

ANA LÚCIA DA SILVA LIMA

RESPOSTAS FOTOQUÍMICAS E ATIVIDADE DO SISTEMA ANTIOXIDATIVO
EM DOIS CLONES DE *Coffea canephora* SOB CONDIÇÕES DE DÉFICE
HÍDRICO

2

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Fisiologia Vegetal,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL

2001

A Deus.

Aos meus pais, Lúcia e Valdemir.

Aos meus irmãos, Marcos, Angela e César.

Ao meu noivo, Fábio.

Pegadas na Areia

"Uma noite tive um sonho...

Sonhei que estava andando na praia, com o Senhor, e através do Céu passavam cenas da minha vida.

Para cada cena que se passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era o meu e o outro era do Senhor.

Quando a última cena da minha vida passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes no caminho da minha vida havia apenas um par de pegadas na areia.

Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso entristeceu-me deveras, e perguntei então ao Senhor:

"Senhor, Tu me dissestes que, uma vez que eu resolvi Te seguir, Tu andarias sempre comigo todo o caminho mas, notei que durante as maiores atribuições do meu viver havia na areia dos caminhos da vida, apenas um par de pegadas. Não compreendo por que, nas horas que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixastes".

O Senhor me respondeu:

*"Meu precioso filho, **Eu** fe amo e jamais te deixaria nas horas da tua prova e do teu sofrimento. Quando vistes na areia apenas um par de pegadas, foi exatamente aí que **Eu**, nos braços... te carreguei".*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café, pelo apoio financeiro.

À Empresa Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural, pelo fornecimento das mudas.

Ao professor Fábio **Murilo** Da Matta, pela orientação.

Aos professores Marcos Rogério Tótola, Marcelo Ehlers Loureiro, Paulo Roberto Mosquim e Raimundo Santos Barros, pelas críticas e sugestões.

A todos os demais professores do curso de Pós-graduação em Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos.

Ao professor Leandro Ferreira de Aguiar, da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, pela amizade e confiança.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANA LÚCIA DA SILVA LIMA, filha de Valdemir Neris de Lima e Maria Lúcia da Silva Lima, nasceu em Pirapora, Minas Gerais, em **18** de setembro de **1974**.

Em maio de **1999**, gradou-se em Licenciatura Plena em Biologia, pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, onde atuou, durante um ano, como bolsista de trabalho interno, e em outro ano, como aluna de iniciação científica em Fisiologia Vegetal.

Em março de **1999**, iniciou o Curso de Fisiologia Vegetal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, tendo defendido tese em **09** de março de 2001.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
2.1. Condições de cultivo e coleta do material vegetal.....	5
2.2. Trocas gasosas.....	6
2.3. Parâmetros de fluorescência.....	6
2.4. Atividades enzimáticas	7
2.5. Danos celulares.....	9
2.6. Delineamento experimental.....	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

RESUMO

LIMA, Ana Lúcia da Silva, M. S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2001, Respostas **fotoquímicas** e atividade do sistema **antioxidativo** em dois clones de *Coffea canephora* **sob condições de déficit hídrico**. Orientador: Fábio Murilo Da Matta. Conselheiros: Marcelo Ehlers Loureiro e Marcos Rogério Tótola.

Os efeitos do déficit hídrico nos parâmetros fotoquímicos e nas atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), bem como em danos celulares, foram investigados em dois clones de *Coffea canephora* Pierre com tolerância diferencial à seca. Após seis dias sem irrigação, o potencial hídrico foliar na antemanhã decresceu para valores em torno de -3.0 MPa, sendo acompanhado pela supressão da fotossíntese líquida em ambos os clones. A fluorescência inicial e a eficiência fotoquímica do FSII, avaliada pela razão entre fluorescência variável e máxima, permaneceram inalteradas após a exposição dos clones ao déficit hídrico. Sob luz actínica, a eficiência de captura da energia de excitação pelos centros de reação “abertos” do FSII diminuiu significativamente somente no clone sensível à seca. O coeficiente de extinção fotoquímica diminuiu similarmente em ambos os clones, mas somente no clone sensível a seca acarretou um aumento na desativação térmica. O rendimento quântico do transporte de elétrons diminuiu similarmente em ambos os genótipos. Sob condições de seca, as atividades da

SOD, CAT e APX aumentaram em maior extensão no clone tolerante à seca do que no clone sensível. **Isso** pareceu estar associado a uma maior proteção contra o estresse oxidativo, conforme depreende-se pela menor peroxidação de lipídios e perda de eletrólitos no clone tolerante à seca.

ABSTRACT

LIMA, Ana Lúcia da Silva, M. S., Universidade Federal de Viçosa, March of 2001. Photochemical responses and activity of the antioxidant system in **two** clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. Adviser: Fábio Murilo Da Matta. Committee Members: Marcelo Ehlers Loureiro and Marcos Rogério Tótola.

The effects of water deficit on photochemical parameters and activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX), as well as cellular damages were investigated in two clones of *Coffea canephora* Pierre differing in drought tolerance. After six days without irrigation, leaf predawn water potential fell down to -3.0 MPa, that was accompanied by the suppression of net photosynthesis in both clones. The initial fluorescence and the photochemical efficiency of PSII, as evaluated through variable to maximum fluorescence ratio, remained unchanged as the clones were water-stressed. Under actinic light, the capture efficiency of excitation energy by open PSII reaction centres decreased significantly only in the drought-sensitive clone. The photochemical quenching coefficient declined similarly in both clones, but only the drought-sensitive clone exhibited an enhancement of thermal deactivation under water deficit conditions. The quantum yield of electron transport decreased similarly in both genotypes. Under drought conditions, activities of SOD, CAT and APX increased to a greater extent in the drought-

tolerant clone than in the drought-sensitive one. This seemed to be matched with higher protection against oxidative stress, as judged by the lower levels of lipid peroxidation and electrolyte leakage in the drought-tolerant clone.

