

## Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro

Sidnei Deuner<sup>1\*</sup>  
José Donizeti Alves<sup>2</sup>  
Daniela Deitos Fries<sup>3</sup>  
Ilisandra Zanandrea<sup>4</sup>  
André Almeida Lima<sup>5</sup>  
Paôla de Castro Henrique<sup>6</sup>  
Patrícia de Fátima P. Goulart<sup>7</sup>

### RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio na atividade de enzimas do sistema antioxidante e suas relações com a abertura e fechamento estomático. Para tanto, mudas de cafeeiro cultivar Catuai IAC 99 foram cultivadas em sacolas plásticas com capacidade de três litros e mantidas em sala de crescimento com irradiância de aproximadamente  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes. As plantas foram irrigadas diariamente até a indução dos tratamentos. Foram realizadas pulverizações com ácido ascórbico (20 mM) e peróxido de hidrogênio (1 mM). Em intervalos de uma hora, por um período de quatro horas, foram avaliadas a condutância estomática e a taxa de transpiração, bem como feita a coleta de folhas para posterior análise das enzimas SOD, CAT, APX e GR. A aplicação de peróxido de hidrogênio diminuiu a condutância estomática e conseqüentemente, a taxa transpiratória em relação às plantas-controle, e ao mesmo tempo promoveu maior atividade das enzimas antioxidantes. Quando as plantas foram pulverizadas com ácido ascórbico, foram observadas maior condutância estomática e taxa transpiratória na primeira hora de avaliação. Quanto à atividade enzimática, apenas CAT e APX mostraram diferença com atividade inferior à verificada nas plantas-controle.

**Palavras-chave:** *Coffea arabica*, enzimas, estômatos.

### ABSTRACT

#### Hydrogen peroxide and ascorbic acid effects on antioxidant enzyme activity in coffee seedlings

This work aimed to evaluate the exogenous application of ascorbic acid and hydrogen peroxide on enzyme activity of antioxidant system and its relation with stomatal opening. Seedlings of coffee cultivar Catuai IAC 99 were grown in 3 L plastic bags and kept in growth chamber with irradiance of approximately  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , provided by fluorescent lamps. Plants were irrigated daily until treatment initiation. Spraying with ascorbic acid (20 mM) and hydrogen peroxide (1 mM) was carried out. Stomatal conductance and transpiration rate were evaluated hourly for 4 hours, as well as leaf sampling for later analyses of APX, CAT, GR and SOD enzyme activity. Application of hydrogen peroxide reduced the

<sup>1</sup> Bolsista de Pós-Doutorado FAPEMIG. Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia, UFLA, Caixa Postal 3037, 37200-000. Lavras, (MG). \*sdeuner@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Setor de Fisiologia Vegetal, DBI, UFLA, 37200-000. Lavras, (MG). jdalves@ufla.br

<sup>3</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 45700-000 - Itapetinga, BA.

<sup>4</sup> Doutoranda no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia/UFLA.

<sup>5</sup> UFLA, Caixa Postal 3037, 37200-000. Lavras, (MG).

<sup>6</sup> Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia/UFLA.

<sup>7</sup> Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS, 37200-000. Lavras, MG.

stomatal conductance and consequently the transpiration rate compared with the control plants, and at the same time, promoted higher antioxidant activity of the enzymes. When plants were sprayed with ascorbic acid, higher stomatal conductance and transpiration rate were found in the first hour of evaluation. In relation to enzyme activity, only CAT and APX showed lower activity than the control plants.

**Key words:** *Coffea arabica*, enzymes, stomata.

## INTRODUÇÃO

O café tem grande importância econômica e social para o Brasil, principal produtor e exportador desse produto. Ele é a segunda maior mercadoria no mundo, vindo após o petróleo, sendo a principal cultura em diversos países. Está estimado que, apenas no Brasil, aproximadamente seis milhões de pessoas estejam envolvidas com o negócio do café, desde a produção no campo até o comércio do produto final (Silvarolla, 2004). Embora o cafeeiro possa vegetar em extensa área geográfica, em sua maior parte entre os trópicos, a sua produção econômica se restringe a uma área bem menor, na qual os fatores ecológicos são mais favoráveis (Alfonsi, 2000). Pode ser conduzido em ambientes de pequena luminosidade, pois apresenta baixa irradiância de saturação, variando de 300 a 600  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fahl *et al.*, 1994).

