

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTRESSE OXIDATIVO EM CLONES DE SERINGUEIRA SOB  
ATAQUE DE ANTRACNOSE-DAS-FOLHAS**

**MAÍRA DOS SANTOS FIORI**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Ciência Florestal

BOTUCATU-SP

Setembro – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTRESSE OXIDATIVO EM CLONES DE SERINGUEIRA SOB  
ATAQUE DE ANTRACNOSE-DAS-FOLHAS**

**MAÍRA DOS SANTOS FIORI**

Orientadora: Profª Drª Ana Catarina Cataneo

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências Agronômicas da UNESP – Campus  
de Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Ciência Florestal

BOTUCATU-SP

Setembro – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Fiori, Maíra dos Santos, 1984-  
F519e Estresse oxidativo em clones de seringueira sob ataque de antracnose-das-folhas / Maíra dos Santos Fiori. - Botucatu : [s.n.], 2011  
xii, 83 f. : il. color, gráfs., tabs., fots.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011  
Orientador: Ana Catarina Cataneo  
Co-orientador: Edson Luiz Furtado  
Inclui bibliografia

1. Antracnose. 2. Enzimas antioxidantes. 3. Plantas - Efeito da tensão. 4. Seringueira. I. Cataneo, Ana Catarina. II. Furtado, Edson Luiz. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS  
CAMPUS DE BOTUCATU

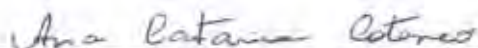
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ESTRESSE OXIDATIVO EM CLONES DE SERINGUEIRA SOB ATAQUE  
DE ANTRACNOSE-DAS-FOLHAS"

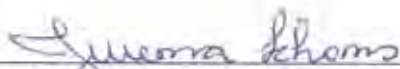
ALUNA: MAÍRA DOS SANTOS FIORI

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA CATARINA CATANEO

Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFA. DRA. ANA CATARINA CATANEO



PROFA. DRA. JUREMA SCHONS



PROFA. DRA. LUCIANA FRANCISCO FLEURI

Data da Realização: 02 de setembro de 2011.

*Para aquelas pessoas que fazem meu coração sorrir...*

*Para aquelas que sempre estiveram junto até mesmo quando eu não estava disposta...*

*Para as pessoas que me ajudaram a levantar quando tropecei...*

*Para as pessoas que fizeram a diferença em minha vida...*

*Para as pessoas que quando olho para trás, sinto muitas saudades...*

*Para as pessoas que me aconselharam e me ajudaram a entender coisas antes incompreensíveis...*

*Para as pessoas que abracei...*

*Para as pessoas que encontro todos os dias e não tenho a chance de dizer tudo o que sinto olhando nos olhos...*

*Para todas as pessoas essenciais na minha vida*

**DEDICO**

*Aos meus pais, Santa e Fiori por terem me apoiado sem qualquer restrição ao longo dos anos. Tudo o que fiz e ainda farei, será sempre oferecido a eles.*

*A meu marido, Samuel, pelo amor, carinho e apoio, que em muitos momentos foram decisivos e me fizeram seguir em frente.*

*A minha irmã, Daníla, por apoiar e incentivar a conquista dos meus sonhos.*

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a vida e a capacidade de enxergar sempre o caminho a seguir;

Aos meus pais, que sempre prezaram pela educação e me deram suporte para que mais essa etapa fosse completada.

A minha irmã Danila, pela amizade e cumplicidade.

Ao meu marido, Samuel, pela paciência, compreensão e companheirismo.

A minha orientadora, querida Professora Dra. Ana Catarina Cataneo, pela dedicação, estímulo constante e fonte de conhecimentos que me disponibilizou durante todo o trabalho;

A meu co-orientador Professor Dr. Edson Luiz Furtado, pela prontidão em sanar dúvidas, apoio e incentivo, disponibilização da casa de vegetação para desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Dr. José Raimundo e Danilo Scorzoni Ré, pela ajuda, e ensinamentos estatísticos;

A Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, Campus de Botucatu, pela minha formação e à coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciencia Florestal, pela oportunidade;

Ao viveiro POLIFER pelos clones cedidos.

A saudosa turma XV Florestal da UNESP;

A todos os docentes das disciplinas cursadas pelo programa;

As funcionárias da Seção de Pós-Graduação;

A todos os funcionários da biblioteca Prof. Paulo de Carvalho Mattos;

Aos colegas de Pós-Graduação pelo bom convívio e amizade, em especial a: Gisely e Giselaïne pela amizade e ajuda durante todo período.