■ INTRODUÇÃO

Na maioria das plantas, a fotossíntese é reduzida em resposta à seca. Nas fases iniciais da deficiência hídrica, o fechamento estomático tem sido apontado como o fator principal da limitação da fotossíntese (CHAVES, 1991; PEREIRA e CHAVES, 1993). Todavia, na medida em que o déficit hídrico progride, ajustes internos não-estomáticos, em diferentes níveis, são observados, incluindo-se redução da atividade de algumas enzimas do ciclo de Calvin (DUA et al., 1994; KICHEVA et al., 1994) e alterações do estoque de carboidratos nas células (QUICK et al., 1992; ZRENNER e STITT, 1991). Nesse contexto, o excesso de poder redutor, decorrente da redução da assimilação do CO_2 , pode ser parcialmente utilizado para reduzir o oxigênio molecular, levando à formação de compostos altamente reativos (BADIANI et al., 1993). Esses compostos, normalmente radicais livres, apresentam uma variedade de efeitos danosos às células. São formados basicamente pela doação de elétrons ou de energia para os átomos de oxigênio. Esse elemento, no estado fundamental, pode ser considerado como um radical (com dois elétrons não-pareados de “spins” paralelos), mas é a forma mais estável do oxigênio. Os “spins” paralelos fazem com que o oxigênio aceite somente um elétron de cada vez e que reaja com não- radicais apenas lentamente, porque os elétrons de valência dos não- radicais são pareados e antiparalelos (FOYER et al., 1994). Oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) é produzido pela adição de energia, sem

que ocorra a adição de um elétron. A adição de um elétron ao oxigênio no estado fundamental resulta no radical superóxido (O_2^-), enquanto um elétron adicional produz o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FOYER et al., 1994). Outro radical derivado do oxigênio, o radical hidroxil (OH^*) é também altamente reativo (ASADA, 1994). Em plantas, radicais livres derivados do oxigênio são, pois, resultantes de reações do oxigênio com os elétrons advindos das cadeias de transportes de elétrons em mitocôndrias e cloroplastos (SALIN, 1988).

Em face da espontaneidade das reações envolvidas com a geração de radicais livres, os organismos que possuem um modo de vida aeróbio desenvolveram sistemas eficientes de remoção das espécies reativas de oxigênio. A proteção dos cloroplastos contra o estresse oxidativo é, portanto, essencial e, sob condições normais, uma proteção adequada é obtida devido ao sistema antioxidativo das plantas (ASADA e TAKAHASHI, 1987). O radical superóxido é eliminado pela ação da dismutase do superóxido (superóxido:superóxido oxidoreductase, E.C. 1.15.1.1); o peróxido de hidrogênio, pela catalase (H_2O_2 : H_2O_2 oxidoreductase, E.C. 1.11.1.6), pela peroxidase do ascorbato (ascorbato: H_2O_2 oxidoreductase, E.C. 1.11.1.11) e pelo ciclo ascorbato-glutationa; os radicais hidroxil e o oxigênio singleto são eliminados não-enzimaticamente, por meio de reações com ascorbato, carotenóides e a-tocoferol (ASADA, 1994).

Quando as plantas são expostas a condições ambientes adversas, a exemplo de alta irradiância, extremos de temperatura, seca, ozônio, tratamentos com herbicidas ou deficiência mineral, o balanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a atividade antioxidativa pode ser alterado, resultando normalmente em danos às células (CAKMAC e MARSCHNER, 1992; FANGMEIER et al., 1994). Estresses ambientes podem estar diretamente ligados à produção de radicais livres, ou podem inibir o sistema de defesa antioxidativo, levando, assim, a um aumento indireto dos níveis de espécies reativas de oxigênio. Podem, ainda, causar perturbações em rotas biossintéticas, afetando a capacidade de dissipação do excesso de energia e, por conseguinte, levar à geração de formas ativadas do oxigênio (SALIN, 1988).

Em condições naturais, o déficit hídrico ocorre, usualmente, associado a temperaturas elevadas e a alta irradiância (PEREIRA e CHAVES, 1993),

podendo resultar em fotoinibição da fotossíntese, caracterizada por um decréscimo na eficiência fotoquímica do fotossistema II (FSII). Com efeito, o FSII é o principal alvo do dano fotoinibitório (BARBER e ANDERSON, 1992). Subseqüentemente à inativação inicial do transporte de elétrons no FSII e à perda do rendimento quântico fotoquímico, pode ocorrer dano irreversível no polipeptídeo D1, a proteína do centro de reação do FSII (BARBER, 1992; ARO et al., 1993). A inativação do polipeptídeo D1 reduz a capacidade de utilização de fótons e potencializa a fotoprodução das moléculas reativas. Paralelamente, o fechamento dos centros de reação do FSII, quando o reservatório de plastoquinona se torna escasso, acarreta, via de regra, maior dissipação de energia radiante na forma de calor ou por emissão de fluorescência (DIETZ et al., 1985; HORTON e HAUGE, 1988; PETERSON et al., 1988).

A emissão de fluorescência pode ser rastreada para examinar os eventos fotoquímicos, sendo um dos meios para avaliar-se o grau de severidade dos efeitos do déficit hídrico e de outros estresses a que as plantas são submetidas. O conhecimento da cinética da fluorescência modulada, essencial para fornecer informações sobre a cinética rápida, que se relaciona aos processos primários do FSII, e sobre a cinética lenta, relacionada principalmente a eventos ocorrentes nos tilacóides, bem como eventos metabólicos no estroma, é de especial interesse (BOLHÁR-NORDENKAMPF e ÖQUIST, 1993).

Dentre as mais de 70 espécies de *Coffea* conhecidas, somente duas, *C. canephora* e *C. arabica*, têm importância comercial. A maior parte das áreas cultivadas com *C. canephora*, no Brasil, está localizada em áreas com restrição hídrica, por exemplo, norte do Espírito Santo. Nessas regiões, o déficit hídrico é considerado o principal fator limitante da produtividade do cafeeiro. Esse problema poderia ser equacionado, ou pelo menos minimizado, com o emprego da irrigação. Todavia, a topografia, em muitos casos desfavorável, dificulta o seu uso. Em decorrência dos custos elevados, a irrigação nem sempre é viável para pequenos agricultores, sobre os quais, em larga escala, baseia-se o cultivo de *C. canephora* no Brasil.