A exposição das plantas a fatores ambientais adversos pode perturbar a homeostase celular e aumentar a produção de diversas espécies ativas de oxigênio, designadas como espécies reativas de oxigênio (EROs), como o superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), os radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e oxigênio singlete ( $\text{O}_2^1$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que são produzidas continuamente pelo metabolismo vegetal (Foyer & Noctor, 2005). As plantas possuem um sistema de defesa antioxidante enzimático e não-enzimático que permite a detoxificação das EROs e a proteção das células vegetais de danos oxidativos (Gratão *et al.*, 2005). Porém, a destruição eficiente das EROs requer a ação de diversas enzimas antioxidantes atuando em sincronia, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), o ascorbato peroxidase (APX) e a glutatona redutase (GR). A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs, sendo responsável pela dismutação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , gerando  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$ . A CAT e APX são enzimas que catalisam a conversão do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  em água. A GR catalisa numa reação dependente de NADPH a redução da glutatona oxidada (GSSG) à forma reduzida (GSH). A APX, GR e GSH são importantes componentes do ciclo ascorbato-glutationa responsáveis pela remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em diferentes compartimentos celulares (Gratão *et al.*, 2005).

O sistema antioxidante não-enzimático da célula vegetal é essencialmente composto de concentrações de ascorbato, glutatona e  $\alpha$ -tocoferol relativamente altas,

que são eficientes consumidores de oxirradicais (Gratão *et al.*, 2005). O ascorbato é um antioxidante primário principal, reagindo diretamente com os radicais  $\bullet\text{OH}$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{O}_2^1$ . É também poderoso antioxidante secundário, reduzindo a forma oxidada do  $\alpha$ -tocoferol, um importante antioxidante em fases não-aquosas. Em adição a sua importância no ciclo ascorbato-glutationa, o ascorbato desempenha papel na preservação da atividade de enzimas que contêm íons metálicos prostéticos de transição (Gratão *et al.*, 2005). No sistema antioxidante, o ascorbato é utilizado pela APX para converter  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água. Entretanto, dada a função do ascorbato como um “limpador” do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mudanças no seu estado redox podem alterar o movimento estomático, particularmente nas circunstâncias em que os sinalizadores ABA ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  ativam o fechamento dos estômatos. Estudos mais recentes têm mostrado que o fechamento estomático, induzido pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi revertido pela aplicação de ácido ascórbico, um dos mais abundantes antioxidantes produzidos pelas plantas (Zhang *et al.*, 2001).

O presente trabalho objetivou avaliar o efeito da aplicação exógena de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio sobre a atividade de enzimas do sistema antioxidante na abertura e no fechamento dos estômatos em mudas de cafeeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

Mudas de café (*Coffea arabica*) cultivar Catuaí IAC 99 com oito meses de idade foram cultivadas em sala de crescimento no Setor de Fisiologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, com irradiância de aproximadamente 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecida por lâmpadas fluorescentes. As mudas foram mantidas em sacolas plásticas com capacidade de três litros e irrigadas diariamente, mantendo-se o nível de água do solo próximo à capacidade de campo até a indução dos tratamentos.

Foram realizadas aplicações exógenas de ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio nas concentrações de 20 mM e 1 mM, respectivamente. Tais concentrações foram definidas a partir de testes realizados com diferentes concentrações, sendo utilizadas as que apresentaram melhor resposta em relação ao movimento estomático e à

atividade de enzimas antioxidantes. A cada solução foi adicionado 0,1% de Triton-X para auxiliar na absorção pelas folhas pulverizadas. Como controle foram empregadas plantas não-pulverizadas. Antes das pulverizações (tempo inicial) e de hora em hora durante quatro horas após as pulverizações, foram realizadas leituras de condutância estomática e taxa transpiratória através de porômetro de difusão modelo Steady State Porometer, Licor1600M, e nos mesmos períodos, coletadas folhas do terceiro par completamente expandido para posterior avaliação da atividade das enzimas APX, CAT, GR e SOD.

Para determinar a atividade enzimática foram utilizados 200 mg de tecido foliar. O material foi macerado em  $N_2$  líquido acrescido de 50% de Polivinilpolipirrolidona (PVPP) insolúvel, suficiente para evitar oxidação do material, e homogeneizado em 1,5 mL do tampão de extração (fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0; EDTA 0,1 mM; e ácido ascórbico 10 mM). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante coletado e dessalizado em Coluna Sephadex G-25 (PD-10). A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi realizada segundo Nakano & Asada (1981), monitorando a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação incubado a 28 °C foi composto de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, ácido ascórbico 0,5 mM e  $H_2O_2$  0,1 mM.