Aos amigos de graduação: Siriguela, Moeda, Goró, Xiquinha, Ritinha, Zé, Pitta, C3, Cróvis, Caio, Kani, Bolor, Jaca, Berne, Merrek, Rô e muitos outros, que sempre me motivaram, e por todos os momentos de alegria e tristeza, tornando minha caminhada mais suave.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de auxílio através de bolsa de estudos.

Aos que participaram da banca de qualificação que auxiliaram com valiosas contribuições para a conclusão deste trabalho;

Àqueles que, mesmo não citados aqui, que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento de minha carreira e, em especial, desse trabalho.

A todos obrigada!



## SUMÁRIO

	<b>Páginas</b>
1. RESUMO.....	01
2. ABSTRACT.....	03
3. INTRODUÇÃO.....	05
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	08
4.1. A cultura da seringueira.....	08
4.2. Antracnose das folhas.....	10
4.3. Estresse oxidativo .....	13
4.3.1. Indicadores de estresse oxidativo.....	14
4.3.1.1. Lipoperóxidos.....	15
4.3.1.2. Açúcares solúveis.....	15
4.3.1.3. Pigmentos fotossintéticos.....	16
4.3.1.4. Peróxido de hidrogênio.....	17
4.4. Mecanismos de defesa.....	18
4.4.1. Enzimas antioxidantes.....	19
4.4.1.1. Glutathione S-transferases.....	20
4.4.1.2. Superóxido dismutases.....	20
4.4.1.3. Peroxidases.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. Objetivo Geral.....	22
5.2. Objetivos Específicos.....	22
6. MATERIAL E MÉTODO.....	23
6.1. Material vegetal e condução do experimento.....	23
6.2. Delineamento Experimental.....	25
6.3. Análises bioquímicas.....	26
6.3.1. Quantificação dos indicadores de estresse oxidativo.....	26
6.3.1.1. Lipoperóxidos.....	26
6.3.1.2. Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e redutores...	27
6.3.1.3. Pigmentos fotossintéticos.....	25

6.3.1.4 Peróxido de hidrogênio .....	30
6.3.2. Determinações enzimáticas.....	31
6.3.2.1. Obtenção dos extratos enzimáticos.....	31
6.3.2.2. Determinação da atividade da glutathione S-transferase.....	32
6.3.2.3. Determinação da atividade da superóxido dismutase.....	33
6.3.2.4. Determinação da atividade da pirogalol peroxidase.....	34
6.3.2.5. Determinação de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos.....	35
7. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	37
7.1. Indicadores de estresse oxidativo.....	38
7.1.1 Lipoperóxidos .....	38
7.1.2. Açúcares solúveis totais e redutores.....	40
7.1.3. Pigmentos fotossintéticos.....	44
7.1.4. Peróxido de hidrogênio.....	51
7.2. Enzimas antioxidantes.....	54
7.2.1. Atividade de Glutathione S-transferases.....	54
7.2.2. Atividade de Superóxido dismutases.....	56
7.2.3. Atividade de Peroxidase.....	58
8. CONCLUSÕES .....	62
9. REFERÊNCIAS .....	64

## LISTA DE TABELAS

	<b>Páginas</b>
<b>Tabela 1.</b> Comparação das Médias (*) (desvio padrão) dos teores de lipoperóxidos (nmol g <sup>-1</sup> massa fresca) em clones de <i>H. brasiliensis</i> nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por <i>C. gloeosporioides</i> .	39
<b>Tabela 2.</b> Comparação das Médias (*) (desvio padrão) dos teores de açúcares solúveis redutores (% na matéria seca) em clones de <i>H. brasiliensis</i> nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por <i>C. gloeosporioides</i> .	42
<b>Tabela 3.</b> Comparação das Médias (*) (desvio padrão) dos teores de açúcares solúveis totais (% na matéria seca) em clones de <i>H. brasiliensis</i> nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por <i>C. gloeosporioides</i> .	43
<b>Tabela 4.</b> Comparação das Médias (*) (desvio padrão) dos teores de clorofila total (µg g <sup>-1</sup> de massa fresca) em clones de <i>H. brasiliensis</i> nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por <i>C. gloeosporioides</i> .	46
<b>Tabela 5.</b> Comparação das Médias (*) (desvio padrão) dos teores de clorofila <i>a</i> (µg g <sup>-1</sup> de massa fresca) em clones de <i>H. brasiliensis</i> nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por <i>C. gloeosporioides</i> .	47
<b>Tabela 6.</b> Comparação das Médias (*) (desvio padrão) dos teores de clorofila <i>b</i> (µg g <sup>-1</sup> de massa fresca) em clones de <i>H. brasiliensis</i> nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por <i>C. gloeosporioides</i> .	48
<b>Tabela 7.</b> Comparação das Médias (*) (desvio padrão) dos teores de carotenóides (µg g <sup>-1</sup> de massa fresca) em clones de <i>H. brasiliensis</i> nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por <i>C. gloeosporioides</i> .	50
<b>Tabela 8.</b> Comparação das Médias (*) (desvio padrão) dos teores de peróxido de hidrogênio (umol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> matéria fresca) em clones de <i>H.</i>	53

*brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

**Tabela 9.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) da atividade da glutationa S-transferase ( $\mu\text{mol mg}^{-1}$  proteína  $\text{min}^{-1}$ ) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 55

**Tabela 10.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) da atividade da superóxido dismutase ( $\text{U mg}^{-1}$  mg proteína $^{-1}$ ) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 57

**Tabela 11.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) da atividade da peroxidase ( $\mu\text{mol purporogalina min}^{-1}$   $\text{mg}^{-1}$  proteína) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 59

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
<b>Figura 1.</b> Sintomas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Folha; Fruto e Pannel de sangria.	11
<b>Figura 2.</b> Aspecto das colônias de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em meio BDA Difco®	24
<b>Figura 3.</b> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> observados no microscópio ótico em câmara de Neubauer.	25
<b>Figura 4.</b> Esquema da técnica da determinação do conteúdo Lipoperóxidos	27
<b>Figura 5 .</b> Esquema da técnica da determinação do conteúdo açúcares solúveis	28
<b>Figura 6.</b> Esquema da técnica da determinação do conteúdo açúcares solúveis redutores.	28
<b>Figura 7.</b> Esquema da técnica da determinação do conteúdo açúcares solúveis totais.	29
<b>Figura 8.</b> Esquema da técnica da determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos.	30
<b>Figura 8.</b> Esquema da técnica da determinação do conteúdo de peróxido de hidrogenio.	31
<b>Figura 10.</b> Esquema da técnica da determinação dos extratos enzimáticos	32
<b>Figura 11.</b> Esquema da técnica da determinação Glutathiona S-transferase.	33
<b>Figura 12.</b> Esquema da técnica da determinação da atividade da superóxido dismutase.	34
<b>Figura 13.</b> Esquema da técnica da determinação da atividade da pirogalol peroxidase.	35
<b>Figura 14.</b> Esquema da quantificação dos teores de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos.	36
<b>Figura 15 –</b> Teores de lipoperóxidos em clones de <i>H. brasiliensis</i> nos	40

períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

**Figura 16** – Teores de açúcares solúveis redutores em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 43

**Figura 17** – Teores de açúcares solúveis totais em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 44

**Figura 18** – Teores de clorofila total em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 46

**Figura 19** – Teores de clorofila *a* em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 47

**Figura 20** – Teores de clorofila *b* em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 48

**Figura 21** – Teores de carotenóides em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 50

**Figura 22** – Teores de peróxido de hidrogênio em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 53

**Figura 23** – Atividade da glutathione S-transferase em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 56

**Figura 24** – Atividade da superóxido dismutase em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 58

**Figura 25** – Atividade da peroxidase em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*. 60

## 1.RESUMO

As plantas defendem-se continuamente contra ataques de bactérias, vírus, fungos, invertebrados e outras plantas. O estresse oxidativo é um tipo de resposta fisiológica da planta após o reconhecimento do patógeno, podendo resultar em sintomas diversos, dependendo da sensibilidade, e dos mecanismos de defesa da planta hospedeira. Situações de estresse impostas por diversos fatores, como de estresse biótico, que resulta da ação de micro-organismos patogênicos, nematóides e artrópodes e de interações simbióticas bactéria/cianobactéria/fungo-planta, são de enorme relevância para o crescimento, desenvolvimento, produtividade e sobrevivência dos hospedeiros. A antracnose causada por *Colletotrichum gloeosporoides*, constitui um sério problema para a cultura da seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. De Juss) Müell. Arg.] no Estado de São Paulo. Este fungo ataca diversas partes da planta ou atua como saprófita associado a outros patógenos, prejudicando o crescimento, desenvolvimento e a produtividade. Foram analisadas alterações bioquímicas em folhas de mudas de três clones de seringueira RRIM 600, GT1 e PR255 infectadas pelo fungo *C. gloeosporoides*, observando os indicadores de estresse oxidativo (lipoperóxidos, peróxido de hidrogênio, pigmentos fotossintéticos e açúcares solúveis) e enzimas antioxidantes (glutathione S-transferase- GST, superóxido dismutase-SOD e peroxidase-POD) relacionadas com proteção contra estresse. Neste trabalho foi observado que a infecção por *C. gloeosporoides* em plantas *H. brasiliensis* causa estresse oxidativo, detectado pelo aumento dos teores de peróxido de hidrogênio, acúmulo de carboidratos solúveis e degradação dos teores de clorofila

