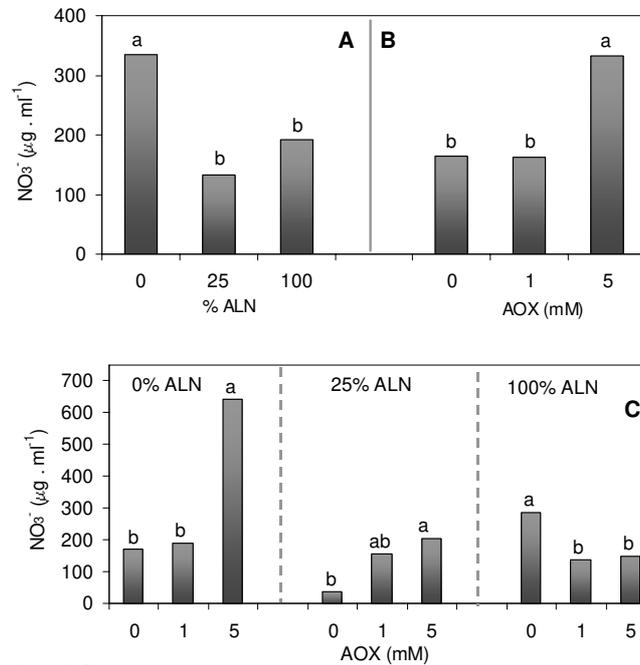


Figura 16. Teor de NO_3^- ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) no meio de cultura na suspensão de café nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

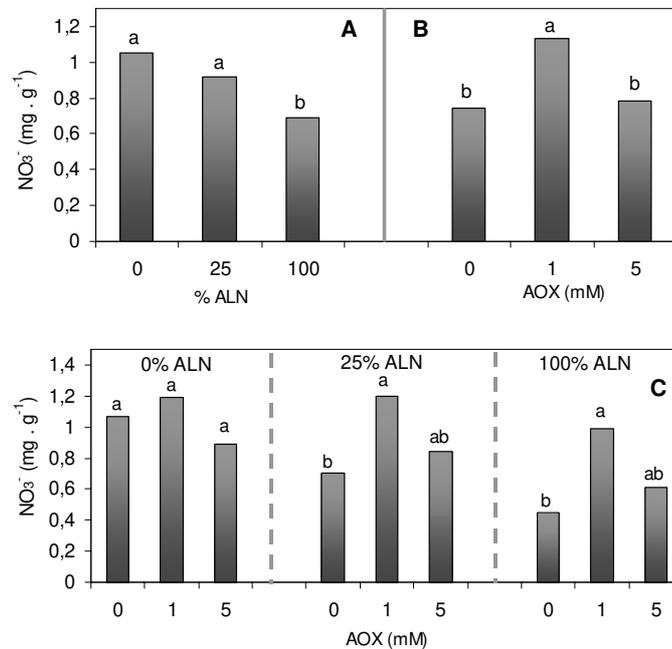


Figura 17. Teor de NO_3^- ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) nas células de café em suspensão nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

Um fato curioso é a presença de NO_3^- nas células crescidas com 100% ALN (Figuras 17 A, C). Ainda que elas tenham sido cultivadas por três semanas em meio sem qualquer forma de N, aparentemente não foi suficiente para exaurir o “pool” de NO_3^- intracelular. Exceto uma tendência de níveis mais elevados em 1 mM AOX nos tratamentos com ALN, não se observou alterações significativas do teor de NO_3^- nas células de café (Figura 17 C).

O NH_4^+ produzido pela redutase do nitrito ou absorvido pelas células é incorporado em aminoácidos por ação de GS.

A análise do teor de aminoácidos livres mostrou que com ALN houve menor quantidade de aminoácidos presentes no meio de cultura (Figura 18 A, C). Com ALN, a presença de AOX parece não ter interferido com o teor de aminoácidos no meio de cultura (Figura 18 C). Por outro lado, na ausência de ALN houve clara evidência de AOX levando ao aumento de aminoácidos no meio (Figura 18 C). Portanto, a hipótese de que AOX poderia estar sendo um fator estressante justificaria o extravasamento de aminoácidos do interior celular. Entretanto, ao contrário do que seria esperado, o teor celular de aminoácidos nas células em suspensão de café crescidas sem ALN foi semelhante, independente da presença de AOX (Figura 19 C). O teor celular não foi diferente em 25 e 100% ALN, mas bastante menor que no tratamento sem o ureídeo (Figura 19 C). O menor teor de aminoácidos nas células em suspensão de café nutridas com ALN pode estar relacionado simplesmente com a reduzida taxa de crescimento, o mesmo observado por Tonin (1988).

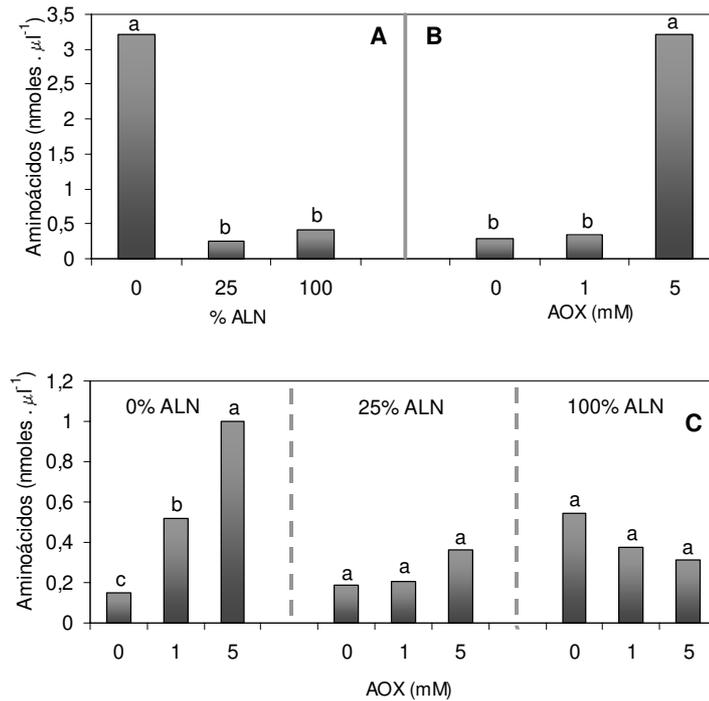


Figura 18. Teor de aminoácidos solúveis ($\text{nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) no meio de cultura na suspensão de café nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

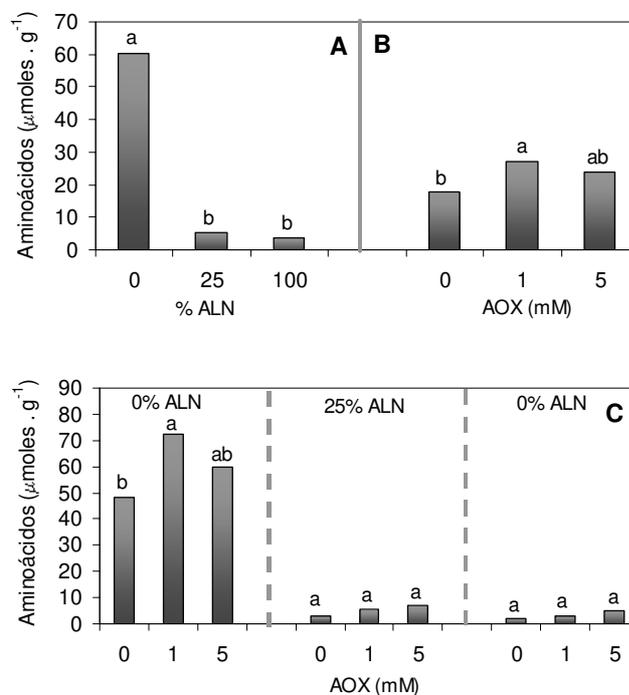


Figura 19. Teor de aminoácidos livres solúveis ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) nas células de café em suspensão nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

Observou-se também que as quantidades de N total nas células crescidas com ALN foram menores do que sem ALN e que não houve efeito de AOX (Figura 20).

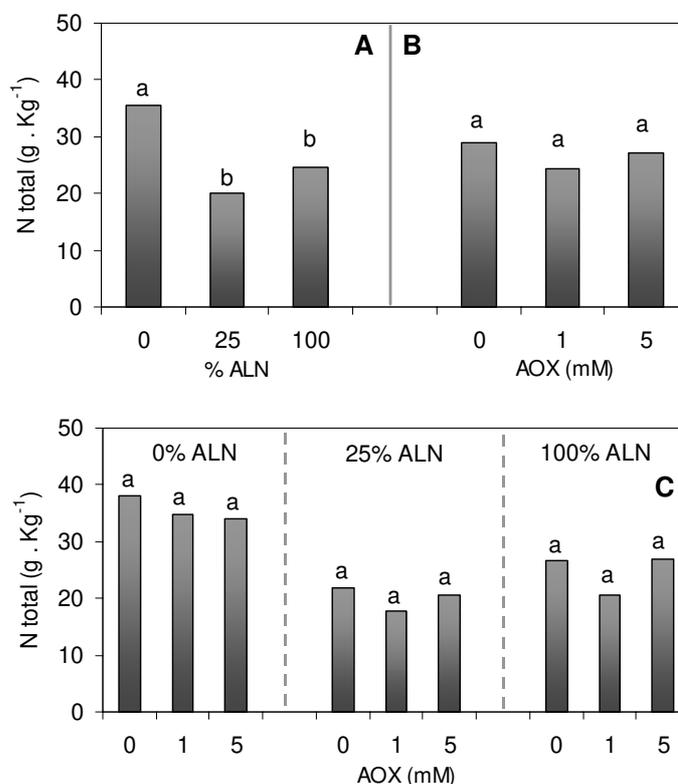


Figura 20. Quantidade de N total (g.Kg⁻¹) nas células de café em suspensão nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a p ≤ 0,05 pelo teste de Tukey (n=7).

As análises da composição de aminoácidos (% mol) mostraram que, na ausência de AOX, as células dos tratamentos com 25 e 100% ALN tinham mais Asp, Glu e Ser que as de 0% ALN (Figura 21). Por outro lado, Asn e Gln eram menores nestes tratamentos, contra teores elevados no tratamento sem ALN. Gly apresentou tendência de aumento nos meios com alantoína. Os aminoácidos Glu, Asp, Gln e Asn atuam como importantes carreadores de N em plantas, tendo um papel fundamental na exportação e distribuição de N.

A adição de AOX no meio sem ALN levou à redução dos aminoácidos Asp, Glu, Asn e Gln, principalmente em 5 mM, indicando novamente algum tipo de estresse. Porém nos tratamentos com ALN, apenas houve redução de Asp e Glu, sendo bastante pronunciada neste último aminoácido. Independente da presença de AOX, o percentual do aminoácido Ser sempre foi mais alta nos tratamentos com ALN (Figura 21).

Gly e Ser são metabólitos intermediários da fotorrespiração e não um produto final desta via, mas as quantidades observadas aqui não poderiam ser justificadas por esta via metabólica porque os frascos permaneceram constantemente no escuro, envoltos por papel alumínio. Porém, o glioxilato formado através do catabolismo de ureídeos pode ser transaminado para a formação de Gly (Walton & Woolhouse, 1986).

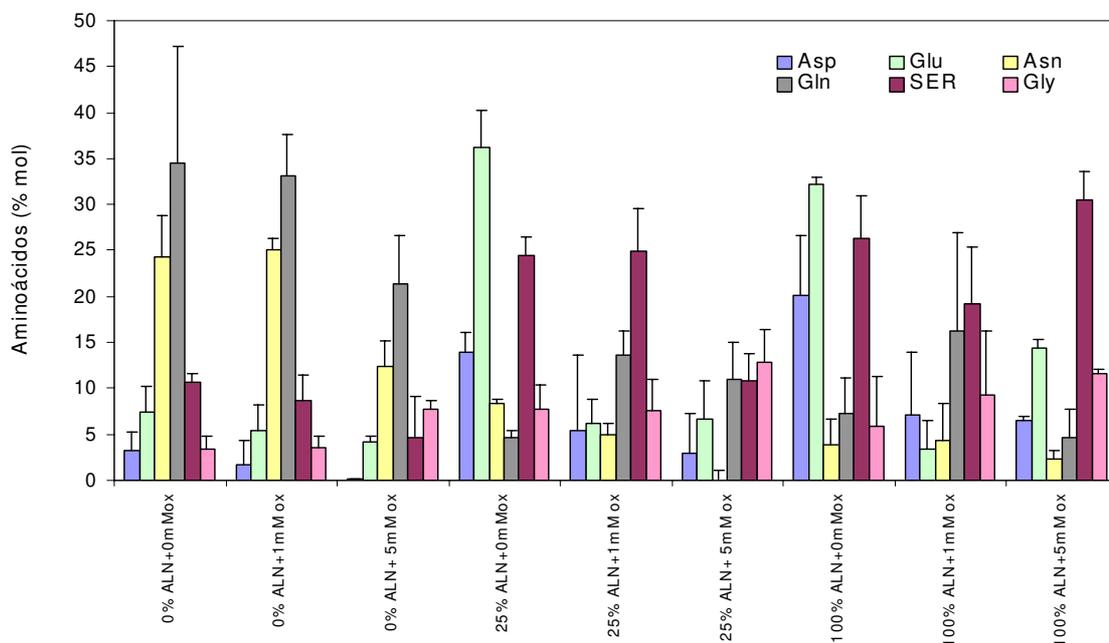


Figura 21. Composição de aminoácidos (% mol) em células de café em suspensão. Barras = Desvio padrão (n=6).