Há grande variabilidade genética no que concerne a tolerância à seca em clones de *C. canephora*. Alguns clones sensíveis exibem sintomas nítidos de senescência e de abscisão foliar, sob deficiência hídrica severa, ainda que

as trocas gasosas sejam parcialmente mantidas às expensas da conservação da água (DA MATTA et al., 2000). No presente estudo, foram utilizados dois clones de *C. canephora*, selecionados a partir de suas respostas contrastantes quanto a tolerância à seca em condições de campo. *A priori*, é possível que os clones exibam diferenças potenciais no que concerne aos seus sistemas antioxidativos. Isso deveria afetar diferencialmente a atividade e a organização *in vivo* do aparelho fotossintético, quando as plantas **são** submetidas ao déficit hídrico. Pretendeu-se, pois, estudar **os** efeitos do déficit hídrico sobre as respostas fotoquímicas e a atividade de algumas enzimas do sistema antioxidativo de dois clones de *C. canephora*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Condições de cultivo e coleta do material vegetal

Foram utilizadas plantas de *Coffea canephora*, clones 109 A e 120, sensível e tolerante à seca, respectivamente, cultivadas em casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG (20°45'S, 42°54W, 651 m de altitude), em vasos de polietileno, com capacidade para 6 L, contendo substrato composto de terra e esterco, na proporção de 3:1 (v/v), sob irradiância máxima média de 800 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As plantas foram irrigadas periodicamente e adubadas, semanalmente, com 100 mL de solução de Hoagland completa (HOAGLAND e ARNON, 1939). Ao atingirem 10 meses de idade, a irrigação foi suspensa até que a fotossíntese líquida fosse nula, sendo necessários, para isso, seis dias para ambos os clones. Nessa condição, as plantas apresentavam sintomas de murchar já nas primeiras horas da manhã. Após a medição do potencial hídrico de antemãhã (Ψ_{am}), em folhas do terceiro ou quarto par de ramos plagiotrópicos, utilizando-se de uma bomba de pressão tipo Scholander, as plantas foram levadas para uma sala sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), de umidade relativa do ar ($60 \pm 1\%$) e irradiância de 400 μmol (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após 90 min, procederam-se às medições de trocas gasosas e dos parâmetros de fluorescência modulada em folhas do terceiro ou quarto par de ramos plagiotrópicos a partir do ápice. Após

as medições, as folhas foram coletadas, pesadas, mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a realização dos ensaios de atividades enzimáticas e de peroxidação de lipídeos.

2.2. Trocas gasosas

A condutância estomática ao vapor d'água (g_s) e a assimilação líquida do carbono (A) foram medidas em sistema aberto, sob luz saturante artificial [$1000 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$], por volta de 8:30 h, com analisador de gases a infravermelho portátil (LCA2, Analytical Development Company, Kings Lynn, Reino Unido), conforme DA MATTA et al. (1997b). A temperatura foliar variou de 20 a 24°C .

2.3. Parâmetros de fluorescência

Os parâmetros de fluorescência foram medidos utilizando-se um fluorômetro com amplitude de pulso modulado (FMS2, Hansatech, Norfolk, Reino Unido). As folhas, previamente adaptadas ao escuro por 30 min, foram inicialmente expostas a um fraco pulso de luz vermelho-distante [$1-2 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$], para a determinação da fluorescência mínima emitida, quando todos os centros de reação do FSII estariam na forma oxidada (F_0). Em seguida, um pulso de luz vermelho saturante, com irradiância de $6.000 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 1 s foi aplicado para promover, temporariamente, a máxima redução do aceptor primário de elétrons do FSII (Q_A), determinado-se, assim, a fluorescência máxima emitida pelas amostras adaptadas ao escuro (F_m). Subseqüentemente, as folhas foram irradiadas com luz actínica durante 480 s, à irradiância de $900 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para a obtenção do nível de fluorescência constante (F_s). Em seguida, outro pulso de luz saturante foi aplicado, para determinação da fluorescência máxima emitida pelas amostras à luz (F_m'). A luz actínica foi desligada e as amostras foram irradiadas com luz vermelho-distante, para determinação da fluorescência mínima emitida à luz (F_0'). Foram estimados, então, a fração da energia solar convertida em produtos fotossintéticos [coeficiente de extinção fotoquímica –

$q_P = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0)$; a eficiência fotoquímica do FSII, estimada por meio da razão entre fluorescências variável e máxima adaptadas ao escuro e à luz (F_v/F_m e F_v'/F_m' , respectivamente); o rendimento quântico do transporte de elétrons [$\phi_{FSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$] (GENTY et al., 1987) e o coeficiente de extinção não-fotoquímica: $[NPQ = (F_m - F_m') / F_m']$.

2.4. Atividades enzimáticas

Para a obtenção do extrato enzimático, 200 mg de tecido vegetal foram macerados sob nitrogênio líquido em almofariz, em banho de gelo, contendo, como meio de extração, 60 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e 1 mL de tampão de extração apropriado [catalase – tampão fosfato de potássio (100 mol m^{-3} , pH 7,0) e EDTA ($0,1 \text{ mol m}^{-3}$)], [dismutase do superóxido – tampão fosfato de potássio (100 mol m^{-3} , pH 7,8), EDTA ($0,1 \text{ mol m}^{-3}$) e Triton X-100 (0,1 %)] e [peroxidase do ascorbato – tampão fosfato de potássio (50 mol m^{-3} , pH 7,0) e ascorbato (1 mol m^{-3})]. O homogenato foi centrifugado a 4°C , por 15 min, a $15000g$, em microcentrífuga (BIOFUGI, HERAEUS, Kendro Laboratory Products, Germany). Alíquotas do sobrenadante foram imediatamente utilizadas para as avaliações de atividade enzimática e dosagem de proteínas, segundo BRADFORD (1976).