*a*, *b* e total. A elevação da atividade das enzimas antioxidantes, GST, SOD e POD nos clones de seringueira foi decorrente de uma resposta, frente à infecção por *C. gloeosporoides*, porém, este aumento não foi suficiente para evitar o estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** enzimas antioxidantes, indicadores de estresse, *Hevea brasiliensis*



ESTRESSE OXIDATIVO DE DIFERENTES CLONES DE SERINGUEIRA (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) SOB ATAQUE DE ANTRACNOSE-DAS-FOLHAS (*Colletotrichum gloeosporioides*): AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS. Botucatu, 2011. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: MAÍRA DOS SANTOS FIORI

Advisor: ANA CATARINA CATANEO

Co-advisor: EDSON LUIZ FURTADO

## 2. SUMMARY

Plants defend themselves against attacks by continuously bacteria, viruses, fungi, invertebrates and plants. Oxidative stress is a type of physiological response of plants after pathogen recognition and may result in various symptoms, depending on the sensitivity of the host and the mechanisms of plant defense. Situations of stress imposed by various factors such as the examples of biotic stress, which results from the action of pathogenic microorganisms, nematodes and arthropods and symbiotic interactions of bacteria / cyanobacteria / plant-fungus are of great significance to the level of growth, development, productivity and survival of the hosts. The anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporoides*, is a serious problem for the cultivation of rubber [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. De Juss) Müell. Arg.] in São Paulo State. This fungus attacks the plant parts or acts as a saprophyte associated with other pathogens hampering growth, development and productivity. It was analyzed biochemical changes in leaves of seedlings of three tree clones RRIM 600, PR255 GT1 and infected by *C. gloeosporoides*, such as, indicators of oxidative stress (lipoperoxides, hydrogen peroxide, photosynthetic pigments and soluble sugars) and antioxidant enzymes (glutathione S-transferase-GST, superoxide dismutase-SOD and peroxidase-POD) related to protection against stress. In this study it was observed that infection with *C. gloeosporoides* in plants of *H. brasiliensis* causes oxidative stress, detected by the increase of hydrogen peroxide and

soluble carbohydrates and degradation of total chlorophyll, chlorophyll a and b. The increase in activity of antioxidant enzymes, GST, SOD and POD in rubber clones was due to a response against the infection by *C. gloeosporoides*, however, this increase was not sufficient to prevent oxidative stress.

**Keywords:** antioxidant enzymes, stress indicators, *Hevea brasiliensis*

### 3. INTRODUÇÃO

O cultivo da seringueira (*Hevea brasiliensis*) é um dos mais importantes do Brasil, podendo ser utilizado para reflorestamento, recuperação de áreas degradadas e em sistemas agroflorestais. Portanto, a elucidação dos processos fisiológicos provocados por estresse e das respostas de plantas de seringueira sob ataque do patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* é de extrema importância para o esclarecimento dos mecanismos protetores contra este tipo de estresse, possibilitando o uso desse conhecimento para o melhoramento genético, justificando assim este trabalho.

As plantas constantemente estão submetidas aos variados tipos de estresses, independente de sua localização geográfica e climática. O estresse é considerado como um desvio significativo de condições ótimas para a vida e induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo, as quais são reversíveis a princípio, mas podem se tornar permanentes (LARCHER, 2000).

Salisbury e Ross (1991) apontaram a importância de definir corretamente o conceito de ambiente estressante, estabelecendo a idéia de que algum fator do ambiente é sensivelmente diferente do ambiente ideal e, portanto, induz alterações no metabolismo do organismo, que podem levar ao aparecimento de uma resposta a esse fator de estresse.

O estresse em plantas é numeroso e afeta espécies ou variedades, além de localizações específicas. Embora ocorram estresses abiótico e biótico, ambos se relacionam e um acaba afetando ao outro. O primeiro inclui drogas, extremos de temperaturas, alta salinidade, deficiência nutricional, escassez de água, toxicidade por metais, poluentes e radiação ultravioleta-B (SMINORFF, 1998). O segundo é comum em densas coberturas vegetais e onde os animais e micro-organismos utilizam-se delas. Além disso, fatores antropogênicos são responsáveis pela indução de estresse físicos, mecânicos e químicos, como os poluentes (LARCHER, 2000).