Observamos que ALN favorece o aumento de Ser em células em suspensão de café (Figura 21), o que pode estar relacionado com o fato que plantas produtoras de ureídeos possuem elevado nível de Ser e Gly (Schubert & Boland, 1990), decorrente da transaminação do glioxilato.

A presença de NO_3^- no meio de cultura pode reduzir a biossíntese de ureídeos e aumentar a biossíntese de Asn (Schubert & Boland, 1990) o que pode justificar a maior quantidade de Asn no meio com 0% ALN (Figura 21), o qual possui NO_3^- na sua formulação. Da mesma forma, as células do tratamento 0% ALN / 5 mM AOX, que aparentemente não absorveram eficientemente o NO_3^- do meio (Figura 15 C), apresentaram o menor conteúdo de Asn.

Observou-se que no mesmo tratamento (0% ALN / 5 mM AOX) houve grande acúmulo de NH_4^+ nas células e no meio de cultura (Figuras 10 C e 11 C). Isto pode estar relacionado à quebra de Asn por ação da asparaginase, reação que libera NH_4^+ (Lea, 1999).

ALA e ALN aparecem na via catalítica de cafeína, mas não se sabe sua real contribuição para a economia de N em plantas. Várias pesquisas têm indicado que o N da molécula de cafeína não tem importância para a economia de N na planta de café, apesar de que este alcalóide pode acumular até mais de 1% em sementes dessa planta (Mazzafera *et al.*, 1996).

O teor de cafeína no meio de cultura mostrou-se maior para os meios sem ALN (Figura 22 A), sendo que houve diferenças marcantes em função da presença de AOX (Figura 22 C). Enquanto 1 mM provocou um ligeiro aumento, a 5 mM houve redução drástica, indicando novamente algum tipo de estresse no tratamento 0% ALN / 5 mM AOX. No entanto, analisando apenas o tratamento AOX, verifica-se um aumento do teor de cafeína no meio na concentração de 1mM, não havendo

diferença nas demais concentrações (Figura 22 B). Nos meios com ALN não houve variação no teor de cafeína em função de AOX ou muito menos entre a quantidade de ALN no meio (Figura 22 A,C). Isto é curioso, pois indica que mesmo com 75% do N na forma de sais de MS, cafeína não acompanhou o aumento observado no tratamento sem ALN, ou seja, com 100% de NMS.

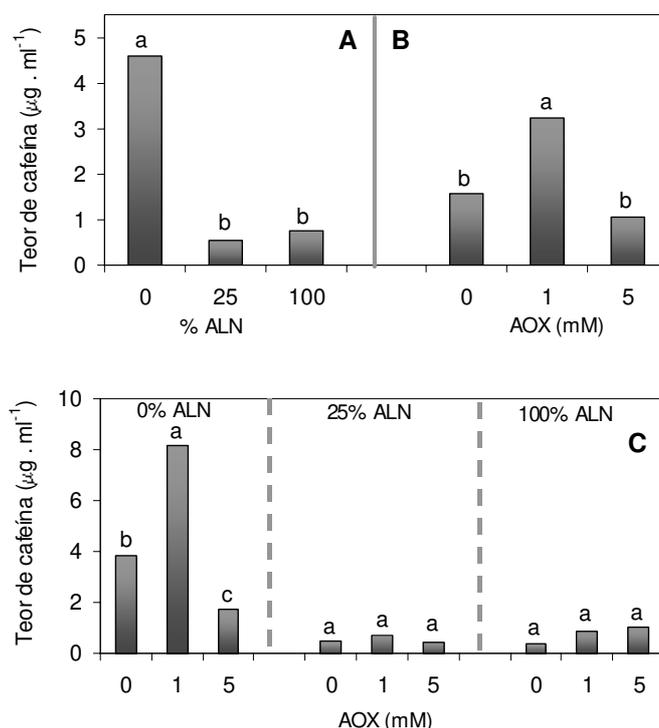


Figura 22. Teor de cafeína ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) no meio de cultura na suspensão de café nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

Cafeína é facilmente liberada no meio de cultura (Sartor & Mazzafera, 2000) e o aumento do seu teor nas células no tratamento 25% ALN (Figura 23 A) não refletiu o aumento no meio de cultura (Figura 22 A). O maior teor de cafeína nas células foi observado no tratamento com 25% ALN, sendo os valores bastante reduzidos no 0% e 100% ALN (Figura 23 C). Isto poderia indicar que no tratamento com 25 % ALN a cafeína teria ficado retida nas células, não sendo liberada para o meio de cultura, e

consequentemente, prejudicado o crescimento celular como visto anteriormente (Figura 5 C). Também deve ser notado que a variação de cafeína no meio de cultura acompanha os dados de acúmulo de massa das células (Figura 5).

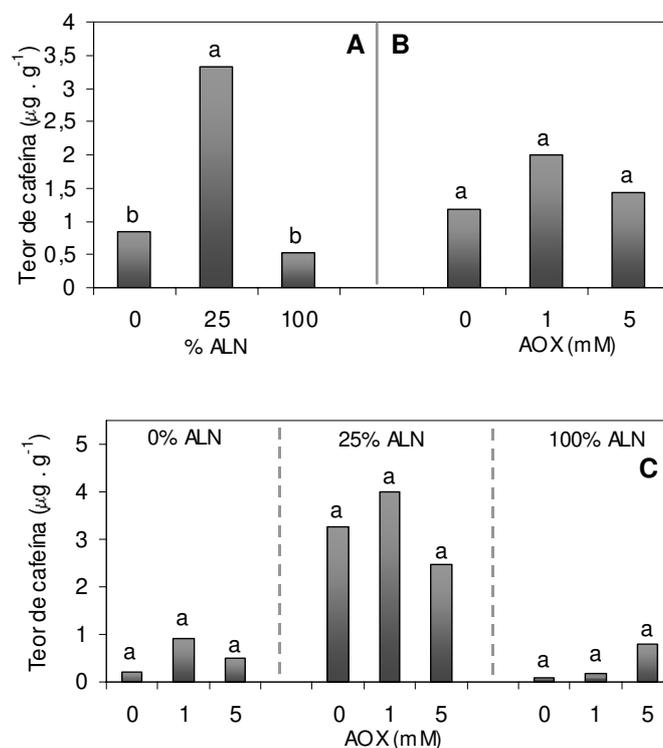


Figura 23. Teor de cafeína ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) nas células de café em suspensão nos tratamentos ALN (A), AOX (B) e na interação ALN x AOX (C). Letras minúsculas diferentes indicam significância a $p\leq 0,05$ pelo teste de Tukey ($n=7$).

A via biossintética de cafeína tem como principal precursor adenina, tendo como intermediários inosina monofosfato e xantosina monofosfato. Esta última é convertida a xantosina e depois a 7-metilxantosina. Em seguida, após a perda do ribosídeo forma-se 7-metilxantina e, com duas metilações seguidas são formadas teobromina (3,7-dimetilxantina) e cafeína (1,3,7-trimetilxantina). Acredita-se que a biossíntese de cafeína acompanha as variações do metabolismo de N em plantas, ou seja, a medida que aumenta o teor de N existe aumento também do alcalóide

(Mazzafera *et al.*, 1996). Por outro lado, isto parece refletir maior atividade gênica, pois a adenina para a biossíntese de cafeína parece vir do pool de recuperação da reciclagem de RNA, fato este que explicaria o aumento desse alcalóide em plantas sob algum tipo de estresse (Guerreiro Filho e Mazzafera, 2000). Assim, não parece haver biossíntese específica de nucleotídeos para a formação de cafeína. Gln e Asp são os doadores de N na biossíntese de adenosina e guanosina monofosfato em plantas, precursores primários de cafeína (Sugiura & Takeda, 2000), e não houve relação entre os teores do alcalóide e os desses aminoácidos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi verificar o papel de ALN na nutrição nitrogenada em café, uma vez que esta planta acumula este ureídeo e ALA como produtos oriundos da degradação de cafeína. Sendo cafeína um alcalóide encontrado em significativa quantidade em sementes de café (~1,2%) e também em folhas novas (~4% - Frischknecht & Baumann, 1985) esta contribuição poderia ser importante. Foram utilizadas células de café em suspensão como modelo experimental.

Apesar de absorvida pelas células, ALN contribui menos para o crescimento celular. Em todas as análises efetuadas ficou evidente a incapacidade das células em adaptarem seu metabolismo a esta fonte de N. Assim, parece que por si só, ALN provocou algum tipo de desbalanço metabólico. AOX foi usado como ferramenta na inibição de uricase, a enzima que produz ALN a partir de ácido úrico, mas mostrou-se tóxico na ausência de ALN. Porém, em alguns casos com ALN no meio de cultivo, parece ter ocorrido algum tipo de interação entre inibidor e ureídeo, mudando o metabolismo de maneira bastante diferente ao observado com o inibidor, mas sem ALN no meio. Isto talvez esteja relacionado com o fato de AOX ter diminuído bastante no meio de cultivo, porém, como não foi analisado o seu teor nas células não podemos inferir que tenha sido degradado de fato.

Apesar dos nossos dados indicarem que ALN tem papel pouco importante na economia de N em células de café, não podemos excluir esta hipótese totalmente. Ensaios mais detalhados com uso de isótopos marcados permitiriam verificar precisamente a incorporação do N de ALN em compostos nitrogenados das células. Desta forma, de alguma maneira o N proveniente de cafeína poderia estar sendo reciclado em café.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashihara, H. & Crozier, A., 1999. Biosynthesis and catabolism of caffeine in low caffeine-containing species of *Coffea*. *J. Agric. Food Chem.* 47:3425-3431.
- Antia, N.J., Berland, B.R., Bonin, D.J. & Maestrini, S.Y., 1980. Allantoin as nitrogen source for growth of marine benthic microalgae. *Phycologia* 19:103-109.
- Bauer, D., Biehler, K., Fock, H., Carrayol, E., Hirel, B., Migge, A. & Becker, T.W., 1997. A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiol. Plant.* 99:241-248.
- Bielesek R.L. & Turner N.A., 1966. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin layer electrophoresis and chromatography. *Anal. Biochem.* 17:278-282.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:255-260.
- Brangeon, J., Hirel, B. & Forchioni, A., 1989. Immunogold localization of glutamine synthetase in soyebean leaves, roots and root nodules. *Protoplasma* 151: 88-97.
- Botella, J.R., Verbelen, J.P. & Valpuesta, V., 1988. Immunocytolocalization of glutamine-synthetase in green leaves and cotyledons of *Lycopersicon-Esculentum*. *Plant Physiol.* 88:943-946.
- Cataldo, D.A., Schrader, L.E. & Youngs, V.L., 1974. Analysis by digestion and colorimetric assay of total nitrogen in plant tissues high in nitrate. *Crop Sci.* 14:854-856.
- Chapin, F.S., Moilanen, L. & Kielland, K., 1993. Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature* 361:150-153.

- Chisholm, V.T., Lea, H.Z., Rai, R. & Cooper, T.G., 1987. Regulation of allantoin transport in wild-type and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169:1684-1690.
- Cid, L.P.B., 1998. Suspensão celular. IN: Cultura de tecidos e transformação genética de plantas (A. C. Torres, L. S. Caldas, e J.A. Buso eds.), vol. 1, Embrapa- SPI, Brasília, pp. 331-353.
- Coker, G.T. & Schaefer, J., 1985. ^{15}N and ^{13}C NMR determination of allantoin metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 77:129-135.
- Desimone, M., Catoni, E., Ludewig, U., Hilpert, M., Schneider, A., Kunze, R., Tegeder, M., Frommer, W.B. & Schumacher, K., 2002. A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:847-856.
- Dubois, F., Brugière, N., Sangwan, R.S. & Hirel, B., 1996. Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Mol. Biol.* 31:803-817.
- Falkengren-Grerup, U., Månsson, K.F. & Olsson, M. O., 2000. Uptake capacity of amino acids by ten grasses and forbs in relation to soil acidity and nitrogen availability. *Environ. Exp. Bot.* 44:207-219.
- Ferreira, D.F., 2000. Manual do sistema Sisvar para análises estatísticas. Universidade Federal de Lavras – Departamento de Ciências Exatas. 63p
- Frischknecht P.M. & Baumann T.W., 1985. Stress induced formation of purine alkaloids in plant tissue culture of *Coffea arabica*. *Phytochemistry* 24:2255-2257.
- Guerreiro Filho, O. & Mazzafera, P., 2000. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. *J. Chem. Ecol.* 26:1447-1464.