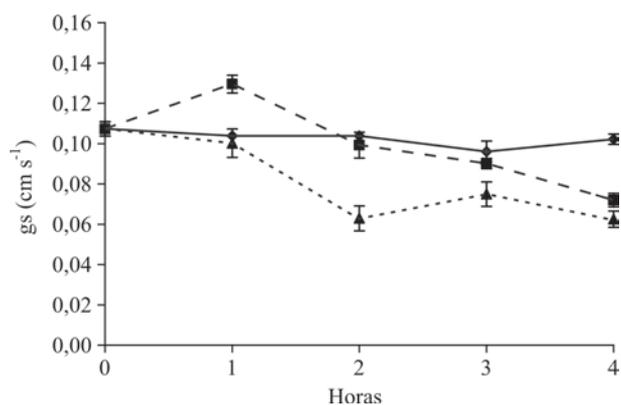
A atividade da catalase foi estimada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm durante 2 min em um meio de reação contendo fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 e  $H_2O_2$  12,5 mM (Havir & McHale, 1987). A atividade da redutase da glutatona (GR), foi obtida com base no método de Cakmak *et al.* (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH com decréscimo na absorbância a 340 nm por 2 min, sendo utilizado o meio de reação composto de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, glutatona oxidada (GSSG) 1 mM e NADPH 0,075 mM, que foi incubado a 28 °C. A atividade do superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (Giannopolitis & Ries, 1977) em um meio de reação composto por fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1  $\mu$ M, NBT 75  $\mu$ M e riboflavina 2  $\mu$ M. Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados por sete minutos em uma caixa com uma lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por período de avaliação. Cada repetição foi composta de uma planta.

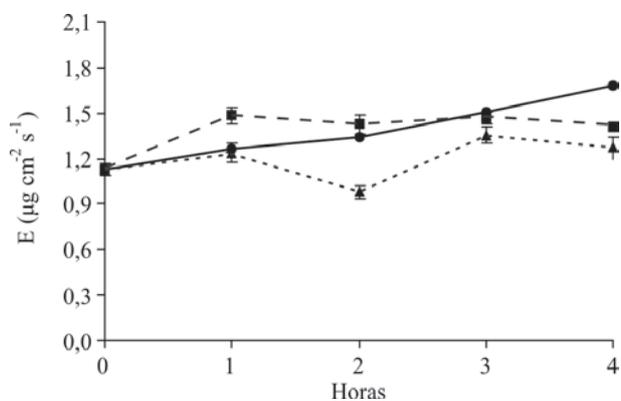
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não se observou diferença na condutância estomática para as plantas controle durante o período avaliado (Figura 1). Por outro lado, a aplicação exógena de  $H_2O_2$  nas plantas ocasionou redução da condutância estomática após a primeira hora da pulverização, mantendo essa menor condutância até o final do período de quatro horas de observação. A pulverização das folhas com ácido ascórbico ocasionou aumento da condutância estomática, ou seja, promoveu maior abertura dos estômatos imediatamente após sua aplicação, em comparação às plantas-controle. Porém, duas horas após sua aplicação, a condutância retornou a valores próximos aos observados para as plantas-controle, chegando, no último período de avaliação, a valores próximos aos observados para as plantas pulverizadas com  $H_2O_2$ .

A taxa transpiratória acompanhou o movimento estomático (Figura 2). Somente para as plantas controle, nas quais a condutância estomática não mostrou varia-



**Figura 1** - Condutância estomática em mudas de café após pulverização foliar com ácido ascórbico (Asc) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). —●— Controle (não-pulverizadas); —■— Asc (20 mM) e —▲—  $H_2O_2$  (1 mM). As barras representam o erro-padrão da média de três repetições.



**Figura 2** - Taxa transpiratória em mudas de café após pulverização foliar com ácido ascórbico (Asc) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). —●— Controle (não-pulverizadas); —■— Asc (20 mM) e —▲—  $H_2O_2$  (1 mM). As barras representam o erro-padrão da média de três repetições.

ção, a transpiração apresentou elevação linear do início para o final das avaliações. Já após a pulverização das plantas com  $H_2O_2$ , a transpiração teve comportamento semelhante ao observado para a condutância estomática ou seja, conforme diminuiu a condutância estomática a transpiração também diminuiu. Esse mesmo comportamento foi observado com a aplicação do ácido ascórbico; entretanto, de maneira contrária ao  $H_2O_2$ , o ácido ascórbico refletiu em aumentos da transpiração na primeira hora após sua aplicação, e para os períodos posteriores houve ligeira diminuição.