A atividade da catalase (CAT) foi estimada conforme descrito por TÓTOLA (1999), com algumas modificações. Adicionaram-se $20 \mu\text{L}$ de extrato enzimático a $2980 \mu\text{L}$ de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio (50 mol m^{-3} , pH 7,0) e H_2O_2 ($12,5 \text{ mol m}^{-3}$). A atividade da enzima foi estimada pelo decréscimo da absorvância a 240 nm , durante 2 min, em espectrofotômetro de duplo feixe (U-2000, Hitachi, Tokyo, Japão), utilizando-se, para os cálculos, da seguinte fórmula:

$$\text{Unidade de CAT/3 mL} = 69 \times A_{\text{Abs.240/min}}$$

Nessas condições, uma unidade de CAT corresponde à quantidade de enzima capaz de decompor $1 \mu\text{mol} (\text{H}_2\text{O}_2) \text{ min}^{-1}$.

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), em uma mistura de reação contendo tampão fosfato de potássio (50 mol m⁻³, pH 7,8), metionina (13 mol m⁻³), NBT (0,075 mol m⁻³), EDTA (0,0001 mol m⁻³), riboflavina (0,002 mol m⁻³) e extrato enzimático (5 µL), num volume total de 3 mL (BECANA et al., 1989). A reação foi iniciada iluminando-se os tubos que continham a mistura com uma lâmpada fluorescente de 15 W. Para isso, foi utilizada uma câmara de incubação circular, contendo uma lâmpada no centro. Os tubos de ensaio foram colocados em orifícios eqüidistantes da lâmpada. Após 10 min, a lâmpada foi desligada, e a produção do azul-de-formazana nos frascos-controle e naqueles contendo o extrato enzimático foi avaliada a 560 nm, em espectrofotômetro (U1100, Hitachi, Tokyo, Japão), utilizando-se, para os cálculos, da seguinte fórmula:

$$\text{Unidade de SOD/mL de extrato} = \left[\frac{\text{Abs.560 branco}}{\text{Abs.560 amostra}} - 1 \right] \times 3000/5$$

Uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi avaliada de acordo com método de NAKANO e ASADA (1981), com algumas modificações. O ensaio enzimático foi realizado em espectrofotômetro (U-2000 Hitachi, Tokyo, Japão), após a adição de 20 µL de extrato enzimático a 2980 µL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio (50 mol m⁻³, pH 7,0), ascorbato (0,5 mol m⁻³) e H₂O₂ (0,1 mol m⁻³). A atividade da enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 290 nm, durante 1 min, considerando-se que, nas condições do ensaio, um decréscimo de 0,01 unidades de Abs. 290 corresponde a 0,0108 µmoles de ascorbato oxidado, e que uma unidade de APX corresponde à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol (ascorbato) min⁻¹.

2.5. Danos celulares

O extravazamento de eletrólitos foi estimado em 15 discos foliares (1 cm de diâmetro cada) previamente lavados e postos a flutuar em frascos contendo 10 mL de água desionizada. A condutividade elétrica do líquido de suspensão foi lida em um condutivímetro (Digimed, DM 31, Santo Amaro, SP) após incubação por 6 h, à temperatura ambiente, sendo expressa em porcentagem da condutividade total que, por seu turno, era obtida após colocarem-se os frascos numa estufa a 90°C, durante 2 h.

A produção de aldeído malônico (MDA), que expressa o grau de peroxidação de lipídeos, foi estimada conforme descrito por CAKMAK e HORST (1991), com algumas modificações. Cerca de 300 mg de tecido foliar foi macerado em 3 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% (p/v), a 4 °C. O material foi então centrifugado a 13000 g, por 2 min. Tomaram-se 500 µL do sobrenadante, sendo-lhe adicionado 1,5 mL de uma solução de ácido tio-barbitúrico (0,5%, preparado em TCA a 20%). As amostras e o branco foram incubados a 90 °C, por 20 min, parando-se a reação em banho de gelo. Subseqüentemente, foram centrifugados a 10000 g, por 5 min. A absorvância do sobrenadante foi lida a 532 nm, descontando-se a absorvância inespecífica a 600 nm. Utilizou-se do coeficiente de absorvidade de 155 mM⁻¹ do MDA.

2.6. Delineamento experimental

Utilizou-se do delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições, em que os tratamentos constituíram um fatorial 2 x 2, sendo dois clones (109 A e 120) e dois níveis de irrigação (plantas com e sem irrigação). Foi utilizado o teste de DUNCAN, em nível de significância de 5% de probabilidade, para comparação das médias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após seis dias sem irrigação, o potencial hídrico de antemanhã (Ψ_{am}) decresceu para valores em torno de -3.0 MPa, nas folhas dos clones 109 A e 120 (Tabela 1). Esses resultados contrastam com observações de campo feitas após um período de 105 dias de estiagem, em que o clone 109 A apresentou Ψ_{am} de $-1,2$ MPa, contra $-0,6$ MPa, no clone 120 (DA MATTA, resultados não publicados). Aparentemente, essa discrepância pode ter sido resultante de: 1) limitação do volume do vaso de cultivo das plantas, uma vez que a condutância estomática (g_s) não foi significativamente alterada em resposta aos tratamentos aplicados, e; 2) o tempo relativamente rápido de indução do déficit hídrico pode não ter sido suficiente para permitir ajustes internos nas plantas, como usualmente se observa sob condições de campo, em que os défices hídricos são estabelecidos de maneira gradual. De qualquer modo, os resultados do presente experimento indicam que ambos os clones exibiram um mesmo grau de tensão hídrica. Paralelamente, a assimilação líquida do carbono (A) foi virtualmente nula nas plantas sob déficit hídrico (Tabela 1).