- Haga, K.I. & Sodek, L., 1987, Utilization of nitrogen sources by immature soybean cotyledons in culture. *Ann. Bot.* 59:597-601.
- Hartung, W. & Ratcliffe, R.G., 2002. Utilization of glycine and serine as nitrogen sources in the roots of *Zea mays* and *Chamaecrista intrepidus*. *J. Exp. Bot.* 53:2305-2314.
- Hirel, B. & Lea, P.L., 2001. Ammonia assimilation. In: *Plant Nitrogen* (P.J. Lea and J-F. Morot-Gaudry, eds.), Springer-Verlag, New York, pp.79-99.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I., 1938. The water culture method of growing plants without soil. *California Agric. Exp. Station, Bull.* 347:1-39.
- Jarret, H.W., Cooksey, K.D., Ellis, B. & Andersen, J.M., 1986. The separation of *o*-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reverse-phase chromatography on octylsilica columns. *Anal. Biochem.* 153:189-198.
- Kalberer, P., 1965. Breakdown of caffeine in leaves of *coffea arabica* L. *Nature* 205:597.
- Kielland, K., 1994. Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecology* 75:2373-2383.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lea, P.J., 1999. Nitrogen metabolism. IN: *Plant Biochemistry and Molecular Biology* (P.J. Lea and R.C. Leegood, eds.), 2 Edition, John Wiley & Sons Ltd., England, pp.163-191.
- Lea, P.J. & Ireland, R.J., 1999. Nitrogen metabolism in higher plants. IN: *Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology* (B.K. Singh, ed.), Marcel Dekker, New York, pp.1-47.

- Lipson, D.A. & Monson, R.K., 1998. Plant-microbe competition for soil amino acids in the alpine tundra: effects of freeze-thaw and dry-rewet events. *Oecologia* 113:406-414.
- Mazzafera, P., 2004. Catabolism of caffeine in plants and microorganisms. *Frontiers in Bioscience* 9:1348-1359.
- Mazzafera, P. & Gonçalves, K.V., 1999. Nitrogen compounds in the sap of coffee. *Phytochemistry* 50:383-386.
- Mazzafera, P., Yamaoka-Yano, D.M. & Vitória, A.P., 1996. Para que serve a cafeína nas plantas. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 8:67-74.
- McCullou, H., 1967. Determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clínica Chimica Acta* 17:297-301.
- McNally, S.F., Hirel, B., Gadal, P., Mann, A. F. & Stewart, G.R., 1983. Glutamine Synthetases of Higher Plants: Evidence for a specific isoform content related to their possible physiological role and their compartmentation within the leaf. *Plant Physiol.* 72:22-25.
- Mosquim, P.R. & Sodek, L., 1992. Partitioning of nitrogen in soybean fruit explants cultured with glutamine, asparagine or allantoin. *Plant Physiol. Biochem.* 30:451-457.
- Murashige, C. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Näsholm, T. & Persson, J., 2001. Plant acquisition of organic nitrogen in boreal forests. *Physiol. Plant.* 111:419-426.
- Nelson, D. W. & Sommers, L.E., 1973. Determination of total nitrogen in plant material. *Agron. J.* 65:109-112.

- Neuenschwander, B. & Baumann, T.W., 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports* 10:608-612.
- Oaks, A. & Hirel, B., 1985. Nitrogen metabolism in roots. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36:345-365.
- O'Neal, D. & Joy, K.W., 1973. Glutamine synthetase of pea leaves. 1. Purification, Stabilization, and pH optima. *Arch. Biochem. Biophys.* 159:113-122.
- Pate, J.S., 1973. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.* 5:109-119.
- Pate, J.S. & Atkins, C.A., 1983. Xylem and Phloem transport and the functional economy of carbon and nitrogen of a legume leaf. *Plant Physiol.* 71:835-540.
- Peat, L.J. & Tobin, A., 1996. The effect of nitrogen nutrition on the cellular localization of glutamine synthetase isoforms in barley roots. *Plant Physiol.* 111:1109-1117.
- Pérez-García, A., Pereira, S., Pissarra, J., Gutierrez, A.G., Cazorla, F.M., Salema, R., de Vicente, A. & Canovas, F.M., 1998. Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta* 206:426-434.
- Pérez-Rodríguez, J. & Valpuesta, V., 1996. Expression of glutamine synthetase genes during natural senescence of tomato leaves. *Physiol. Plant* 97:576-582.
- Piedras, P., Aguilar, M. & Pineda, M., 1998. Uptake and metabolism of allantoin and allantoate by cells of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Eur. J. Phycol.* 33:57-64.
- Pineda, M. & Cardenas, J., 1996. Transport and assimilation of purines in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientia Marina* 60: 195-201.
- Polayes, D.A. & Schubert, K.R., 1984. Purine synthesis and catabolism in soybean seedlings – the biogenesis of ureides. *Plant Physiol.* 75:1104-1110.

- Raab, T.K., Lipson, D.A. & Monson, R.K., 1999. Soil amino acid utilization among species of the Cyperaceae: Plant and soil processes. *Ecology* 80:240-2419.
- Rainbird, R.M., Thorne, J.H. & Hardy, R.W., 1984. Role of amides amino acids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiol.* 74:329-334.
- Romanov, V., Merski, M.T. & Hausinger, R.P., 1999. Assays for allantoinase. *Anal. Biochem.* 268:49-53.
- Ryan, E., Bodley, F. & Fottrell, P.F., 1972. Purification and characterization of aspartate aminotransferases from soybean root nodules and rhizobium-japonicum. *Phytochemistry* 11:957-963.
- Sartor, R.M. & Mazzafera, P., 2000. Caffeine formation by suspension cultures of *C. dewevrei*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43:61-69.
- Schlee, D. & Reinbothe, H., 1963. Über eine funktionelle inversion der C-atome von glycin im purinstoffwechsel. *Phytochemistry* 2:231-236.
- Schmidt, S. & Stewart, G.R., 1997. Waterlogging and fire impacts on nitrogen availability and utilization in a subtropical wet heathland (wallum). *Plant Cell Environ.* 26:1231-1241.
- Schubert, K.R. & Boland, M.J., 1990. The ureides. IN: *The Biochemistry of Plants* (B.J. Mifflin and P.J. Lea, eds), Vol. 16, San Diego: Academic Press., pp.197-282.
- Schulten, H.R. & Schnitzer, M., 1998. The chemistry of soil organic nitrogen: a review. *Biol. Fertil. Soil* 26:1-15.
- Sousa, M.P., Matos, M.E.O., Matos, F.J.A., Machado, M.I.L. & Craveiro, A.A.(Eds), 1991. *Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras*. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil.

- Sprent, J.I., 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some Leguminosae. *Plant Cell Environ.* 3:35-43.
- Stahlhut, R.W. & Widholm, J.M., 1989. Ureid catabolism by soybean { glicine-max (L) Merrill } cell-suspension cultures. 1. ureia is not an intermediate in allantoin degradation. *J. Plant. Physiol.* 134:85-89.
- Stebbins, N.E. & Polacco, J.C., 1995. Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiol.* 109:169-175.
- Sugiura, M. & Takeda, Y., 2000. Nucleic acids. IN *Biochemistry and Molecular Biology of Plantas*, (B.B. Buchanan, W. Gruissem & R.L. Jones, eds), American Society of Plant Biologists. pp. 260-310
- Suzuki, T., Ashihara, H. & Waller, G.R., 1992. Purine and Purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants. *Phytochemistry* 31:2575-2584.
- Tonin, G.S., 1988. Influência da fonte de nitrogênio na atividade de enzimas envolvidas no processo de assimilação de amidas e ureídeos em cotilédones imaturos de soja mantidos em cultura. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, Tese de Doutorado.
- Thomas, R.J., Feller, U. & Erismann, K.H., 1980. Ureide metabolism in non-nodulated *Phaseolus-vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* 31:409-417.
- Thomas, R.J. & Schrader, L.E., 1981. Ureide metabolism in higher plants. *Phytochemistry* 20:361-371.

- Vézina, L.P. & Langlois, J.R., 1989. Tissue and cellular distribution of glutamine synthetase in roots of pea (*Pisum sativum*) seedlings. *Plant Physiol.* 90:1129-1133.
- Vitoria, A. P. & Mazzafera, P., 1999. Xanthine degradation and related enzymes activities in leaves and fruits of two *Coffea* species differing in caffeine catabolism. *J. Agric. Food Chem.* 47:1851-1855.
- Vogels, G.D. & Van Der Drift, C., 1970. Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.* 33:143-157.
- Von Wirén, N., Gazzarrini, S., Gojon, A. & Frommer, W.B., 2000. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:254-261.
- Walton, N.J. & Woolhouse, H.W., 1986. Enzymes of serine and glycine metabolism in leaves and nonphotosynthetic tissues of *Pisum sativum* L. *Planta* 167:119-128.
- Yemm, E.W. & Cocking, E.C., 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst.* 80:209-213.

Capítulo 2

**ESTRESSES ABIÓTICOS E ENZIMAS
ANTIOXIDATIVAS EM CÉLULAS DE CAFÉ
EM SUSPENSÃO**

1. INTRODUÇÃO

Mudanças nas condições ambientais, como temperaturas extremas, intensidade luminosa, salinidade, metais pesados, seca, infecção por patógenos, etc, podem conduzir ao estresse oxidativo com prejuízos às células vegetais (Prasad *et al.*, 1994; Sgherri & Nawari-Izzo, 1995; Alscher *et al.*, 1997; Vitória *et al.*, 2001).

Um aspecto comum a todas essas condições de estresse é o aumento da produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), com o concomitante aumento de substâncias e enzimas antioxidantes (Alscher *et al.*, 1997), sugerindo que o sistema de defesa antioxidativo possui um papel fundamental na aquisição de tolerância das plantas (Vitória *et al.*, 2001). A possível função desta resposta pode incluir uma proteção ao aparato fotossintético, preservação da integridade de membranas e proteção de DNA e proteínas (Alscher *et al.*, 1997).

Assim, a indução de enzimas antioxidativas pode ser um reflexo de uma estratégia importante para superar os estresses oxidativos impostos pelas condições adversas do ambiente (Foyer *et al.*, 1997).

A maioria das ROS é produto do metabolismo regular das células como, por exemplo, a fotorrespiração produzindo H₂O₂ nos peroxisomos. Porém, ROS também podem ser produzidas através da ruptura do sistema de transporte de elétrons durante condições de estresses (Dat *et al.*, 2000; Van Breusegem *et al.*, 2001).

Sob condições moderadas de estresses, os radicais são removidos eficientemente pelo sistema de defesa antioxidativo. Contudo, durante períodos de estresse mais severo, o sistema de remoção pode estar saturado pelo próprio aumento da produção de radicais. Excessivos níveis de ROS resultam em danos ao aparato fotossintético, conduzindo à morte de células e à clorose nas folhas (Van

Breusegem *et al.*, 2001), à destruição de lipídios, de ácidos nucleicos e de proteínas (Foyer *et al.*, 1997).

A importância do sistema antioxidativo foi demonstrada pela superprodução de vários removedores de ROS em diferentes plantas transgênicas, proporcionando proteção contra o estresse oxidativo. Ao mesmo tempo, ROS também podem ser usadas em benefício da planta, tendo papel importante na ativação de mecanismos de proteção durante estresses abióticos e bióticos. Essa dualidade somente pode ser obtida quando os níveis de ROS nas células são completamente controlados, tanto em termos de produção como de consumo (Van Breusegem *et al.*, 2001).

Os conteúdos de ROS nas células (H_2O_2 ; 1O_2 , $O_2^{\bullet-}$; O_2H^{\bullet} , OH^{\bullet}) são controlados pelo sistema de defesa antioxidativo que inclui várias enzimas tais como; ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), glutathione redutase (GR, EC 1.6.4.2), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e enzimas relacionadas com a síntese de glutathione, além de compostos não enzimáticos tais como ascorbato (vitamina C), carotenóides, glutathione reduzida (GSH) e tocoferol (vitamina E) (Foyer *et al.*, 1997; Núñez *et al.*, 2003).