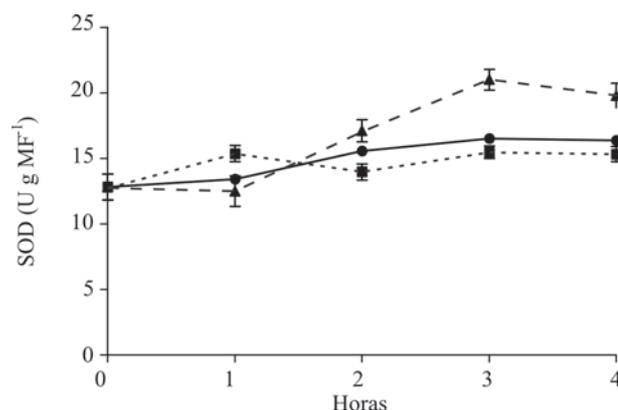
De maneira geral, observou-se que o  $H_2O_2$  teve maior efeito, tanto na condutância estomática quanto na transpiração duas horas após a sua aplicação. Para os períodos posteriores, seu efeito foi reduzido. Já o ácido ascórbico promoveu maiores efeitos na primeira hora após sua aplicação.

A produção de  $H_2O_2$  em tecidos vegetais ocorre em resposta a uma variedade de estímulos abióticos e bióticos. A indução do fechamento dos estômatos *in vivo* tem sido atribuída ao acúmulo de  $H_2O_2$  nas células-guarda em resposta ao ABA (Suhita *et al.*, 2004). Uma vez acumulado nas células, o  $H_2O_2$  ativa os canais de passagem de cálcio na membrana do vacúolo, aumentando a sua concentração no citosol (Kohler & Blatt, 2002), levando, com isso, a uma despolarização das células-guarda, efluxo de potássio, perda de turgor e, como consequência, fechamento dos estômatos (Schroeder *et al.*, 2001).

Zhang *et al.* (2001), estudando o efeito do  $H_2O_2$  no fechamento estomático em *Vicia faba*, verificaram que a sua aplicação exógena promoveu o fechamento dos estômatos de maneira dose-dependente, observando um fechamento 54% superior ao controle. Esses autores constataram, ainda, que a aplicação de ácido ascórbico reverteu o efeito do fechamento estomático induzido pelo  $H_2O_2$ . Por outro lado, em epiderme abaxial de *Arabidopsis*, Kolla *et al.* (2007) observaram recuperação apenas parcial na abertura dos estômatos quando da substituição do  $H_2O_2$  a 0,1 mM e 1 mM por água. Em baixas concentrações de  $H_2O_2$  (0,01 mM), a aplicação exógena de água em substituição a  $H_2O_2$  restabeleceu a abertura estomática.

Em relação às enzimas antioxidantes analisadas, para as plantas-controle não foi verificada diferença em suas atividades entre os períodos observados. Entretanto, quando as plantas foram pulverizadas com  $H_2O_2$ , a atividade da SOD (Figura 3) aumentou a partir da primeira hora de pulverização, permanecendo com valores acima dos observados nas plantas-controle até o final das avaliações. Por outro lado, após a aplicação do ácido ascórbico, a SOD permaneceu durante todo período de avaliação com atividade próxima à observada nas plantas-controle.

A produção de EROs parece ser um evento dinâmico durante o desenvolvimento vegetal, bem como uma res-



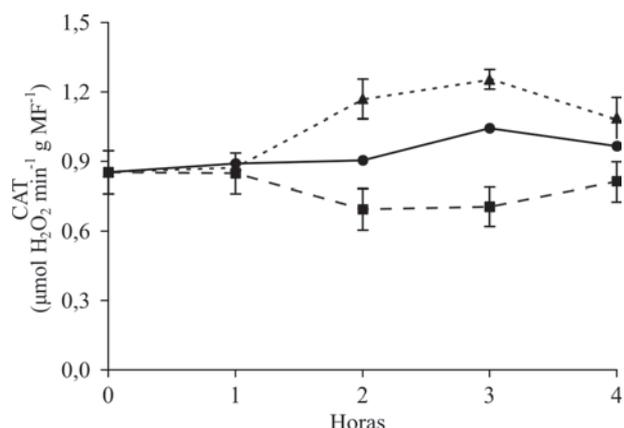
**Figura 3** - Atividade específica do superóxido dismutase (SOD) em mudas de café após pulverização foliar com ácido ascórbico (Asc) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). —●— Controle (não-pulverizadas); -■- Asc (20 mM) e -▲-  $H_2O_2$  (1 mM). As barras representam o erro-padrão da média de três repetições.