Apesar de A ter caído para zero, não houve diferenças em F_0 e F_v/F_m em resposta aos tratamentos aplicados (Tabela 2), confirmando que o FSII é francamente resistente ao déficit hídrico, conforme já observado em café (DA MATTA et al., 1997a). Sob luz actínica, no entanto, observou-se uma redução significativa (15%) na eficiência de captura da excitação pelos centros “abertos” do FSII, estimada pela razão F_v'/F_m' , no clone 109 A, mas não no clone 120

Tabela 1 – Potencial hídrico de antemanhã (Ψ_{am} , MPa), condutância estomática ao vapor d'água (g_s , mmol m⁻² s⁻¹) e taxa de assimilação líquida de CO₂ (**A**, μmol m⁻² s⁻¹), em dois clones de *Coffea canephora* submetidos a dois regimes hídricos. ($n = 5 \pm$ desvio-padrão)

Parâmetros	Clone 109 A		Clone 120	
	Controle	Défice	Controle	Défice
Ψ_{am}	-0,20 ± 0,02 a A	-3,00 ± 0,28 b A	-0,20 ± 0,02 a A	-3,00 ± 0,54 b A
g_s	48 ± 4 a A	66 ± 26 a A	62 ± 16 a A	78 ± 36 a A
A	2,00 ± 0,28 a A	0,01 ± 0,01 b A	2,60 ± 0,88 a B	0,02 ± 0,02 b A

Nas linhas, para um mesmo clone, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si. Dentro de cada regime hídrico, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$, teste de DUNCAN)

Tabela 2 – Fluorescência Inicial (F_0), razões de fluorescência variável/máxima (F_v/F_m e F_v'/F_m'), eficiência quântica efetiva do fotossistema II (ϕ_{FSII}), coeficientes de extinção fotoquímica (q_p) e não-fotoquímica (NPQ) em dois clones de *Coffea canephora* submetidos a dois regimes hídricos. ($n = 5 \pm$ desvio-padrão)

Parametros	Clone 109 A		Clone 120	
	Controle	Défice	Controle	Défice
	200 ± 30 a A	216 ± 14 a A	191 ± 14 a A	192 ± 56 a A
F_v/F_m	0,815 ± 0,040 a A	0,818 ± 0,008 a A	0,826 ± 0,034 a A	0,824 ± 0,022 a A
F_v'/F_m'	0,583 ± 0,060 a A	0,498 ± 0,026 b A	0,591 ± 0,022 a A	0,580 ± 0,032 a B
ϕ_{FSII}	0,424 ± 0,060 a A	0,273 ± 0,022 b A	0,361 ± 0,038 a B	0,260 ± 0,054 b A
q_p	0,724 ± 0,060 a A	0,549 ± 0,036 b A	0,610 ± 0,062 a B	0,447 ± 0,080 b B
NPQ	1,574 ± 0,340 a A	2,062 ± 0,318 b A	1,435 ± 0,292 a A	1,378 ± 0,352 a B

Nas linhas, para um mesmo clone, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si. Dentro de cada regime hídrico, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$, teste de DUNCAN)

(Tabela 2). Em ambos os clones, observaram-se decréscimos similares em q_P , em resposta à seca. Uma vez que $1 - q_P$ é uma medida do estado de redução do acceptor primário de elétrons no FSII (Q_A) (KRAUSE e WEIS, 1991), pode-se sugerir que a reoxidação de Q_A foi menos efetiva nas plantas sob deficiência hídrica, acarretando uma maior fração de centros de reação do FSII "fechados", sob irradiância actínica. Esses centros representam uma fração do FSII que está propensa a sofrer danos fotoinibitórios por excesso de excitação, com subseqüentes alterações no polipeptídeo D_1 (HAVAUX et al., 1991). Decréscimos em q_P , na medida em que A é reduzida sob condições de déficit hídrico, têm sido relatados para outras espécies (*e.g.*, CORNIC e BRIANTAIS, 1991; LAURIANO et al., 1997; SANCHEZ-RODRIGUES et al., 1997). Em adição aos decréscimos em q_P , verificaram-se reduções de 36% e 28% em ϕ_{FSII} nos clones 109 A e 120 sob deficiência hídrica, respectivamente, apesar dos valores negligenciáveis de A . No clone 109 A, parte da radiação absorvida, provavelmente em excesso para suportar a redução do CO_2 , foi dissipada em maior extensão, via desexcitação térmica, tendo-se em vista um aumento significativo de 31% no coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ). Não obstante, nenhum incremento em NPQ foi observado no clone 120, quando submetido ao déficit hídrico. Aumentos em NPQ parecem ser uma resposta comum das plantas ao déficit hídrico, de modo a balancear a taxa dos eventos fotoquímicos com aquela do metabolismo do carbono, a fim de prover um ajuste protetor e evitar sobre-excitação dos centros de reação do FSII (HAVAUX et al., 1991). De qualquer modo, o aumento discreto em NPQ (apenas no clone 109 A) não poderia prover uma proteção adequada ao FSII contra a irradiância excessiva. Portanto, a magnitude relativamente pequena da depressão de ϕ_{FSII} e o aumento no estado de redução de Q_A , ainda que a fotossíntese líquida tenha sido nula, revelam que outros processos devem utilizar a energia gerada na fase fotoquímica. Sob condições de seca, a redução de O_2 , via fotorrespiração e reação de Mehler, pode representar um mecanismo de fotoproteção, na medida em que atuaria como um dreno para o excesso de energia no aparelho fotossintético que, sob condições normais, seria dissipado via assimilação de CO_2 (CORNIC, 1994).