SODs são consideradas enzimas importantes dentro do sistema de defesa antioxidativo, pois eliminam radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) numa reação que produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Buchanan *et al.*, 2000; Van Breusegem *et al.*, 2001) (Figura 1).

O H_2O_2 produzido pode ser eliminado pela CAT ou também pelo ciclo ascorbato/glutathione, que envolve APX, monohidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4) ou dehidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1) e GR (Figura 1) (Buchanan *et al.*, 2000).

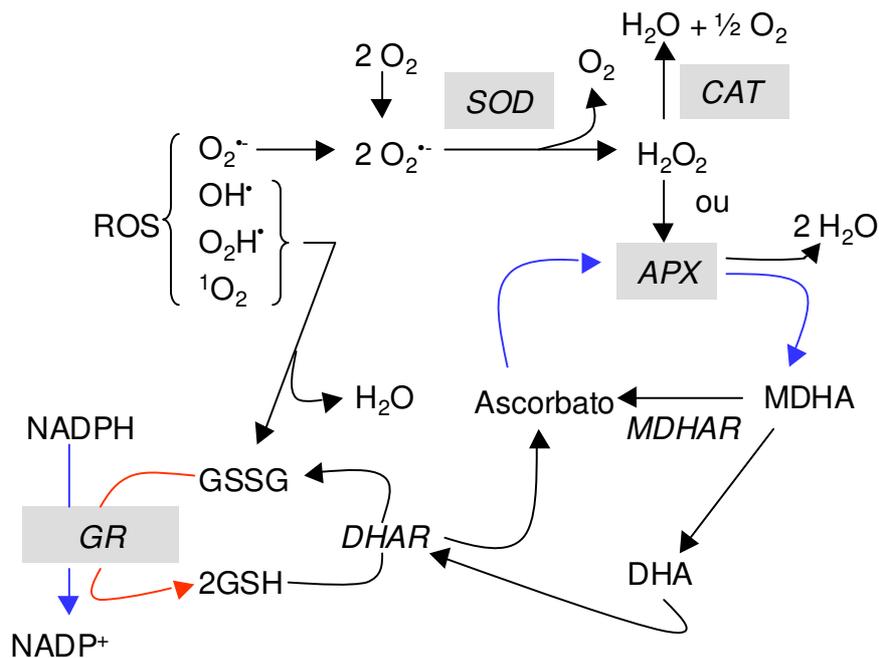


Figura 1. Sistema de defesa antioxidativo em plantas. SOD elimina O_2^{\bullet} numa reação que produz H_2O_2 e H_2O . CAT converte H_2O_2 em H_2O e O_2 . H_2O_2 também pode ser eliminado pela enzima APX que produz H_2O . Espécies reativas de oxigênio (ROS) como OH^{\bullet} , 1O_2 e O_2H^{\bullet} são eliminadas pela via glutatona. GSSG (glutationa oxidada) é reduzida pela GR, requerendo o consumo de NADPH. MDHA (monodehidroascorbato) forma espontaneamente DHA (dehidroascorbato) que pode reagir com GSH (glutationa reduzida) para produzir ascorbato e GSSG, numa reação catalizada pela DHAR (dehidroascorbato redutase). A regeneração de ascorbato reduzido também pode ser catalisada por MDHAR (monodehidroascorbato redutase). SOD (superóxido dismutase); CAT (catalase); APX (ascorbato peroxidase) e GR (glutationa redutase) (Adaptado de Buchanan *et al.*, 2000).

H_2O_2 e O_2^{\bullet} são tóxicos às células vegetais, porém o maior dano é ocasionado pelo radical hidróxido (OH^{\bullet}), o qual é formado pela combinação de H_2O_2 e O_2^{\bullet} na presença de Fe^{2+} e Fe^{3+} , pela reação de Haber-Weiss (Van Breusegem *et al.*, 2001). OH^{\bullet} é muito reativo e pode ocasionar danos letais às células, através da desnaturação de proteínas, mutação de DNA e peroxidação de lipídeos (Van Breusegem *et al.*, 2001).

As enzimas antioxidativas não estão distribuídas uniformemente na célula, uma vez que o sistema de defesa encontra-se associado a vários compartimentos subcelulares específicos (Buchanan *et al.*, 2000).

SODs podem estar presentes na maioria dos compartimentos subcelulares como, cloroplasto, citosol, mitocôndria e peroxisomos na forma de isoenzimas (Buchanan *et al.*, 2000). A isoenzima SOD Cu/Zn, localiza-se no peroxisomos, citosol e cloroplasto, enquanto a SOD Mn, situa-se na mitocôndria e peroxisomos e a SOD Fe apenas no cloroplasto. GR pode estar localizada no cloroplasto, citoplasma e mitocôndria de plantas superiores (Stevens *et al.*, 1997) e APX encontra-se localizada no citosol e cloroplasto. Em contraste, CAT encontra-se apenas no peroxissomo (Buchanan *et al.*, 2000), porém é muito importante para a destoxificação de ROS durante condições de estresses. Estresse oxidativo causa proliferação de peroxisomos (Lopez-Huertas *et al.*, 2000).

A atividade e expressão de genes que codificam enzimas antioxidativas podem sofrer alterações mediante condições ambientais desfavoráveis. Assim, neste trabalho, foram investigadas as alterações na atividade específica de algumas enzimas antioxidativas em células de café em suspensão mediante várias condições de estresse abiótico. Os resultados obtidos foram confrontados com a ocorrência de seqüências homólogas de ESTs de café (projeto Genoma Café) obtidos através de “Northen eletrônico”.

2. OBJETIVO

Analisar o efeito de estresses abióticos sobre enzimas antioxidativas em células de café em suspensão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estabelecimento da suspensão celular de café

Plantas matrizes de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho provenientes de vasos localizados em casa de vegetação, foram previamente tratadas com solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1938), visando à melhoria da qualidade nutricional dos explantes foliares. Folhas do 3° e 4° pares foram coletadas e lavadas em água corrente e desinfetadas com solução de NaOCl (0,4% cloro ativo) em água (1:3), durante 30 min. Em fluxo laminar, sob condições assépticas, o material vegetal foi lavado por três vezes em água destilada autoclavada e cortado tipo pente, visando aumentar a área de contato do explante com o meio de cultura e, conseqüentemente, obter maior quantidade de calos.

Foi utilizado meio CIM (Neuenschwander & Baumann, 1992) constituído de sais minerais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), 10 mg/l tiamina-HCl, 100 mg/l inositol, 30 g/l sacarose, 4 mg/l cinetina e 1 mg/l 2,4-D. Acertou-se o pH 5,8 do meio com KOH, adicionou-se 8 g/l ágar e o meio foi autoclavado a 121°C, a 1,3 atm, por 20 minutos.

Após o preparo dos explantes, estes foram colocados com a face abaxial voltada para baixo, em frascos de vidro contendo 30 ml de meio CIM, previamente preparado. As culturas foram mantidas no escuro, na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Foram selecionados os calos que apresentaram coloração esbranquiçada, com aspecto friável, sendo transferidos para meio líquido CIM após atingirem um crescimento adequado, o que demorou cerca de oito a nove semanas. Para a homogeneização da suspensão celular, a qual demorou cerca de dois meses, os

agregados que se formavam eram descartados, sendo selecionadas apenas agregados pequenos de células e de coloração esbranquiçada. A suspensão foi multiplicada através de subcultivos semanais. O material ficou sob agitação constante de 100 rpm, no escuro e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

3.2. Inoculação, tratamentos e coleta das células

Inoculação: Cerca de 10 g de massa fresca de células foram inoculados em erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido CIM, diferenciando o tipo de tratamento empregado. O material foi incubado no escuro, exceto o tratamento com luz, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e sob agitação constante de 100 rpm.

Tratamentos: Foram utilizados os seguintes tratamentos: estresse salino (NaCl 50 mM), estresse osmótico (PEG 15%), excesso de potássio (100 mM KCl), indução por $0,1 \mu\text{M}$ 24-epibrassinolídeo, estresse constante por luz ($> 500 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$); estresse por cádmio (1 mM $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e controle (células mantidas no escuro). 24-Epibrassinolídeo (EBR) foi gentilmente cedido pelo Dr. Marco António Teixeira Zullo, do Centro de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agronômico de Campinas. Partes das soluções estoque de EBR e cádmio foram filtradas estéreis (filtro Millex-GS 022 μm estéril) para serem adicionadas nos meios. Os outros tratamentos foram adicionados diretamente aos meios de cultura antes de serem autoclavados.

Coleta das células: Após três dias da inoculação os frascos foram vertidos para remoção do excesso de meio e as células filtradas e lavadas em água destilada autoclavada e colocadas em tubo Falco (50 mL), sendo em seguida submetidas a

centrifugação a 2.000 g por 15 min a 4°C, e o sobrenadante descartado. As células foram rapidamente colocadas em nitrogênio líquido e guardadas a -70°C. Foram feitas três repetições de cada tratamento para as análises enzimáticas.

Alguns dos materiais utilizados para fazerem as bibliotecas do Projeto EST-Genoma foram células em suspensão, produzidas exatamente como descrito anteriormente, mas que ao invés de tratamentos únicos foram combinados.

De modo geral, culturas de células em suspensão respondem rapidamente a fatores de estresses abióticos em comparação com plantas intactas. Deste modo, não foi analisado o crescimento celular, mas apenas as alterações na coloração das células de café.

3.3. Extração enzimática

Amostras de células de café (guardadas a -70°C) foram homogeneizadas em tampão 100 mM Na-fosfato, pH 7,0, contendo 5 mM de EDTA, 10 mM DTT, 0,2% de ácido ascórbico e PVPP (aproximadamente 10% do peso da amostra). O material foi colocado em homogeneizador do tipo Polytron por 2 vezes durante 5 seg cada, sendo colocados no gelo a cada intervalo. O homogeneizado foi centrifugado por 20 min a 15.000 g a 4°C e 2,5 mL do sobrenadante (extrato bruto) foi filtrado em coluna Sephadex G25-PD10 (Pharmacia) equilibrada previamente com tampão 25 mM Na-fosfato, pH 7,5, contendo 10% de glicerol. As proteínas foram eluídas da coluna com o mesmo tampão de equilíbrio e equilíbrio e aliquotas de 1,0 ml foram guardadas em eppendorf e armazenadas a -20°C para análises enzimáticas posteriores.

3.4. Determinação das atividades enzimáticas de SOD, CAT, GR e APX

A atividade total da SOD foi determinada segundo metodologia de Giannopolitis & Ries (1977), monitorando a atividade pelo aumento da absorbância a 560 nm por 1 h, com intervalos de leitura de 15 min.

A atividade da CAT foi determinada de acordo com Azevedo *et al.* (1998). A atividade da enzima foi monitorada pelo decréscimo da absorbância a 240 nm por 3 min, com intervalos de leitura de 15 seg, seguindo a decomposição de H₂O₂.

A atividade da GR foi determinada segundo Barata *et al.* (2000), monitorando-se a atividade enzimática pelo decréscimo da absorbância a 340 nm, por 3 minutos, com intervalos de leituras de 15 seg.

APX foi determinada segundo Nakano & Asada (1981) com algumas modificações. APX foi analisada em espectrofotômetro a 25°C em uma reação com tampão 50 mM Na-fosfato (pH 7,0), contendo 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de H₂O₂ (preparada imediatamente antes do uso) e 0,1 mM de ácido ascórbico. A reação foi iniciada após adição de 50 µl da amostra e a atividade enzimática foi monitorada pelo decréscimo da absorbância a 265 nm por 3 min, com intervalos de leituras de 15 s.

3.5. Determinação de proteínas

As concentrações de proteínas nos extratos foram determinadas de acordo com Bradford (1976), usando reagente pronto da Bio-Rad.

3.6. Análises estatísticas

Foram utilizadas 3 repetições por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan (DMRT), a 5% de probabilidade.

3.7. Obtenção dos ESTs do Genoma Café

O seqüenciamento do ESTs de café foi realizado no período de fevereiro de 2002 a outubro de 2003, sob a coordenação do Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café (CBP&D-Café) e executado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), tendo a participação da UNICAMP, USP, UNESP, UFV, UFLA, EPAMIG, INCAPER, IAPAR, IAC. A supervisão técnica do projeto foi do Dr. Luiz Vieira (IAPAR), do Dr. Carlos Colombo (IAC) e do Dr. Alan C. Andrade (EMBRAPA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividades de enzimas do sistema antioxidativo em células de café em suspensão

Diferentes respostas foram observadas em relação às atividades de enzimas antioxidativas em células de café em suspensão quando submetidas a estresses abióticos.