O estresse biótico caracterizado pela interação entre plantas e patógenos causa danos às culturas, reduzindo a colheita e seu valor, podendo ocasionar a morte em parte ou em todo o vegetal. Porém, as plantas possuem mecanismos de reparo e aclimação como proteção aos fatores de estresse, por exemplo, a presença de cera, cutícula espessa, tecidos suculentos, folhas anatômica e/ou fisiológica modificada e enzimas antioxidantes (GASPAROTO, 1997).

A antracnose ocorre no Norte do Brasil associada ao mal-das-folhas ou em plantas com estresse nutricional. Em latitude mais elevada, esta doença acarreta danos severos em brotações novas, causando seca descendente e lesionando folhas, inflorescências e ponteiros. Foi constatada inicialmente no estado de São Paulo em 1987, e recentemente pode ser também encontrada nos Estados de MS, PR, MG e ES (FURTADO; TRINDADE, 2005).

A antracnose da seringueira, causada por *Colletotrichum gloeosporoides*, constitui um sério problema para a cultura da seringueira no Estado de São Paulo; sendo que este fungo ataca diversas partes da planta ou atua como saprófita associado a outros patógenos (FURTADO; SILVEIRA, 1992). No Estado de São Paulo verificou-se a sua ocorrência em folhas, ramos e inflorescência (SILVEIRA; CARDOSO, 1987), em hastes e placas de enxerto em jardim clonal e viveiros (FURTADO; SILVEIRA, 1992) e, finalmente, em painéis de sangria.

Em folhas, ramos e pecíolos, os sintomas manifestam-se nas brotações novas, em plantas de várias idades, causando pequenas lesões arredondadas de coloração marrom-avermelhada que podem coalescer. Nos pecíolos e ramos, provocam lesões escuras, necróticas e deprimidas. Sob ataque severo ocorre desfolhamento, morte da gema apical e seca descendente do ramo. O patógeno é comum em diversos hospedeiros, o que favorece sua

sobrevivência e dificulta seu controle. Os conídios germinam em 4 a 6 horas em água livre e os sintomas aparecem 3 dias após a inoculação. A esporulação ocorre após o quinto dia. A disseminação dá-se principalmente, através da água da chuva, não se descartando a possibilidade de ser transferido planta a planta. Condições climáticas que favorecem a doença são temperatura média de 21°C, e umidade relativa acima de 90% em um período treze horas (FURTADO; TRINDADE, 2005).

A necessidade de novas cultivares de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex ADR. de Juss.) Müell. Arg.], adaptáveis às diferentes regiões ecológicas constitui-se em uma estratégia importante para o sucesso da heveicultura. Cultivares tidas como produtivas em algumas regiões do Brasil, podem comportar-se diferentemente em outras áreas da mesma região, principalmente àquelas sujeitas a diferentes características edafoclimáticas. Segundo Pushparajah (1980) e Ortolani et al. (1996), vários elementos agroclimáticos tais como déficits hídricos, temperatura e pluviosidade que afetam vários componentes do crescimento e produção contribuem com uma grande soma de variabilidade no comportamento das cultivares.

Um clone se constitui de um grupo de plantas obtidas através da propagação vegetativa de uma planta matriz. Todas as árvores de um clone possuem a mesma constituição genética, responsável pela uniformidade existente entre elas (GONÇALVES, 1998). Em adição, partindo-se da observação de que, dentre os diferentes clones de *H. brasiliensis* há aqueles que, espontaneamente, são resistentes ou suscetíveis a *C. gloeosporioides*.

Desta forma este estudo visou identificar alguns aspectos bioquímicos envolvidos no mecanismo de interação planta – patógeno, envolvendo três clones de *H. brasiliensis* (GT1, RRIM 600 e PR 255).

Este trabalho visa contribuir para o conhecimento e a resposta de diferentes clones de seringueira infectados por antracnose-das-folhas, avaliando as alterações bioquímicas relacionados ao estresse oxidativo. A avaliação é importante para o esclarecimento dos mecanismos protetores contra este tipo de estresse.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. A cultura da seringueira

*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex. Adr. De Juss) Muell-Arg.) é uma espécie arbórea pertencente à família Euphorbiaceae, nativa da região amazônica, podendo atingir até 40 m de altura, embora em condições de cultivo alcance 15 a 20 m. Possui a maior capacidade produtiva de látex e variabilidade genética para a resistência a doenças, dentre todas as outras 11 espécies pertencentes ao gênero *Hevea*. Seu principal produto, o látex, é a base para a produção da borracha natural, produto largamente utilizado na fabricação de pneumáticos e em grande número de manufaturados; matéria prima fundamental para o agronegócio brasileiro.