A atividade específica da SOD aumentou apreciavelmente sob condições de déficit hídrico, 100% no clone 109 A e 558% no clone 120

(Tabela 3). Essa enzima, que cataliza a dismutação do radical superóxido, produzindo H_2O_2 , é, quantitativamente, a principal responsável pela remoção do superóxido (ASADA, 1999). Aumento da atividade da SOD poderia traduzir-se em proteção dos clones estudados contra um estresse oxidativo. Plantas transgênicas que super-expressam a SOD exibem maior tolerância a tratamentos oxidativos, além de resistirem mais marcadamente à fotoinibição quando submetidas a diferentes estresses abióticos (SMIRNOFF, 1995). Todavia, há certa ambivalência no comportamento da SOD em genótipos tolerantes à seca, desde incrementos (DHINDSA e MATOWE, 1981) a decréscimos (DEL LONGO et al., 1993; ZHANG e KIRKHAM, 1994; SGHERRI et al., 2000) em sua atividade sob condições de estresse hídrico. Essas discrepâncias podem estar associadas a diferenças inter-específicas, à idade da planta e à duração e intensidade do estresse hídrico (SGHERRI et al., 2000). De qualquer modo, maior grau de proteção contra danos oxidativos deve requerer um rápido metabolismo de H_2O_2 gerado pela ação da SOD, o que inibiria a produção subsequente de radicais mais reativos, como o radical hidroxil (PERL et al., 1993). Com efeito, aumento na atividade da SOD, sem incrementos proporcionais na atividade de enzimas de remoção de H_2O_2 , parece não ser efetivo na proteção de plantas de tabaco contra danos oxidativos (PRITCHER et al., 1991), em face de um desequilíbrio entre a produção e a remoção de H_2O_2 . Tanto CAT como APX são muito sensíveis a espécies reativas de oxigênio (SMIRNOFF, 1995) e, desse modo, a inativação dessas enzimas poderia resultar em aumentos nos níveis celulares de H_2O_2 .

Neste trabalho, a atividade específica da CAT aumentou em menor extensão que a da SOD, 58% no clone 109 A e 110%, no clone 120, quando submetidos ao estresse hídrico (Tabela 3). Visto que a CAT é praticamente restrita a microcorpos, particularmente peroxissomos (SMIRNOFF, 1995), o aumento de sua atividade poderia ser tomado como uma evidencia indireta de um incremento da fotorrespiração. A capacidade de reciclar o CO_2 fotorrespirado pode ser o principal fator de tolerância do aparelho fotossintético contra danos fotoinibitórios, em nível de FSII (MAURY et al., 1996). Todavia, vários estudos têm evidenciado uma perda de atividade da CAT em plantas sob deficiência hídrica (e.g., CHOWDHURY e CHOUDHURI, 1985; DHINSA e MATOWE, 1981; ZHANG e KIRKHAM, 1994). Isso é explicado pelo fato de que

Tabela 3 –Atividade específica da dismutase do superóxido (**SOD**), da catalase (**CAT**) e da peroxidase do ascorbato (**APX**), em folhas de dois clones de *Coffea canephora*, submetidos a dois regimes hídricos. Atividades enzimáticas são expressas em unidade da enzima (ver texto) por miligrama de proteína. ($n = 5 \pm$ desvio-padrão)

Parametros	Clone 109 A		Clone 120	
	Controle	Défice	Controle	Défice
SOD	17,8 ± 2,2 a A	35,7 ± 2,2 b A	24,8 ± 3,8 a B	163,2 ± 7,0 b B
CAT	14,3 ± 4.4 a A	22,6 ± 6,4 b A	19,0 ± 4,2 a A	39,8 ± 5,8 b B
APX	0,3 ± 0,2 a A	0,8 ± 0,2 b A	0.4 ± 0,2 a A	1,3 ± 0,2 b B

Nas linhas, para um mesmo clone, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si. Dentro de cada regime hídrico, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$, teste de DUNCAN)

a CAT é fotoinativada continuamente, especialmente sob condições fotooxidativas severas (SMIRNOFF, 1995). Quando a síntese protéica é inibida, como ocorre em muitos casos sob condições de seca, a ressíntese da enzima é afetada (ZHANG e KIRKHAM, 1994). À primeira vista, tais fatos não ocorreram no presente trabalho.

A atividade da APX aumentou 167% no clone 109 A e 225% no clone 120, quando submetidos à défice hídrico (Tabela 3). Ressalta-se que a atividade das três enzimas investigadas foi sempre maior no clone 120 que no 109 A, particularmente nas plantas sob défice hídrico. Ademais, ocorreram incrementos em extensão muito mais pronunciada na atividade da **SOD** do que na da CAT e APX (ambas envolvidas no metabolismo de H_2O_2), no clone 120, em relação ao 109 A. Considerando-se apenas as três enzimas, poder-se-ia sugerir a ocorrência de uma maior produção líquida de H_2O_2 nas plantas do clone 120 submetidas à défice hídrico e, potencialmente, danos oxidativos em maior profundidade nesse material que no clone 109 A. Todavia, danos celulares (peroxidação de lipídios e extravazamento de eletrólitos) parecem ter sido mais evidentes no clone 109 A que no clone 120 (Tabela 4).

Sob deficiência hídrica a peroxidação de lipídios, estimada pela produção de MDA, aumentou **126%** no clone **120** e, mais marcadamente, no clone **109 A**, em **330%** (Tabela 4). Esses resultados estão em concordância com os de outros estudos (MORAN et al., 1994; ZHANG e KIRKHAM, 1994), corroborando a hipótese de que o déficit hídrico pode, de fato, induzir a peroxidação de lipídios de membranas mediante a produção de espécies reativas de oxigênio.

como do ciclo ascorbat-gluta
CCA, no sentido de atenuar os

Tabela 4 – Porcentagem de extravazamento de eletrólitos e peroxidação de lipídios, estimada pela produção de aldeído malônico (MDA), em folhas de dois clones de *Coffea canephora*, submetidos a dois regimes hídricos. ($n = 4 \pm$ desvio-padrão)

Parâmetros	Clone 109 A		Clone 120	
	controle	Défice	Controle	Défice
Extravazamento de eletrólitos (%)	2,7 ± 0,6 a A	11,3 ± 1,2 b A	3,1 ± 0,4 a A	8,6 ± 1,0 b B
MDA (nmol g ⁻¹ MS)	75 ± 14 a A	322 ± 8 b A	103 ± 4 a B	233 ± 4 b B

Nas linhas, para um mesmo clone, médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si. Dentro de cada regime hídrico, médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre si (P ■ 0,05, teste de DUNCAN)