Após o tratamento com Cd, observou-se que as células em suspensão apresentavam coloração marrom-acinzentada, diferentemente da coloração branco-amarelada do controle. Isto ocorreu, provavelmente, devido a oxidação das células de café após tratamento com Cd. Fornazier *et al.* (2002a) observaram que após exposição à alta concentração de Cd, calos de *Saccharum officinarum* apresentavam coloração marrom-avermelhada, sugerindo ser o resultado da oxidação de células ao metal pesado ou, então, devido à formação de antocianinas.

As células de café tratadas com Cd apresentaram expressivo aumento da atividade total da SOD, quando comparadas com o controle (Figura 2), indicando que o metal pode ter induzido o estresse oxidativo. Como SOD é uma enzima chave na destoxificação de radical superóxido (Van Breusegem *et al.*, 2001), sugere-se que Cd, promovendo a ativação de SOD, diminui o excesso de $O_2^{\bullet-}$ e, conseqüentemente, tenta atenuar o efeito nocivo deste radical às células de café em suspensão.

Evidências indicam que Cd induz estresse oxidativo e, conseqüentemente, causa o aumento de ROS (Chaoui *et al.*, 1997), com o concomitante aumento de enzimas antioxidativas (Schickler & Caspi, 1999; Vitória *et al.*, 2001).

Cd pode inibir importantes enzimas de plantas, em particular as enzimas do Ciclo de Calvin (Van Assche & Clijsters, 1990), levando à diminuição ou inibição do crescimento vegetal.

Quando presente em excesso, Cd e outros metais pesados causam um descontrole de reações redox nas células, resultando na formação de ROS e peroxidação de lipídios (Dat *et al.*, 2000).

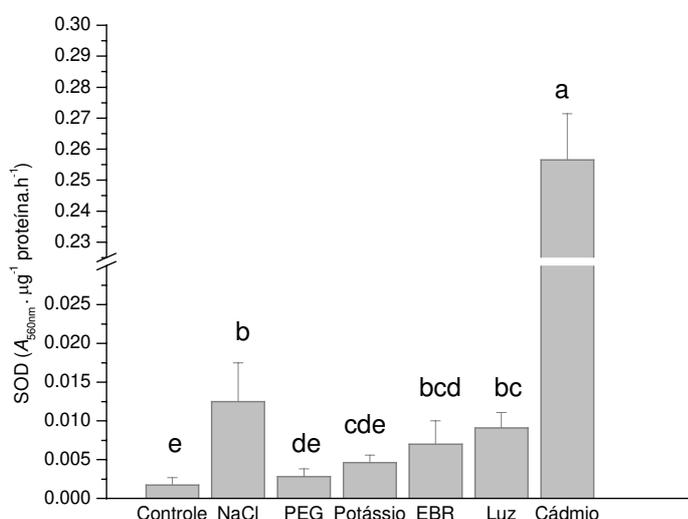


Figura 2. Atividade específica de SOD em células de café em suspensão. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Duncan. Barras = desvio padrão (n=3).

A presença de Cd nos solos naturais ocorre, geralmente, em baixa concentração, cerca de 0,01 a 30 µg/g. No entanto, solos utilizados para agricultura podem estar contaminados com Cd, provenientes da fertilização fosfatada e deposição de lodo no solo (Wagner, 1993). Deste modo, a concentração de 1 mM de CdCl₂ utilizada neste experimento pode ser alta em comparação às quantidades presentes em solos contaminados pelo metal pesado, porém, é apropriada para analisar o que ocorre em termos de tolerância de plantas ao Cd (Pereira *et al.*, 2002).

Vários trabalhos usaram alta concentração de Cd, como em plântulas de *Raphanus sativus* L. (Vitória *et al.*, 2001), cultura de calos de *S. officinarum* L. (Fornazier *et al.*, 2002a) e em espécies de *Thlaspi* que acumulam Cd (Lombi *et al.*, 2000).

Fornazier *et al.* (2002a) verificaram que em cultura *in vitro*, concentrações de 0,5 e 1 mM de CdCl₂ causavam inibição do crescimento de calos de *S. officinarum*, após 9 dias de exposição ao metal. No entanto, em plantas intactas, foram necessárias concentrações de 2 e 5 mM de CdCl₂ para inibição do crescimento (Fornazier *et al.*, 2002b), indicando que calos podem absorver Cd rapidamente em comparação a plantas intactas (Fornazier *et al.*, 2002a).

Embora alguns trabalhos relatem aumento da atividade da SOD após exposição ao Cd (Schickler & Caspi, 1999; Vitória *et al.*, 2001), a maioria mostra que a atividade da SOD diminui, ou não sofre alteração. Em plântulas de *S. officinarum* (Fornazier *et al.*, 2002b) e de *Glycine max* (Ferreira *et al.*, 2002), por exemplo, embora Cd também possa ter induzido estresse oxidativo, as atividades das isoenzimas de SOD não foram alteradas significativamente. Sugeriu-se que isto ocorreu porque a atividade da SOD era suficientemente alta para cobrir o aumento da concentração de ROS.

Cd também favoreceu uma tendência de aumento da atividade de CAT em células de café em suspensão (Figura 3), porém não se observou diferença significativa em relação ao controle em função do grande desvio observado. No entanto, este aumento pode ser suficiente para eliminar o excesso de H₂O₂ produzido pelo estresse oxidativo.

Cultura de calos de *S. officinarum* expostas a altas concentrações de CdCl₂ (0,5 e 1 mM), também exibiam aumento da atividade da CAT, sendo que o mesmo não foi observado quando utilizou-se baixas concentrações (0,01 e 0,1 mM de CdCl₂)

(Fornazier *et al.*, 2002a). Estes autores verificaram que CAT foi a principal enzima antioxidativa na remoção de H₂O₂ em calos de *S. officinarum*, diferente do observado em células de café em suspensão, na qual observou-se que a enzima SOD possui um papel significativo na destoxificação de ROS após exposição ao Cd (Figura 2).

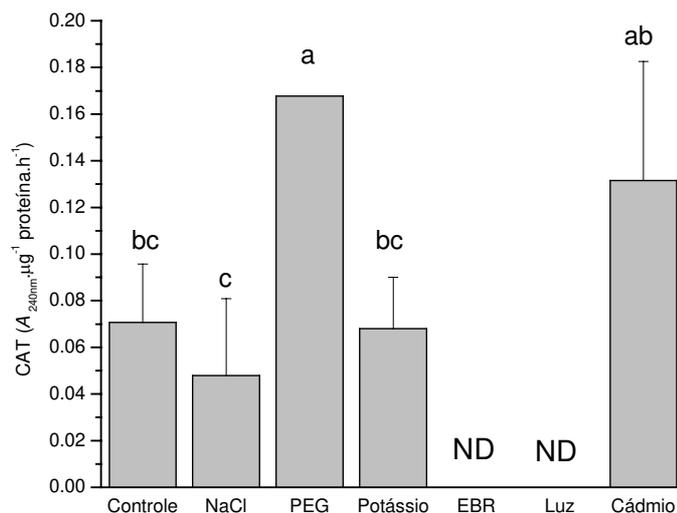


Figura 3. Atividade específica de Catalase em células de café em suspensão. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Duncan. Barras = desvio padrão ($n=3$). ND = atividade não detectada.

Vitória *et al.* (2001) também observaram que Cd induzia o aumento da atividade da CAT em folhas e raízes de *R. sativus*, sendo o aumento proporcional à concentração de CdCl₂. No entanto, outros trabalhos evidenciaram decréscimo na atividade da CAT mediante exposição ao Cd (Somashekariah *et al.*, 1992; Bhattacharjee, 1998).

De maneira similar à SOD, estes resultados indicam que a atividade da CAT pode ser dependente da dose, do tempo de exposição ao metal pesado e da espécie de planta estudada (Fornazier *et al.*, 2002b).

Neste trabalho, não foi detectada atividade da GR no tratamento com Cd (Figura 4), contrastando com os resultados de outros estudos que verificaram o aumento da atividade dessa enzima em plantas intactas, após a exposição ao Cd (Stroinski *et al.*, 1999; Vitória *et al.*, 2001). No entanto, outros trabalhos evidenciaram decréscimo na atividade da GR após tratamento com Cd (Gallego *et al.*, 1996, 1999; Vitória *et al.*, 2001).

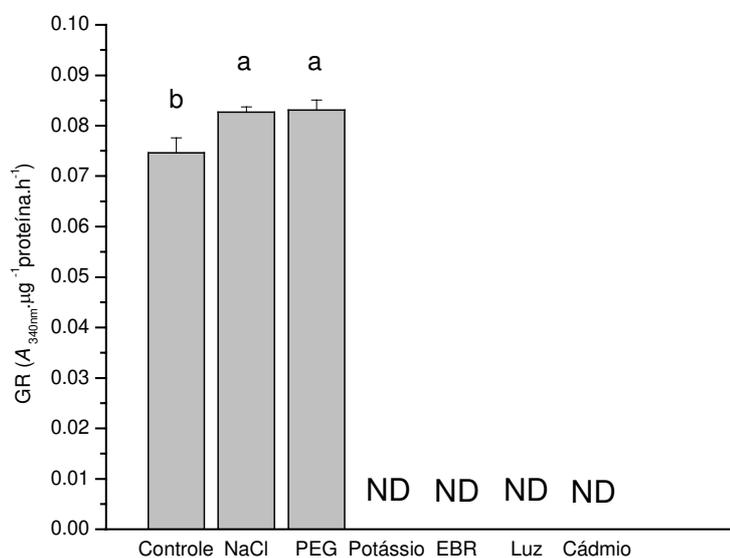


Figura 4. Atividade específica da GR em células de café em suspensão. Letras diferentes indicam significância a $p \leq 0,05$ pelo teste de Duncan. Barras = desvio padrão ($n=3$). ND = atividade não detectada.

As diferenças encontradas nas atividades de enzimas antioxidantes em vários trabalhos podem ser explicadas pelo fato que a capacidade antioxidante é muito dependente da severidade do estresse, como das espécies utilizadas e do estágio de desenvolvimento da planta (Mittler & Zilinskas, 1994).

Células de café em suspensão após tratamento com NaCl apresentaram coloração cinza-amarelada diferindo pouco do controle. Observou-se aumento significativo da atividade total da SOD (Figura 2) e da enzima GR (Figura 4) após

tratamento com NaCl em comparação com o controle. No entanto, não foi observada diferença significativa da atividade da CAT em relação ao controle (Figura 3). Provavelmente, a atividade desta enzima foi suficiente para cobrir o aumento da concentração de ROS produzido pela adição de NaCl. Por outro lado, alta concentração de íons Na^+ pode substituir íons Ca^{2+} da membrana e alterar a sua integridade (Nakamura *et al.*, 1992). Além disso, a atividade da CAT pode ser inibida por Na^{2+} (Rout & Shaw, 2001).

Gossett *et al.* (1994, 1996) mostraram que várias enzimas antioxidativas tinham suas atividades aumentadas em calos de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) tratados com NaCl. Estes mesmos autores (1994), estudando a atividade de enzimas antioxidativas em algodão, observaram que as diferenças de tolerância ao NaCl em relação às variedades estudadas foram similares tanto em planta inteira, como em cultura de calos. Isto suporta o argumento que o mecanismo de tolerância ao sal pode estar operando independente da estruturação celular (Smith & McComb, 1981). Tanto calos como plantas intactas de algodão apresentaram uma correlação positiva entre o aumento da atividade antioxidativa e a tolerância ao sal (Gossett *et al.*, 1994).

Manchandia *et al.* (1999) examinaram a resposta antioxidativa em calos de algodão em variedades sensíveis e tolerantes ao sal, submetidas a 250 mM de NaCl, uma concentração bastante elevada, por um período de 8 h. Estes autores verificaram aumento da atividade de enzimas antioxidativas em ambas variedades, sustentando a evidência de que um curto período de exposição ao estresse salino pode induzir rápida regulação do sistema antioxidativo.

A geração de ROS durante estresse salino é similar ao que ocorre com estresse hídrico, sendo atribuído, principalmente, ao declínio da fixação de CO_2 , o que leva a uma maior perda de elétrons (Dat *et al.*, 2000).

Alta concentração de sal diminui o potencial osmótico do solo expondo as plantas ao deficit hídrico. Além disso, pode haver interação do sal com nutrientes minerais presentes no solo, causando deficiência na nutrição vegetal (Saíram & Tyagi, 2004). Estresses por deficiência hídrica e por salinidade podem afetar diferentes mecanismos nas plantas, causando estresse osmótico e desbalanço iônico e, em adição, induzir o estresse oxidativo (Hasegawa *et al.*, 2000; Zhu, 2001). Como consequência, pode ocorrer diminuição no crescimento vegetal, afetando a produtividade da cultura.