Apesar do crescimento na produção mundial de látex entre os anos 2003 e 2005, há um déficit de produção de 60 milhões de toneladas (INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP, 2006), situação que deve manter-se nos próximos anos, retratando a importância da expansão das áreas de cultivo, tornando-se um crescente e promissor negócio à agricultura brasileira.

A área total estimada de seringueira plantada no globo é superior a 9 milhões de hectares, tradicionalmente cultivada na região equatorial, situada entre 10° Norte e 10° Sul do Equador.

No Brasil, a história da produção da borracha vegetal mostra que o País desfrutou da condição de principal produtor e exportador mundial no final do século

passado e início do atual, passando a ser importador desta matéria-prima a partir de 1950. Ressalta-se, também, que em 1998, a produção brasileira foi estimada em 70 mil toneladas, para um consumo de 195 mil toneladas, e que, menos de 5% da borracha produzida no país foi proveniente de seringais nativos (FURTADO; TRINDADE, 2005).

Para um país que possui, em relação aos demais produtores, área apta, incomparavelmente maior, para o plantio de seringueira, o déficit de produção significa, no mínimo, descaso para um produto estratégico de tão alto valor econômico-social.

Quando teve início sua domesticação na Ásia (GONÇALVES et al., 1983), a seringueira foi considerada mais uma espécie selvagem da Amazônia. A partir desse período, o melhoramento genético tem contribuído para seu desenvolvimento, elevando o nível da produção de 400 kg para 2.500 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de borracha seca.

Hibridações seletivas entre clones superiores de seringueira, seguidas da multiplicação vegetativa do ortete (árvore matriz), seleção e posterior avaliação, têm sido a base do melhoramento genético no Estado de São Paulo. Devido ao longo ciclo do melhoramento, aproximadamente na década de 50 (GONÇALVES et al., 1988), esforços no sentido de sua redução incluem o desenvolvimento de métodos de seleção precoce, redução dos ciclos de seleção e exploração do potencial dos parentais.

Neste trabalho serão utilizadas plantas de três clones de *H. brasiliensis*, RRIM 600, PR 255 e GT1. Dentre estes, o clone mais resistente ao ataque de antracnose é o RRIM600. O clone PR255 é considerado de resistência moderada e o GT1 suscetível a doença.

O clone RRIM 600 foi desenvolvida pelo Rubber Research Institute of Malaysia, apresenta indivíduos altos, fuste ereto e de crescimento rápido quando jovem, copa é estreita e folhagem esparsa com folhas verde claras. Devido à formação de ramos tardiamente, pode ocorrer a quebra das plantas, por ação de ventos. Possui casca fina, tornando-o delicado à sangria, porém é de rápida regeneração. Destaca-se pela alta produtividade e também pela tendência de produção crescente. O látex é branco e impróprio para concentração devido à baixa estabilidade mecânica (GONÇALVES, 1998).

O clone PR 255, desenvolvido pela Proefstation voor rubber, na Indonésia, é de alta produção e possui bons caracteres secundários. O vigor no período de imaturidade é bom assim como o incremento médio do caule na fase adulta. Possui caule alto

e reto e sua copa é densa e balanceada. A produção obtida de ensaios experimentais na Malásia, por 15 anos de sangria foi em torno de  $2.020 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ . No estado de São Paulo, a média de produção em cinco anos de sangria foi de  $1.806 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ . A incidência de queda de folha causada por antracnose, bem como a ocorrência de seca do painel é moderada (GONÇALVES; MARQUES, 2008).

O clone GT 1 foi desenvolvida na Indonésia, tem caule bem vertical e pode apresentar irregularidades como estrias ou torsões na região do enxerto. A abertura de sua copa é bastante tardia e de hábito variável, pois algumas árvores não apresentam galhos líderes. Não apresenta problemas com a sangria devido à espessura da casca ser média e também bastante tenra. É uma cultivar muito homogênea, de alta produtividade e demonstra tendência ao aumento de produção com o passar do tempo. Devido à sua precocidade, rusticidade e qualidades agronômicas pode ser utilizada por pequenos heveicultores do planalto paulista (GONÇALVES, 1998).

#### **4.2. Antracnose das folhas**

A cultura de *H. brasiliensis* pode ser afetada por várias doenças, as quais incluem o mal-das-folhas, o oídio e a antracnose. A antracnose causada pelo patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* manifesta-se em folhas imaturas, ramos, frutos e no painel.