O aumento na peroxidação de lipídios pode resultar em incrementos na fluidez de membrana, na proteólise e no extravazamento de eletrólitos (MORAN et al., 1994). Com efeito, a perda de eletrólitos aumentou em 177% no clone **120**, e em **319%** no clone **109 A** (Tabela 4), numa proporção aproximada ao incremento nos níveis de MDA. O aumento no grau de danos às células em resposta à seca parece refletir, portanto, uma perda no equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos de defesa da planta, em favor da produção daquelas espécies. Pode-se inferir, ainda, que a maior atividade das enzimas aqui avaliadas não foi suficiente para prover uma proteção satisfatória contra o estresse oxidativo. No entanto, comparativamente, o aumento na atividade do sistema antioxidativo do clone

120 parece ter resultado numa menor produção de espécies reativas, conforme evidenciado por seus menores níveis de peroxidação de lipídios e extravazamento de eletrólitos em relação ao clone 109 A (Tabela 4). Adicionalmente, estes dados permitem sugerir que o incremento proporcionalmente maior na atividade da SOD em relação aos da CAT e APX, no clone 120, deve ter sido acompanhado por aumentos nas atividades de outros sistemas antioxidativos, tais como do ciclo ascorbato-glutationa e de sistemas de defesa não-enzimáticos, no sentido de atenuar os efeitos deletérios de uma produção de H₂O₂ presumivelmente maior naquele clone. Ademais, enzimas do sistema antioxidativo compreendem múltiplas isoformas distribuídas nos vários compartimentos celulares; portanto, permanece para ser investigada a contribuição individual dessas isoformas na maior expressão do sistema antioxidativo do clone 120 contra o estresse oxidativo.

Em suma, o déficit hídrico afetou apenas marginalmente os parâmetros fotoquímicos avaliados em *C. canephora*. A manutenção parcial do transporte de elétrons, apesar de a assimilação líquida do carbono ter sido virtualmente suprimida, pode ser encarada como um meio para reduzir a pressão de excitação sobre os fotossistemas. Parte do fluxo de elétrons deve ter sido utilizada na reação de Mehler e, possivelmente, também na fotorrespiração, levando à formação de espécies reativas de oxigênio. Comparativamente, a neutralização dessas espécies foi mais efetiva no clone tolerante ao déficit hídrico que no material sensível. Portanto, a capacidade de aumentar a atividade do sistema antioxidativo, de modo a limitar a peroxidação de lipídios e a perda de solutos, pode ser um atributo associado à maior tolerância à seca no clone 120 em relação ao clone 109 A.

SADIANI, M.C. PAD
Antioxidants and
acclimated to

BARBER, J. The leaf
molecular process

BARBER, J. ANCHOR
photosynthesis, I

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARO, E-M.; VIRGIN, I.; ANDERSSON, B. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1143, p. 113-134, 1993.
- ASADA, K. Scavenging reactive molecules in chloroplasts. In: BAKER, N. R.; BOWYER, J. R. (Eds). *Photoinhibition of Photosynthesis: from Molecular Mechanisms to the Field*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, p. 129-142, 1994.
- ASADA, K. The water – water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, v. 50, p. 601-639, 1999.
- ASADA, K.; TAKAHASHI, M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: KYLE, D. J., OSMOND, C. B.; ARNTZEN, C. J. (Eds). *Photoinhibition: topics in photosynthesis*. Amsterdam: Elsevier, v. 9, p. 227-287, 1987.
- BADIANI, M.; PAOLACCI, A.R.; D'ANNIBALE, A.; SERMANNI, G.G. Antioxidants and photosynthesis in the leaves of *Triticum durum* L. acclimated to low, non-chilling temperature. *J. Plant Physiol.*, v. 142, p. 18-24, 1993.
- BARBER, J. The isolated photosystem II reaction center reveals details of the molecular process of photoinhibition. *Photosynthetica*, v. 27, p. 63-80, 1992.
- BARBER, J.; ANDERSON, B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.*, v. 17, p. 61-66, 1992.

- BECANA, M.; PARI, F.J.; SANDALIO, L.M.; DEL RIO, L.A. Isoenzymes of superoxide dismutase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Plant Physiol.*, v. 90, p. 1286-1292, 1989.
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: HALL, D.O.; SCURLOCK, J.M.O.; BOLHAR-NORDENKAMPF, H.R.; LEEGOOD, R.C. (Eds). *Photosynthesis and Production in a Changing Environment: A Field and Laboratory Manual*. London: Chapman & Hall, p. 192-206, 1993.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAKMAK, I.; HORST, J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant.*, v. 83, p. 463-468, 1991.
- CAKMAK, I.; MARSCHNER, H. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.*, v. 98, p. 1222-1227, 1992.
- CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.*, v. 42, p. 1-16, 1991.
- CHOWDHURY, S.R.; CHOUDHURI, M.A. Hydrogen peroxide metabolism as an index of water stress tolerance in jute. *Physiol. Plant.*, v. 65, p. 503-507, 1985.
- CORNIC, G. Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. In: BAKER, N.R.; BOWYER, J. R. (Eds). *Photoinhibition of Photosynthesis: from Molecular Mechanisms to the Field*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, p. 297-313, 1994.
- CORNIC, G.; BRIANTAIS, J.-M. Partitioning of photosynthetic electron flow between CO₂ and O₂ reduction in a C₃ leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO₂ concentrations and during drought stress. *Planta*, v. 183, p. 178-184, 1991.
- DA MATTA, F.M.; MAESTRI, M.; BARROS, R.S. Photosynthetic performance of two *Coffea* species under drought. *Photosynthetica*, v. 34, p. 257-264, 1997a.
- DA MATTA, F.M.; MAESTRI, M.; MOSQUIM, P.R., BARROS, R.S. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. *Plant Sci.*, v. 128, p. 43-50, 1997b.