Células de café em suspensão após tratamento com PEG não apresentaram alterações na coloração das células. Observou-se que o estresse osmótico ocasionado pela adição de PEG levou ao aumento significativo da atividade da CAT (Figura 3), porém não se observou alteração na atividade total da SOD (Figura 2) em relação ao controle. No entanto, semelhante ao que ocorreu no tratamento com NaCl, observou-se uma aumento significativo da GR (Figura 4) após adição de PEG.

O tratamento com PEG em células de café em suspensão estimulando a atividade da CAT, sugere a ocorrência de duas possíveis situações. A primeira é uma evidência indireta do aumento da fotorrespiração. No entanto, no presente caso, isto pode não ter ocorrido, pois as células permaneceram no escuro o tempo todo do experimento. Outra possibilidade indica uma destoxificação de ROS, uma vez que, mesmo CAT localizando-se apenas no peroxisomo (Buchanan *et al.*, 2000), é indispensável para a destoxificação de ROS durante condições de estresses. Além disso, estresse oxidativo causa proliferação de peroxisomos (Lopez-Huertas *et al.*, 2000).

Estresse hídrico pode alterar o balanço oxidativo das células e a aclimação à seca é geralmente correlacionada com a manutenção de níveis relativamente baixos de ROS, devido à ativação do sistema de defesa antioxidante (Dat *et al.*, 2000).

Lima *et al.* (2002), analisando o efeito do estresse oxidativo em dois clones de *Coffea canephora* submetidos a déficit hídrico, verificaram expressivo aumento da atividade total da SOD, particularmente no clone tolerante à seca (clone 120). Similar à SOD, aumento na atividade da CAT e APX foi maior no clone tolerante do que no clone sensível a seca (Clone 109 A). Também foi observado aumento da peroxidação lipídica no clone sensível, estimada através da quantificação de malondialdeído (Lima *et al.*, 2002), o que suporta a idéia que o déficit hídrico pode ocasionar danos à integridade da membrana (Lima *et al.*, 2002; Sairam & Tyagi, 2004).

Células de café em suspensão após tratamento com potássio (KCl) apresentaram coloração cinza-amarelada, diferindo pouco do controle. Foram detectadas atividades das enzimas antioxidativas SOD (Figura 2) e CAT (Figura 3) no tratamento com K, porém, não foi observada diferença significativa em relação ao controle. Além disso, neste tratamento não se detectou atividade da enzima GR (Figura 4). Estes resultados sugerem que embora o tratamento com K possa ter induzido o aumento da produção de ROS, o sistema de defesa antioxidativo das células de café em suspensão foram suficientes para cobrir um possível aumento de radicais.

O nível de potássio no meio MS (Murashige & Skoog, 1962) é de 20 mM, logo, o tratamento de 100 mM de KCl representa uma quantidade 5 vezes maior de K adicionado ao meio de cultura. A finalidade de se tratar células de café em suspensão com alta concentração de K se justifica pelo fato de alguns estudos terem

indicado que este nutriente mineral poderia conferir maior tolerância ao frio em cafeeiros expostos a geadas (Triller *et al.*, 2004).

Baixas temperaturas podem induzir o estresse oxidativo em plantas (Prasad *et al.*, 1994) e alterar as atividades de enzimas antioxidativas. Lee *et al.* (2004) estudando o efeito de baixa temperatura em folhas de *Cucumis sativus* L. verificaram alta atividade de SOD, APX e GR, porém CAT teve atividade diminuída. Takac *et al.* (2003) também verificaram que a exposição de raízes e folhas de *Zea mays* L. a baixas temperaturas induzia mudanças nas atividades de enzimas antioxidativas.

Células de café em suspensão submetidas ao tratamento com luz não apresentaram alterações na coloração e não foram detectadas atividades das enzimas CAT (Figura 3) e GR (Figura 4). No entanto, observou-se um aumento significativo da atividade total da SOD (Figura 2). Provavelmente, peroxidases estariam envolvidas na remoção do H₂O₂ produzido.

Muitas plantas superiores submetidas à alta irradiância sofrem inibição da fotossíntese devido à incapacidade dos tecidos clorofilados de dissipar o excesso de energia radiante, resultando em fotoinibição (Osmond, 1981; Long, 1983).

Oliveira (2000) estudou o efeito fisiológico da fotoinibição em cafeeiro (*C. arabica* L.) e verificou que em plantas jovens expostas à densidade de fluxo de fótons de 2.500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$, após tratamento a 10°C, não houve grande perda na eficiência quântica do Fotossistema II em relação ao controle (25°C). No entanto, a capacidade de recuperar plenamente a atividade fotossintética, foi significativamente menor, caracterizando a ocorrência da fotoinibição.

Ali *et al.* (2004) investigaram o efeito de diferentes intensidades luminosas sob atividades de enzimas antioxidativas durante aclimação de plântulas micropropagadas de *Phalaenopsis*. Estes autores verificaram que alta intensidade luminosa (300 μmol fótons/ $\text{m}^2\cdot\text{s}$) favoreceu o aumento da atividade da SOD, CAT, GST, MDHAR e GR em folhas e raízes. Este aumento da SOD e CAT indicou uma aclimação das plântulas e revelou certa proteção contra a foto-oxidação, que resultaria em fotoinibição (Ali *et al.*, 2004). Além disso, a geração de ROS também foi verificada pelo aumento da peroxidação lipídica (Ali *et al.*, 2004). Vários outros trabalhos também evidenciaram que alta intensidade luminosa causa danos à integridade da membrana (Bailly *et al.*, 1996).

O mesmo que foi observado no tratamento com luz, também foi relatado no tratamento com EBR em células de café em suspensão, no qual verificou-se um aumento significativo da atividade da SOD (Figura 2), porém não foi detectada a atividades de CAT (Figura 3) e GR (Figura 4) e as células mantiveram uma coloração amarelada/esbranquiçada do controle. O H_2O_2 produzido, provavelmente, poderia estar sendo eliminado por peroxidases. Deve-se esclarecer aqui que o tratamento com EBR não é um estresse de fato, mas vários trabalhos têm indicado que brassinosteróides tem a capacidade de ativar enzimas do sistema antioxidativo de plantas, protegendo-as contra os efeitos deletérios de ROS. Por isto foi incluído nos tratamentos.

Mazorra & Núñez (2000) e Mazorra *et al.* (2002) mostraram que os efeitos de brassinosteróides e análogos sobre atividade antioxidativa eram dependentes da concentração utilizada na resposta de sementes germinando e plântulas de arroz e tomate. Núñez *et al.* (2003) verificaram ainda, que o estágio de desenvolvimento, a

concentração e o tempo de aplicação de brassinosteróides são parâmetros importantes para estudar o efeito deste regulador de crescimento nas plantas.

Vários trabalhos mostraram que brassinosteróides podem alterar a capacidade antioxidativa das plantas sob condições de estresses (Dhaubhadel *et al.*, 1999; Mazorra *et al.*, 2002; Núñez *et al.*, 2003). Este regulador de crescimento possui um papel fundamental da proteção de plantas contra estresses ambientais.

Discos foliares de tomate pré-incubados por 24 horas em solução contendo 24-epibrassinolideo (EBR) ou um brassinosteróide análogo (MH5) em duas concentrações (10,60 e 2,12 η M), seguido de incubação em alta temperatura (40°C), resultaram em aumento da atividade da SOD (Mazorra *et al.*, 2002). Foi sugerido que EBR e MH5 possuem um papel importante na redução de dano celular provocado pelo estresse de temperatura (Mazorra *et al.*, 2002).

Núñez *et al.* (2003) também demonstraram que tratamento de plântulas de arroz crescidas *in vitro* com brassinosteróide análogo (BB-16) estimulou as atividades de enzimas antioxidativas sob condições de salinidade. Özdemir *et al.* (2004) verificaram ainda que plântulas de arroz tratadas com 24-epibrassinolideo (3 μ M), aumentaram a tolerância ao estresse salino. Neste caso, foi utilizada uma concentração alta de EBR.

Em todos os tratamentos com as células em suspensão com café não foi detectada a atividade da enzima APX (dados não mostrados).

As mudanças das condições fisiológicas causadas por fatores que alteram um equilíbrio em cultura de tecidos vegetais, propiciam alterações nas características das células *in vitro* (Gaspar *et al.*, 2002). Algumas particularidades destas células

precisam ser consideradas quando analisamos o que ocorre em relação às enzimas antioxidativas em células vegetais cultivadas *in vitro*.

Células vegetais *in vitro* podem ser deficientes na diferenciação da parede celular, normalmente causada pela falha na lignificação. São também deficientes na diferenciação dos cloroplastos e exibem pouca clorofila e poucos compostos contendo tetrapirrólicos (Bibis *et al.*, 2000). Ambas diferenças são relacionadas com a falha na biossíntese de porfirinas devido a deficiência da via de α -cetoglutarato para formação de ácido succínico (Gaspar *et al.*, 2002). Isto favorece o acúmulo de poliaminas (Bisbis *et al.*, 2000) e, conseqüentemente, aumenta a produção de H_2O_2 decorrente de sua degradação.

Tetrapirrólicos, particularmente os grupamentos heme, estão presentes nas plantas como componentes das peroxidases, catalases, citocromos e clorofilas (Hendry, 1999). Deste modo, a falta de atividade da APX em cultura de células de café pode estar associada, provavelmente, a deficiência na biossíntese de compostos tetrapirrólicos. Além disso, o principal local de atividade da APX é o cloroplasto (Schützendübel *et al.*, 2001), organela pouco presente nas células em cultura utilizadas.

4.2. ESTs de enzimas antioxidativas em bibliotecas do projeto Genoma Café

Em função dos resultados obtidos com enzimas antioxidantes e estresses impostos a células de café em suspensão e à disponibilidade do projeto Genoma Café, foram feitas prospecções no banco de dados EST deste projeto. Para isto, destacaremos os dados das bibliotecas CB1 e CS1. A biblioteca CB1 foi feita a partir de mRNA de células em suspensão que foram tratadas com Bion e EBR e a biblioteca CS1, de células tratadas com manose, KCl e NaCl (Tabela 1). Para

obtenção dos ESTs com similaridade para estas enzimas, foi dada busca no banco (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>) utilizando o nome ou parte do nome das enzimas. Uma vez que os ESTs haviam sido comparados com seqüências depositadas em banco público de dados (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), pode-se quantificar o número de seqüências similares.

Verificou-se que em CS1 a quantidade de ESTs de todas as enzimas SOD foi 3, não havendo diferença entre as metaloproteínas (Figura 5). Três diferentes classes de SODs são detectadas em plantas, sendo classificadas de acordo com os cofatores Mn, Fe e Cu/Zn (Alscher *et al.*, 1997).

Se compararmos com o sistema de defesa antioxidativo “tradicional” (enzimas diretamente associadas ao sistema de defesa contra ROS) observaremos que a maior quantidade de ESTs na biblioteca CS1 foi registrado para glutathione peroxidase (GPx), apresentando 9 ESTs, seguida de APX e CAT, com 5 e 4 ESTs, respectivamente (Figura 6).

De certa forma, os resultados de ESTs das enzimas SOD e CAT na biblioteca CS1 assemelham-se com o apresentado anteriormente para o tratamento de estresse salino em células de café em suspensão (Figura 2 e 3). No entanto, difere do resultado apresentado para a enzima APX, uma vez que para esta enzima foi relatado ESTs na biblioteca CS1 (Figura 6), porém a sua atividade não foi detectada nos tratamentos com estresses abióticos. Além disso, GR apresentou certa atividade após exposição a NaCl (Figura 4), porém foram encontrados poucos ESTs de GR na biblioteca CS1 (Figura 6). Estas diferenças podem ser devidas ao fato de que as células do genoma café terem sido tratadas com mais de um estresse por vez.

Tabela 1. Identificação das bibliotecas de cDNA produzidas para o sequenciamento de ESTs no projeto Genoma Café. Bibliotecas provenientes de calos e células de café em suspensão.