posta da planta a estresses bióticos e abióticos (Apel & Hirt, 2004). Gomes-Junior *et al.* (2006), estudando o metabolismo antioxidante em café em resposta ao cádmio, observaram aumento na atividade da SOD, que parece ser importante mecanismo para evitar o estresse oxidativo causado pelo cádmio. A SOD é a única enzima cuja atividade pode afetar a concentração celular de  $O_2^{\bullet -}$  e  $H_2O_2$ , fazendo parte do primeiro ajuste de tolerância das plantas ao estresse oxidativo; porém o  $H_2O_2$ , produto da ação dessa enzima, é também uma EROs e seu acúmulo é tão prejudicial quanto ao do superóxido (Gratão *et al.*, 2005).

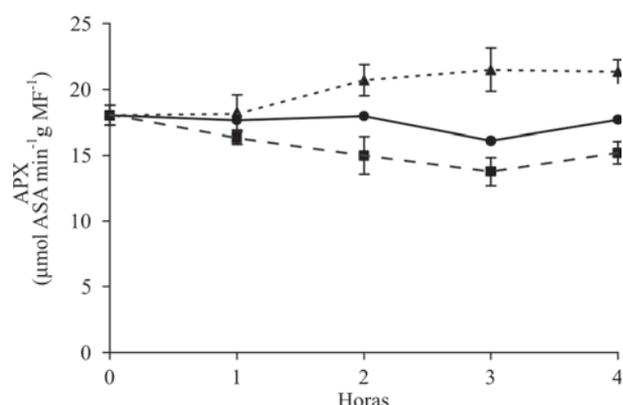
Uma vez que a ação da SOD resulta na formação de  $H_2O_2$ , ela está também intimamente ligada com a atividade da catalase e peroxidases, as quais eliminam o  $H_2O_2$ ; mantendo, portanto, a interação com essas e outras enzimas antioxidantes para garantir um balanço altamente otimizado, de forma a reduzir o risco de danos oxidativos (Gomes-Junior, 2006).

Nas plantas pulverizadas com  $H_2O_2$ , as enzimas CAT (Figura 4) e APX (Figura 5), mostraram comportamento semelhante ao observado para a SOD, que teve sua atividade aumentada a partir da primeira hora de exposição ao  $H_2O_2$ , permanecendo esta acima daquela observada nas plantas controle até o final do experimento. Por outro lado, quando as plantas foram pulverizadas com ácido ascórbico, as atividades da CAT e da APX foram inferiores às observadas nas plantas-controle. A rápida elevação das atividades da CAT e da APX parece ser um importante mecanismo de proteção contra as EROs, associado à elevação do nível de  $H_2O_2$  pelo aumento na atividade da SOD ou pela fonte de  $H_2O_2$  exógena, já que o  $H_2O_2$  é o substrato dessas enzimas.

Em células de café, Gomes-Junior *et al.* (2006) observaram rápido aumento na atividade da APX mediante tratamento com  $NiCl_2$ , embora a atividade tenha sido ligeiramente diferente entre as duas concentrações de  $NiCl_2$  uti-



**Figura 4** – Atividade específica da catalase (CAT) em mudas de café após pulverização foliar com ácido ascórbico (Asc) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). —●— Controle (não-pulverizadas); —■— Asc (20 mM) e —▲—  $H_2O_2$  (1 mM). As barras representam o erro-padrão da média de três repetições.

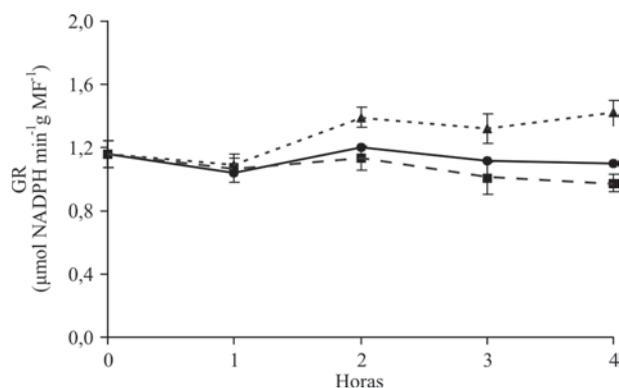


**Figura 5** – Atividade específica da ascorbato peroxidase (APX) em mudas de café após pulverização foliar com ácido ascórbico (Asc) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). —●— Controle (não-pulverizadas); —■— Asc (20 mM) e —▲—  $H_2O_2$  (1 mM). As barras representam o erro-padrão da média de três repetições.

lizadas. Aumentos na atividade da APX também foram demonstrados em raízes de *Zea mays* (Baccouch *et al.*, 2001).