- DA MATTA, F.M.; SILVEIRA, J.S.M.; DUCATTI, C.; LOUREIRO, M.E. Eficiência do uso da água e tolerância à seca em *Coffea canephora*. In: *Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*. Poços de Caldas (MG), EMBRAPA, v. 2, p. 907-910, 2000.
- DEL LONGO, O.T.; GONZÁLEZ, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V.S. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol.*, v. 34, p. 1023-1028, 1993.
- DHINDSA, R.S.; MATOWE, W. Drought tolerance in two mosses: Correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.*, v. 32, p. 79-91, 1981.
- DIETZ, K.J.; SCHREIBER, U.; HEBER, U. The relationship between the redox state of Q_A and photosynthesis in leaves at various carbon dioxide, oxygen and light regimes. *Planta*, v. 166, p. 219-226, 1985.
- DUA, A.; TALWAR, G.; SINGAL, H.R.; SINGH, R. CO_2 exchange, primary photochemical reactions and enzymes of photosynthetic carbon reduction cycle in Brassica pods during water stress and recovery. *Photosynthetica*, v. 30, p. 261-268, 1994.
- FANGMEIER, A.; BRUIJN, J.; JÄGER, H.J. Time course of oxidant stress biomarkers in flag leaves of wheat exposed to ozone and drought stress. *New Phytol.*, v. 126, p. 63-69, 1994.
- FOYER, C.H.; DESCOURVIÈRES, P.; KUNERT, K.J. Protection against oxygen radical: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, v. 17, p. 507-523, 1994.
- GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; VIEIRA da SILVA, J.B. Effects of drought on primary photosynthetic processes of cotton leaves. *Plant Physiol.*, v. 83, p. 360-364, 1987.
- HAVAUX, M.; STRASSER, R.J.; GREPPIN, H. A theoretical and experimental analysis of the q_P and q_N coefficients of chlorophyll fluorescence quenching and their relation to photochemical and nonphotochemical events. *Photosynth. Res.*, v. 27, p. 41-55, 1991.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. *California Agric. Exp. Sta. Cir.*, v. 347, p. 1-32, 1939.
- HORTON, P.; HAUGE, A. Studies of the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts IV. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 932, p. 107-115, 1988.
- KICHEVA, M.I.; TSONEV, T.D.; POPOVA, L.P. Stomatal and nonstomatal limitations to photosynthesis in two wheat cultivars subjected to water stress. *Photosynthetica*, v. 30, p. 107-116, 1994.

- KRAUSE, G.H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis : the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.*, v. 42, p. 313-349, 1991.
- LAURIANO, J.A; CAMPOS, P.S.; RAMALHO, J.C.; LINDON, F.C.; GUEDES, M.E.; CÉU MATOS, M. Partial decline of *Arachis hypogea* L. photosynthesis triggered by drought stress. *Photosynthetica*, v. 33, p. 81-90, 1997.
- MAURY, P; MOJAYAD, F; BERGER, M; PLANCHON, C. Photochemical responses to drought acclimation in two sunflower genotypes. *Physiol. Plant.*, v. 98, p. 55-66, 1996.
- MORAN, J.F.; BECANA, M.; ITURBE-ORMAETXE, I.; FRECHILLA, S.; KLUCAS, R.V.; APARICIO-TEJO, P. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, v. 194, p. 346-352, 1994.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.*, v. 22, p. 867-880, 1981.
- PEREIRA, J.S.; CHAVES, M.M. Plant water deficits in Mediterranean ecosystems. In: SMITH, J. A. C.; GRIFFITHS, H. (Eds), *Water Deficits – Plant Responses from Cell to Community*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, p. 237-251, 1993.
- PERL, A.; PERL-TREVES, R.; GALILI, S.; AVIV, D.; SHALGI, E.; MALKIN, S.; GALUN, E. Enhanced oxidative-stress defense in transgenic potato expressing tomato Cu,Zn superoxide dismutases. *Theor. Appl. Genet.*, v. 85, p. 568-576, 1993.
- PETERSON, R.B.; SIVAK, M. N.; WALKER, D.A. Relationship between steady state fluorescence yield and photosynthetic efficiency in spinach leaf tissue. *Plant Physiol.*, v. 88, p. 158-162, 1988.
- PRITCHER, L.H; BRENNAN, E; HURLEY, A; DUNSMUIR, P; TEPPERMAN, J. M; ZILINSKAS, B.A. Overproduction of petunia copper/zinc superoxide dismutase does not confer ozone tolerance in transgenic tobacco. *Plant Physiol.*, v. 97, p. 452-455, 1991.
- QUICK, W.P.; CHAVES M.M.; WENDLER, R.; DAVID, M.M.; RODRIGUES, M.L.; PASSARINHO, J.A.; PEREIRA, J.S.; ADCOK, M.D.; LEEGOOD, R.C.; STITT, M. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant Cell Environ.*, v. 15, p. 25-35, 1992.
- SALIN, M.L. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.*, v. 72, p. 681-689, 1988.

SANCHEZ-RODRIGUES, J.; MARTINEZ-CARRASCO, R.; PEREZ, P. Photosynthetic electron transport and carbon-reduction-cycle enzyme activities under long-term drought stress in *Casuarina equisetifolia* Forst. & Forst.. *Photosynth. Res.*, v. 52, p. 255-262, 1997.

SGHERRI, C.L. M.; MAFFEI, M.; NAVARI-IZZO, F. Antioxidative enzyme in wheat subjected to increasing water deficit and rewatering. *J. Plant Physiol.*, v. 157, p. 273-279, 2000.

SMIRNOFF, N. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: SMIRNOFF, N. (Eds). *Environment and Plant Metabolism*. Oxford: BIOS, Scientific Publishers, p. 217-243, 1995

TÓTOLA, M.R. *Cinética da fluorescência e atividade do sistema antioxidativo em plantas de eucalipto com micorrizas sob temperaturas supra-otimas*. Viçosa, MG, UFV, 86 p., 1999 (Tese de Doutorado).

ZHANG, J.; KIRKHAM, M.B. Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.*, v. 35, p. 785-791, 1994.

ZRENNER, R.; STITT, M. Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water-stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant Cell Environ.*, v. 14, p. 939-946, 1991.