Os primeiros registros da antracnose na seringueira foram feitos por Petch (1906) no Sri Lanka (ex – Ceilão), e na Malásia (JOHN, 1952). Na Malásia esta doença é conhecida como “Gloeosporium leaf disease” (WASTIE, 1973). Sua ocorrência é verificada praticamente em todos os países onde a seringueira é cultivada. No Brasil, a antracnose ocorre com maior severidade nos estados da região Norte, todavia, apenas na forma de surtos esporádicos, ou eventuais, em viveiro, jardim clonal e plantio definitivo, causando lesões foliares, desfolhamento e mortalidade de ramos e galhos (FURTADO; TRINDADE, 2005).

O ataque de *C. gloeosporioides* ocorre principalmente em folhas jovens, normalmente consistindo em lesões foliares resultando em desfolhamentos severos e secamento de ponteiros, também observa-se como sintomas ao ataque deste fungo necrose de casca e podridão de frutos verdes (Figura 1).





**Figura 1.** Sintomas de *Colletotrichum gloeosporioides* Folha; Fruto e Paniel de sangria.

No Brasil o primeiro relato de *C. gloeosporioides* no estado de São Paulo foi em 1987, no município de Porto Feliz. Nos anos seguintes, os povoamentos de seringueira do Planalto Paulista vêm apresentando surtos de antracnose nas folhas e no painel de sangria (FURTADO; SILVEIRA, 1990; SILVEIRA et al., 1992). No ano de 2005 foi constatado que a doença assumiu caráter epidêmico em plantios no estado de São Paulo (FURTADO; TRINDADE, 2005). Este patógeno foi apontado como um dos principais agentes causadores da queda anormal das folhas em diversas regiões da Malásia, Sri Lanka, Índia, Tailândia, Indonésia e África (WASTIE, 1975).

As seguintes espécies fúngicas foram relatadas em *Hevea spp.* como causadores da antracnose: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., *C. derridis* van Hoof, *C. ficus* Koord., *Gloeosporium albo-rubrum* Petch, *G. brunneum* Petch, *G. elasticae* Chee e Maas e *G. heveae* Petch. Carpenter e Stevenson (1954), citado por Ferreira (1989). Esses pesquisadores estudaram as descrições dessas espécies e concluíram que todas poderiam ser consideradas como *C. gloeosporioides*.

O agente causador da antracnose da seringueira é *Glomerella cingulata*, fungo da Divisão Ascomycota, Ordem Diaphortales, que na fase anamórfica corresponde ao fungo *C. gloeosporioides*. O patógeno é comum a diversos hospedeiros, o que favorece a sobrevivência e dificulta o controle. Os conídios germinam em 4 a 6 horas em água livre. Os sintomas aparecem três dias após a inoculação e a esporulação ocorre após o quinto dia. A disseminação dá-se, principalmente, através da água da chuva, não se descartando a possibilidade de ser transmitido planta a planta por intermédio da faca de sangria. Condições climáticas que favorecem a doença são temperatura média de 21 °C, umidade relativa acima de 90% por 13 horas e períodos chuvosos (FURTADO; TRINDADE, 2005).

As lesões podem ocorrer também nos pecíolos, sendo mais alongadas naqueles órgãos. Nos frutos, as lesões causam rachaduras e apodrecimento na casca e nos ramos verdes, as infecções geralmente ocorrem nas suas inserções com o galho. Quando as condições ambientais são favoráveis, as lesões desenvolvem-se rapidamente, causando quebra de ramos na base, à altura dos locais lesionados, enquanto seus folíolos permanecem completamente verdes. De certa forma, nos ramos, essa doença pode ser confundida com o ataque de *Phytophthora* spp. Em geral, nas lesões de *C. gloeosporioides* podem ser observadas massas róseas, provenientes de abundante esporulação conidial do patógeno que sai dos acérvulos (GASPAROTTO, 1997).

Quanto aos danos, pode-se citar em viveiro e no jardim clonal, a morte de hastes destinadas à produção de gemas para enxertia, baixo descolamento de casca, além de provocar redução do pegamento da enxertia, devido às placas do enxerto estarem infectadas. No ponto de enxertia o patógeno se desenvolve rapidamente sob o plástico de proteção do enxerto, matando os tecidos do mesmo e lesionando também o porta enxerto. Em seringais adultos causam desfolhamento intenso e seca de ramos, debilitando as plantas e provocando atraso na recuperação da copa, com isso, atrasando o reinício da sangria, além de facilitar a penetração de outros patógenos como *Phomopsis* sp. e *Botryodiplodia* sp. (SILVEIRA et al., 1992b).