De forma semelhante à das demais enzimas, a atividade da GR (Figura 6) também aumentou quando as plantas foram pulverizadas com  $H_2O_2$ . Em plantas pulverizadas com ácido ascórbico, a atividade da GR manteve-se igual à observada nas plantas controle. Essa enzima, por ser componente do ciclo ascorbato-glutationa, tem sua atividade aumentada, devido à sua atuação na reciclagem do ascorbato (Gratão *et al.*, 2005).

Segundo Chen & Gallie (2004), mudanças diurnas no estado redox do ácido ascórbico e na concentração do  $H_2O_2$  são inversamente relacionadas, sugerindo a possibilidade de um contrapeso, ou seja, a alteração na concentração de um afetar a do outro. Esses fatores podem explicar a menor atividade das enzimas quando da aplicação do ácido ascórbico.



**Figura 6** – Atividade específica da glutatona redutase (GR) em mudas de café após pulverização foliar com ácido ascórbico (Asc) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). —●— Controle (não-pulverizadas); —■— Asc (20 mM) e —▲—  $H_2O_2$  (1 mM). As barras representam o erro-padrão da média de três repetições.

## CONCLUSÕES

A aplicação exógena de  $H_2O_2$  promove o fechamento dos estômatos e, conseqüentemente, diminui a taxa transpiratória de mudas de café.

Em café, o ácido ascórbico tem efeito contrário ao  $H_2O_2$ , promovendo a abertura estomática e assim aumentando a transpiração.

Em café, a atividade das enzimas antioxidantes é aumentada pela aplicação do  $H_2O_2$ .

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- Alfonsi RR (2000) Histórico climatológico da cafeicultura brasileira. Centro de Ecofisiologia e Biofísica do Instituto Agrônomo de Campinas. Informativo Garcafé, Graça, 5:52.
- Apel K & Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review and Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 55:373–379.
- Baccouch S, Chaoui A & El Ferjani E (2001) Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. Journal of Plant Nutrition, 24:1085–1097.
- Cakmak I, Dragana S & Horst M (1993) Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. Journal of Experimental Botany, 44:127–132.
- Chen Z & Gallie DR (2004) The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. Plant Cell, 16: 1143–1162.
- Fahl JI & Carelli ML (1994) Influência do sombreamento nas características fisiológicas envolvidas no crescimento de espécies de café. In: Simpósio Internacional Sobre Café Adensado, Londrina. Anais, Londrina: IAP. p. 289-290.

- Foyer CH & Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17:1866-1875.
- Giannopolitis CN & Ries SK (1977) Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59:309-314.
- Gomes-Junior RA, Moldes CA, Delite FS, Pompeu GB, Gratão PL, Mazzafera P, Lea PJ & Azevedo RA (2006) Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, 65:1330-1337.
- Gomes-Junior RA, Moldes CA, Delite FS, Pompeu GB, Gratão PL, Mazzafera P, Lea PJ & Azevedo RA (2006) Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44:420-429.
- Gratão PL, Polle A, Lea PJ & Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32:481-494.
- Havir EA & Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Physiologia Plantarum*, 84:450-455.
- Kohler B & Blatt MR (2002) Protein phosphorylation activates the guard cell Ca channel and is a prerequisite for gating by abscisic acid. *Plant Journal*, 32:185-194.
- Kolla VA, Vavasseur A & Raghavendra AS (2007) Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*. *Planta*, 225:1421-1429.
- Nakano Y & Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, Kyoto. 22:867-880.
- Schroeder JI, Kwak JM & Allen GJ (2001) Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410:327-330.
- Silvarolla MB, Mazzafera P & Fazuoli LC (2004) A naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature*, London, 429:826-826.
- Suhita D, Raghavendra AS, Kwak JM & Vavasseur A (2004) Cytoplasmic alkalization precedes ROS production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology*, 134:1536-1545.
- Zhang X, Zhang L, Dong F, Gao J, Galbraith DW & Song CP (2001) Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiology*. 126:1438-1448.