Nomenclatura	Identificação
BP1	Células em suspensão, raiz e folha com Bion
CA1	Calo não embriogênico
CB1	Células em suspensão com Bion e EBR
EA1	Calo embriogênico de <i>Coffea arabica</i>
EC1	Calo embriogênico de <i>Coffea canephora</i>
CS1	Células em suspensão com Manose, NaCl e KCl
PC1	Linhagem não embriogênica (folha <i>C. arabica</i>) com indução por 2,4-D
IC1	Linhagem não embriogênica (folha <i>C. arabica</i>) sem indução por 2,4-D
IA2	Linhagem embriogênica (folha <i>C. arabica</i>) com indução por 2,4-D
RT8	Raíz e células em suspensão com Alumínio

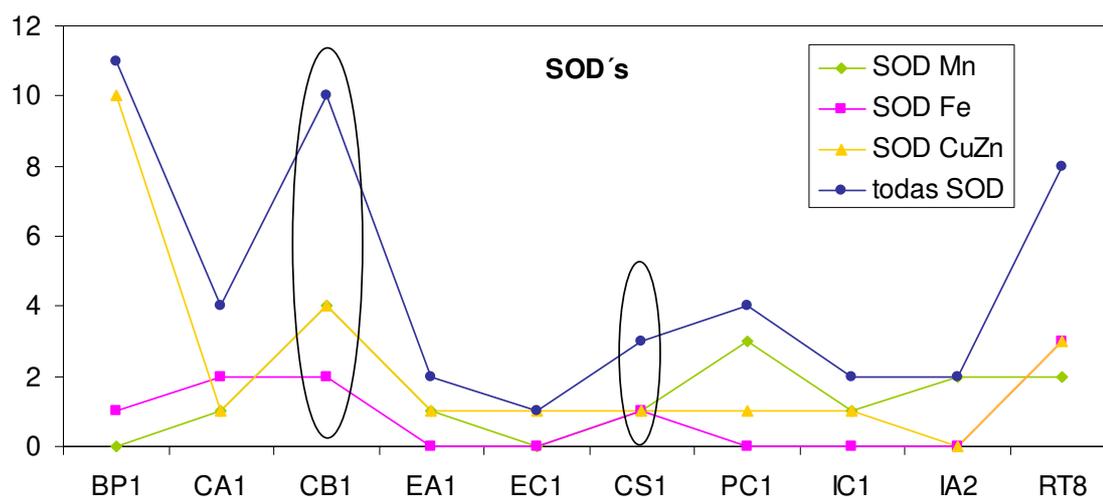


Figura 5. Quantidade de seqüências similares de ESTs das 3 classes da enzima Superóxido dismutase (SOD) nas bibliotecas do projeto Genoma Café. Bibliotecas provenientes de calos e células de café em suspensão. No destaque (círculo) células de café em suspensão tratadas com EBR (CB1) e NaCl (CS1). Ver nomenclatura tabela 1.

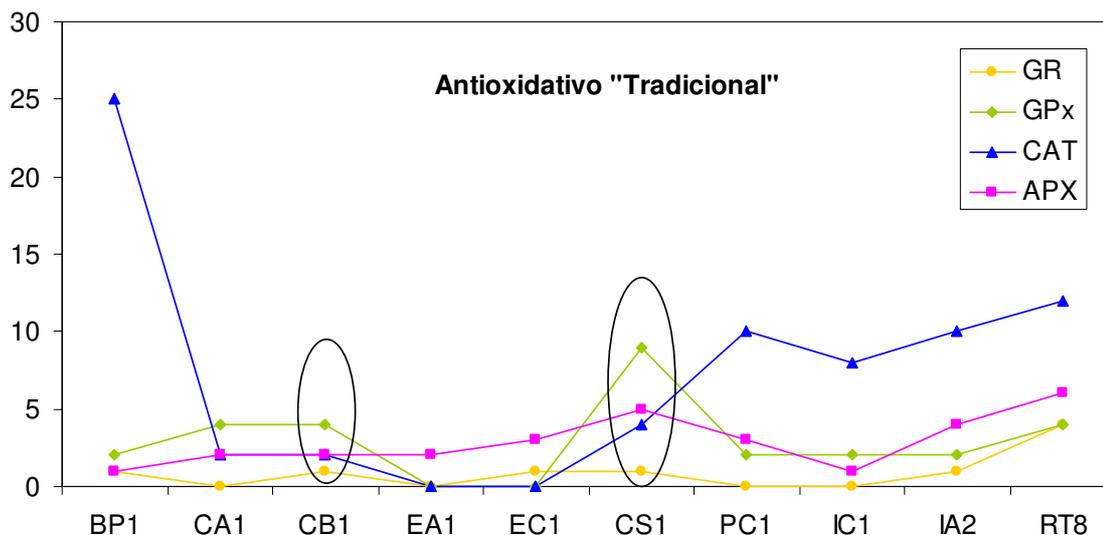


Figura 6. Quantidade de seqüências similares (ESTs) de enzimas envolvidas no sistema de defesa antioxidativo “tradicional” nas bibliotecas do projeto Genoma Café. Bibliotecas provenientes de calos e células de café em suspensão. No destaque (círculo) células de café em suspensão tratadas com EBR (CB1) e NaCl (CS1). Ver nomenclatura tabela 1. GR (Glutathione redutase), GPx (Glutathione peroxidase), CAT (Catalase), APX (Ascorbate peroxidase).

Verificou-se ainda que em CB1 a quantidade de ESTs de todas as enzimas SOD foi 10, sendo que, SOD-Cu/Zn e SOD-Mn tiveram maior quantidade de seqüências similares em células de café em suspensão tratadas com EBR (Figura 5). Em plantas, SOD-Cu/Zn é mais abundante em relação as três metaloproteínas (Alscher *et al.*, 1997). Enquanto a Fe-SOD não têm sido encontrada em todas as plantas cultivadas (Azevedo *et al.*, 1998).

No sistema de defesa antioxidativo tradicional na biblioteca CB1, a maior quantidade de seqüências similares foi registrado na enzima Glutathione peroxidase (GPx), apresentando 4 ESTs. Porém, poucos ESTs foram verificados para GR, CAT e APX (Figura 6).

Na biblioteca CB1, se confrontarmos os resultados de ESTs da enzima SOD com o tratamento com EBR em células de café em suspensão, verificaremos uma similaridade de dados. Além disso, apesar de CAT (Figura 3), GR (Figura 4) e APX

não terem sido detectadas em tratamento com EBR, estas enzimas apresentaram valores muito baixos de ESTs na biblioteca CB1 (Figura 6).

Exceto 1 e 3 ESTs para fitoquelatina sintetase, em CS1 e CB1, respectivamente, e 1 ESTs para GLS em CB1, observou-se ausência de ESTs das outras enzimas relacionadas com a síntese de glutathiona (L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina; GSH) (Figura 7).

Células de plantas contêm consideráveis quantidades de tióis, os quais são importantes antioxidantes e também estão envolvidos na inativação e ativação de enzimas (Foyer *et al*, 1997). GSH é o tiol de baixo peso molecular presente em plantas em maior quantidade (Alscher, 1989). Evidências indicam que GSH possui um papel central no sistema de defesa antioxidativo de plantas atuando como antioxidante na destoxificação de compostos tóxicos pela ação da glutathiona S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) (Foyer *et al.*, 1997).

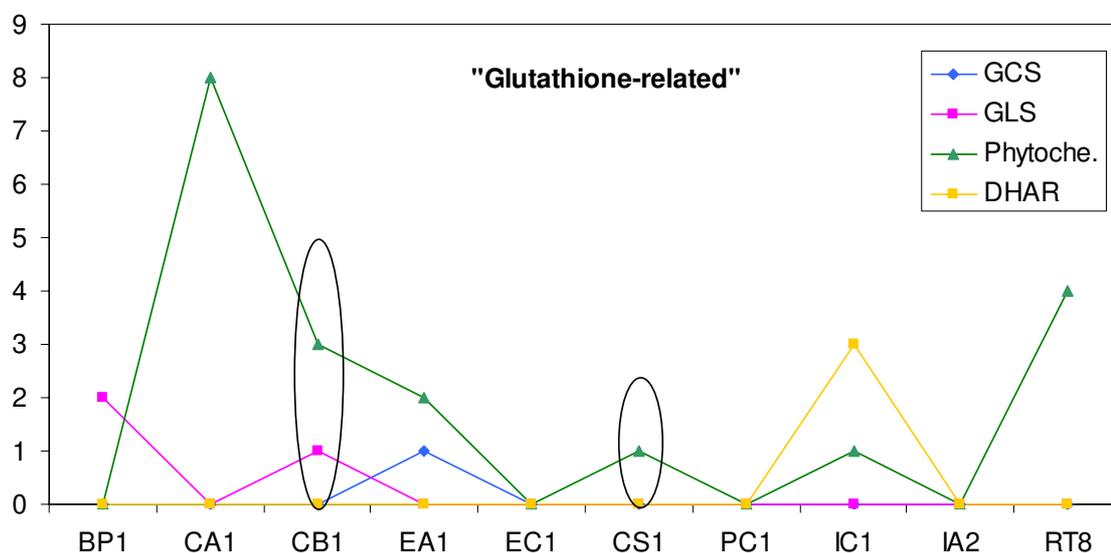


Figura 7. Quantidade de seqüências similares (ESTs) de enzimas relacionadas com a síntese de glutathiona nas bibliotecas do projeto Genoma Café. Bibliotecas provenientes de calos e células de café em suspensão. No destaque (círculo) células de café em suspensão tratadas com EBR (CB1) e NaCl (CS1). Ver nomenclatura tabela 1. GCS (Glutathiona cisteína ligase), GLS (Glutathiona sintetase), Phytoche (fitoquelatina sintetase); DHAR (deidroascorbato redutase).

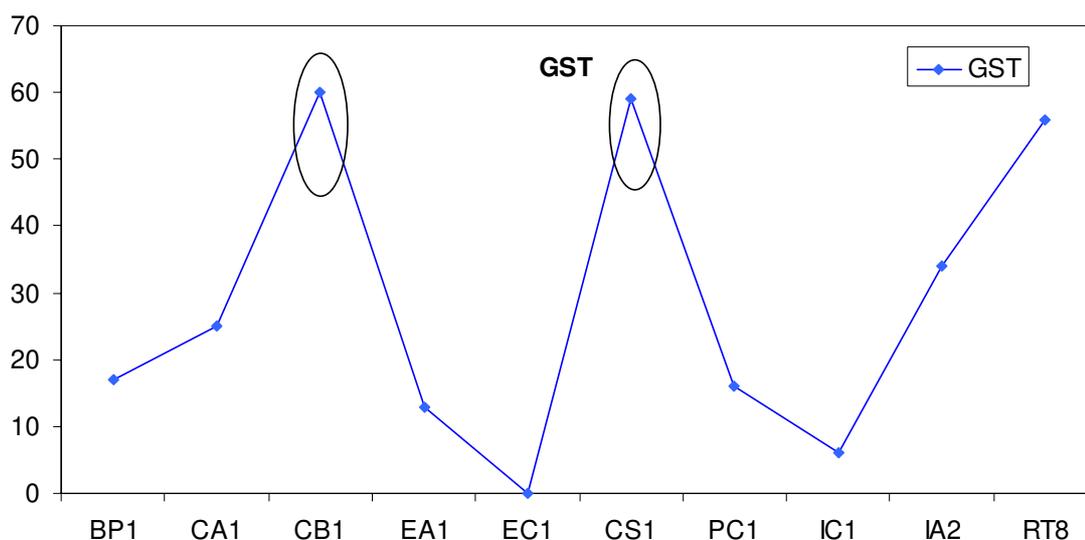


Figura 8. Quantidade de seqüências similares (ESTs) de Glutathione S-transferase nas bibliotecas do projeto Genoma Café. Bibliotecas provenientes de calos e células de café em suspensão. No destaque (círculo) células de café em suspensão tratadas com EBR (CB1) e NaCl (CS1). Ver nomenclatura tabela 1.

GST é uma enzima que cataliza a conjugação de GSH a uma variedade de compostos hidrofóbicos contendo um centro eletrofílico e protege macromoléculas e membranas das células de moléculas tóxicas (Ali *et al.*, 2004). GST em plantas possui um papel central na inativação de compostos tóxicos, conferindo por exemplo, tolerância a vários herbicidas. GST também protege as plantas contra várias condições ambientais desfavoráveis, como ataque de patógenos, pesticidas, estresse oxidativo e toxicidade por metal pesado (Marrs, 1996).

Observou-se uma expressiva quantidade de ESTs da enzima GST nas bibliotecas CS1, CB1 e RT8 (Figura 8), provavelmente, devido a geração de estresse oxidativo. Condições que geram estresse oxidativo podem ativar genes codificando para GST, através da produção de H_2O_2 (Marrs, 1996). Em resposta a danos nos tecidos e agentes indutores de estresses, são gerados ROS podendo iniciar o processo de peroxidação lipídica e danos no DNA. ROS como H_2O_2 induzem a ativação de GST e esta enzima possui o papel fundamental de metabolizar os

produtos tóxicos gerados pelo dano oxidativo e, por meio disso, proteger as células contra estresses oxidativos. (Marrs, 1996).

Vale notar que em CB1, a quantidade de ESTs de GST foi três vezes maior que na biblioteca BP1 (Células em suspensão, raiz e folhas tratadas com Bion). Isto sugere que na biblioteca CB1, a ativação de GST foi decorrente da presença de EBR e não de Bion na suspensão celular.

Vale ressaltar ainda, que na biblioteca IA2 verificamos uma quantidade seis vezes maior de ESTs da enzima GST em comparação com a biblioteca IC1 (Figura 8). Neste caso, provavelmente, a auxina 2,4-D presente em IA2 induziu a expressão de genes GST.

GPx (Glutathione peroxidase) também participa da remoção de H_2O_2 das células vegetais. No entanto, observaram-se poucos ESTs da enzima GPx em quase todas as bibliotecas analisadas (Figura 6).

Glutathione reductase (GR), que promove o fornecimento de glutathione reduzida (GSH) para as células, apresentou valores baixos de ESTs em todas as bibliotecas analisadas (Figura 6). Acompanhando estes resultados, também observaram-se nenhum ou poucos ESTs da enzima DHAR na totalidade das bibliotecas (Figura 7)

Para o funcionamento do mecanismo antioxidante que utiliza ascorbato, precisa-se de um fornecimento de ascorbato reduzido. A regeneração de ascorbato reduzido pode ser catalizada tanto por MDHR dependente de NADH, ou por DHAR dependente de glutathione reduzida (GSH), acoplada com a atividade da GR (Buchanan *et al.*, 2000).

Deste modo, os valores baixos de ESTs das enzimas GR e DHAR sugerem um comprometimento do sistema de acoplamento redox glutathione-ascorbato.

Além disso, observou-se ainda poucos ESTs das enzimas glutathione sintetase (GLS: EC 6.3.2.3) e glutathione cysteine ligase (GCS) em todas as bibliotecas analisadas (Figura 7). Vale notar que GSH é sintetizada a partir de duas vias. A primeira catalizada pela ação de γ -glutamylcysteine sintetase (γ -ECS: EC 6.3.2.2) e a segunda, catalizada pela GLS.

Observou-se que a biblioteca BP1 apresentou cerca de 11 ESTs de todas as SODs (Figura 5), acompanhada também de uma expressiva quantidade de ESTs da enzima CAT (Figura 6). Em menor proporção, o mesmo também foi observado na biblioteca RT8 (Figuras 5 e 6).

SODs são consideradas enzimas importantes dentro do sistema de defesa antioxidativo, pois eliminam radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) numa reação que produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Buchanan *et al.*, 2000; Van Breusegem *et al.*, 2001). A eliminação de H_2O_2 pode ser realizada pela CAT. Deste modo, a alta atividade das SODs nas bibliotecas BP1 e RT8, pode ter resultado na formação de H_2O_2 e, conseqüentemente, ter induzido a atividade da CAT para remoção do excesso de ROS presente.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diferentes respostas foram observadas nas células de café em suspensão submetidas a estresses abióticos em relação às atividades de enzimas antioxidativas. Ficou evidente que a adição de cádmio provocou expressivo aumento da atividade da SOD, porém atividade de GR não foi detectada. Por outro lado, atividade de GR teve aumento nos tratamentos com NaCl e PEG. A atividade da enzima APX não foi detectada em células de café em suspensão, provavelmente devido a algumas características particulares destas células cultivadas *in vitro*, tais como falha na biossíntese de compostos tetrapirrólicos e deficiência na diferenciação de cloroplastos, organela em que se localiza a enzima APX. Cabe esclarecer que as células permaneceram no escuro durante todo período de cultivo.

A atividade e expressão de genes que codificam enzimas antioxidativas podem sofrer alterações mediante condições ambientais desfavoráveis. Assim, o projeto genoma café possibilita a identificação de seqüências similares de ESTs de café e abre perspectivas, por exemplo, para uma melhor compreensão dos fatores que controlam a atividade das enzimas relacionadas ao sistema de defesa antioxidativo em plantas. Futuramente, os resultados obtidos de ESTs de enzimas antioxidativas em bibliotecas do projeto Genoma Café e dos estresses abióticos em células de café em suspensão poderão ser aplicados no melhoramento de plantas de cafeeiro, para a seleção de plantas mais tolerantes às variações do meio ambiente, por exemplo. Porém, um passo importante a ser dado, utilizando os dados de ESTs, é comparar separadamente os estresses *in vitro* e em plantas inteiras. Através da análise da expressão de genes poderá ser validado o uso de células em suspensão como um modelo para o estudo da tolerância a estresses nesta cultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, M.B., Hahn, E-J. & Pack, K-Y., 2004. Effects of light intensities on antioxidant enzymes and malondialdehyde content during short-term acclimatization on micropropagated *Phalaenopsis* plantlet. *Envir. Exp. Bot.* No prelo.
- Alscher, R.G., 1989. Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol. Plant.* 77:457-464.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L. & Cramer, C.L., 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiol. Plant.* 100:224-233.
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J. & Lea, P.J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant.* 104:280-292.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F. & Dôme, D., 1996. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seed as related to deterioration during accelerated aging. *Physiol. Plant* 97:104-110.
- Barata, R.M., Chapparro, A., Chabregas, S.M., Gonzalez, R., Labate, C.A., Azevedo, R.A., Sarath, G., Lea, P;J. & Silva-Filho, M.C., 2000. Targeting of the soybean leghemoglobin to tobacco chloroplasts: Effects on areobic metabolism in transgenic plants. *Plant. Sci.*155:193-202.
- Bisbis, B., Wagner, A.M., Kevers, C. & Gaspar, T.H., 2000. A comparison of respiratory pathways in fully habituated and normal non-organogenic sugarbeet callus. *J. Plant Physiol.* 156:312-318.

- Bhattacharjee, S., 1998. Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. *Biol. Plant.* 40:131-135.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., & Jones, R.L., 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Maryland, 1367p.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H. & El Ferjani, E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxydation and effects on antioxidant enzymes activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant sci.* 127:139-147.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life. Sci.* 57:779-795.
- Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, K.F. & Krishna, P., 1999. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant Mol. Biol.* 40:333-342.
- Ferreira, R.R., Fornazier, R.F., Vitória, A.P., Lea, P.J. & Azevedo, R.A., 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *J. Plant Nutr.* 25:327-342.
- Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Smith, J., Lea, P.J. & Azevedo, R.A., 2002a. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 71:125-131.

- Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Pereira, Vitória, A.P., Molina, S.M.G., Lea, P.J. & Azevedo, R.A., 2002b. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biol. Plant.* 45:91-97.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F. & Scott, I.A., 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100:241-254.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P. & Tomaro, M.L., 1996. Effect of heavy metal ions on sunflower leaves: Evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.* 121:151-159.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P. & Tomaro, M.L., 1999. Effect of cadmium ions on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Biol. Plant.* 42:49-55.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F. & Dommes, J., 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Reg.* 37:263-285.
- Giannopolitis, C.N. & Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutase 1. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59:309-314.
- Gossett, D.R., Millhollon, E.P., Lucas, M.C., Banks, S.W. & Marney, M.M., The effects of NaCl on antioxidant enzyme activities in callus tissue of salt tolerant and salt sensitive cotton cultivars (*Gossypium hirsutum* L.), 1994. *Plant Cell Rep.* 13:498-503.
- Gossett, D.R., Banks, S.W., Millhollon, E.P. & Lucas, M.C., 1996. Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine, and exogenous glutathione. *Plant Physiol.* 112:803-809.

- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. & Bohnert, H.J., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Molc. Biol.* 51: 463-499.
- Hendry, G.A.F., 1999. Plant pigments. IN: *Plant Biochemistry and Molecular Biology* (P.J. Lea and R.C. Leegood, eds.), 2nd Edition, John Wiley & Sons Ltd., England, pp.219-234.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I., 1938. The water culture method of growing plants without soil. *California Agric. Exp. Station, Bull.* 347:1-39.
- Lee, M.A., Chun, H.S., Kim, J.W., Lee, H., Lee, D.H. & Lee, C.B., 2004. Changes in antioxidant enzyme activities in detached leaves of cucumber exposed to chilling. *J. Plant Biol.* 47 (2): 117-123.
- Lima, A.L., DaMatta, F.M., Pinheiro, H.A., Tolola, M.R. & Loureiro, M.E., 2002. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Envir. Exp. Bot.* 47:239-247.
- Lombi, E., Zhao, F.J., dunham, S.J. & McGrath, S.P., 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phyto.* 145:11-20.
- Long, S.P., 1983. C₄ photosynthesis at low temperatures. *Plant Cell Environ.* 6:345-363.
- Lopez-Huertas, E., Charlton, W. L., Jonson, B., Graham, I.A., Baker, A., 2000. Stress induce peroxisome biogenesis genes. *EMBO J.* 19:6770-6777.
- Manchandia, A.M., Banks, S.W., Gossett, D.R., Bellaire, B.A., Lucas, M.C. & Millhon, E.P., 1999. The influence of alpha-amanitin on the NaCl induced up regulation of antioxidant enzyme activity in cotton callus tissue. *Free Rad. Res.* 30:429-438.

- Marrs, K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:127-158.
- Mazzora, L.M. & Núñez, M., 2000. Brassinosteroid analogues differentially modify peroxidase activity, superoxide dismutase activity and protein content in tomato seedlings. *Cult. Trop.* 21:29-34.
- Mazzora, L.M., Núñez, M., Hechavarria, M., Coll, F. & Sánchez-Blanco, M.J., 2002. Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Biol. Plant.* 45:593-596.
- Mitter, R. & Zilinskas, B.A., 1994. Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought. *Plant J.* 5:397-405.
- Murashige, C. & Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nakamura, Y., Kasamo, K., Shimosato, N., Sakata, M. & Obata, I., 1992. Stimulation of the extrusion of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact Mung Bean roots under high NaCl stress and its relation to external levels of Ca²⁺ ions. *Plant Cell Physiol.* 33:139-149.
- Nakano, Y. & Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22:867-880.
- Neuenschwander, B. & Baumann, T.W., 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 10:608-612.
- Núñez, M., Mazzafera, P., Mazorra, L.M., Siqueira, W.J. & Zullo, M.A.T., 2003. Influence of brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. *Biol. Plant.* 47:67-70.

- Oliveira, J.G., 2000. Efeitos fisiológicos da fotoinibição da fotossíntese em plantas jovens de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, São Paulo. 165 p.
- Osmond, C.B., 1981. Photorespiration and photoinhibition:some implications for the energetics of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 639:77-98.
- Özdemir, F., Bor, M., Demiral, T. & Türkan, Í., 2004. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Reg.* 42:203-211.
- Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Lea, P.J. & Azevedo, R.A., 2002. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. *Plant Soil* 239:123-132.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A. & Stewart, C.R., 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* 6:65-74.
- Rout, N. P. Shaw, B.P., 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes: possible involvement of the antioxidative enzymes. *Plant Sci.* 160:415-423.
- Sairam, R.K. & Tyagi, A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* 86:407-421.
- Schickler, H. & Caspi, H., 1999. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiol. Plant.* 105:39-44.
- Schützendübel, A., Schwanz, p., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L. & Polle, A., 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative

- systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiol.* 127:887-898.
- Sgherri, C.L. & Navari-Izzo, F., 1995. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: Oxidative stress and defense mechanisms. *Physiol. Plant.* 93:25-20.
- Smith, M.K. & McComb., 1981. Effects on NaCl on the growth of whole plants and their corresponding callus cultures. *Aust. J. Plant. Physiol.* 8:267-275.
- Somashekariah, B.V., Padmaja, K. & Prasad, A.R.K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*) involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiol. Plant.* 85:85-89.
- Stroinski, A., Kubis, J. & Zielezinska, M., 1999. Effect of cadmium on glutathione reductase in potato tubers. *Acta Physiol. Plant.* 21:201-207.
- Stevens, R.G., Creissen, G.P. & Mullineaux, P.M., 1997. Cloning and characterisation of cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Mol. Bio.* 35:641-654.
- Takac, T., Luxova, M. & Gasparikova, O., 2003. Cold induced changes in antioxidant enzymes activity in roots and leaves of two maize cultivars. *Biologia* 58: 875-880.
- Triller, C.F., Sera, T., Mata, J.S., Petek, M. & Azevedo, J. A., 2004. Resistência à geada de diferentes espécies de café. <http://www.Coffeebreak.com.br>
- Van Assche, F. & Clijsters, H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant cell Environ.* 13:195-206.
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J.F. & Inzé, D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161:404-414.

- Vitória, A.P., Lea, P.J. & Azevedo, R.A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochem.* 57:701-710.
- Wagner, G.J., 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron.* 51:173-212.
- Zhu, J.H., 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:66-71.

ANEXO 1

Tabela 1. Composição de sais do meio MS (Murashige & Skoog, 1962).

Concentração de componentes mg.l⁻¹	
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
FeEDTA	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Vitaminas	
Ácido nicotínico	0,5
Piridoxina. HCl	0,5
Tiamina. HCl	0,1
Glicina	2,0
Mio-inositol	100
Sacarose	30.000