De um modo geral, as infecções são capazes de induzir desordens na célula vegetal, que incluem alterações na fotossíntese, respiração, atividades enzimáticas, no transporte de fotoassimilados e balanço hormonal. Acontece uma verdadeira “batalha” metabólica nas plantas suscetíveis e o patógeno passa a controlar parte do metabolismo da célula parasitada. Todo esse processo infeccioso resultará em queda de produtividade da cultura e conseqüentemente em efeitos negativos na quantidade e qualidade do produto.

A interação entre planta e patógeno pode ter efeito no desenvolvimento e na morfologia do hospedeiro (MORIONDO et al., 2005), no entanto, é evidenciado uma enorme variedade interespecífica em resposta ao estresse biótico (LUCAS, 1998). Vários parâmetros morfológicos e fisiológicos podem ser alterados na interação planta-patógeno, como massa seca, fenologia (SADRAS et al., 2000), crescimento e área foliar das plantas (MORIONDO et al., 2005).

### 4.3. Estresse oxidativo

As plantas defendem-se continuamente contra ataques de bactérias, vírus, fungos, invertebrados e também de outros vegetais. O estresse oxidativo é um tipo de resposta fisiológica da planta após o reconhecimento do patógeno, podendo resultar em sintomas nas plantas dependendo da sensibilidade do hospedeiro, e também relacionada a mecanismos de defesa.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) em condições ambientais naturais protegem as plantas, porém, sob condições de estresse são produzidas em grande quantidade, tornando-se tóxicas e capazes de causar efeitos deletérios através de reações de oxidação envolvendo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (STRID et al., 1994; BANDYOPADHYAY; BANERJEE, 1999). Aumento da produção das EROs tem sido relatado durante interações entre plantas e patógenos, o qual é o principal causador da peroxidação lipídica constituintes das membranas celulares, causando alterações das mesmas (ADAM et al., 1995).

Diversas situações de estresse levam à produção na célula das plantas da maioria das formas reduzidas:  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$  e a mais poderosa oxidante, o radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). Quando presente em quantidades relativas baixas, ERO e especialmente  $H_2O_2$  pode agir como sinais para a ativação de respostas de defesa contra o estresse (LEVINE et al., 1994; LOW; MÉRIDA, 1996). Porém, quantidades mais elevadas produzidas pela formação não controlada de EROs causam severa injúria, como desintegração de clorofila, fragmentação do DNA, extravasamento de íon, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (DODGE, 1994). A produção e os efeitos de EROs não são necessariamente delimitados dentro do mesmo compartimento celular. Além disso, fontes distintas parecem ser responsáveis pela produção de EROs sob as diferentes condições de estresse, como poluentes atmosféricos, herbicidas e metais, além de elevada temperatura e radiação (SMIRNOFF, 1993; BELIGNI; LAMATTINA, 1999).

A produção e acumulação de ânions  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  em parede celular tem sido relacionada à presença de agentes patogênicos (MARTINEZ et al., 1998). O ataque de

patógenos também pode induzir mudanças nos níveis de  $H_2O_2$ , levando a varias formas de respostas fisiológicas (YANG; POOVAIAH, 2002), como servir de mecanismo imediato para resistência às doenças e desempenhar um papel importante na resposta à apoptose de células (OROZCO-CARDENAS; RYAN, 1999).

#### **4.3.1. Indicadores de estresse oxidativo**

Uma alteração metabólica importante para as plantas em condições de estresse é o aumento da produção de EROs. Quantidades mais elevadas de EROs ocasionam o estresse oxidativo caracterizado por severas injúrias, como desintegração de clorofila, fragmentação do DNA, extravasamento iônico, modificações protéicas, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (MOLLER et al., 2007). A produção e os efeitos de EROs não são necessariamente delimitados dentro do mesmo compartimento celular. Além disso, fontes distintas parecem ser responsáveis pela produção de EROs sob as diferentes condições de estresse (SMIRNOFF, 1993). Não obstante, situações como extremos hídricos, metais pesados, radiação ultravioleta, poluentes atmosféricos, estresse mecânico, baixa disponibilidade de nutrientes, aleloquímicos, altas temperaturas, bem como ataque de patógenos podem induzir aumento da produção de EROs, promovendo a quebra da homeostase celular (PINHEIRO et al., 2002).

A produção contínua de EROs, conseqüência inevitável de processos metabólicos aeróbios como respiração e fotossíntese, gera a necessidade de evolução dos sistemas de proteção a fim de minimizar os efeitos fitotóxicos dessas espécies dentro da célula (APEL; HIRT, 2004).

O controle dos níveis endógenos de EROs tem aberto ampla possibilidade de serem usadas como moléculas sinalizadoras no crescimento, desenvolvimento, respostas a estresses e interações bióticas (RYTER; TYRREL, 1998; MITTLER et al., 2004), além de indicadora do nível de senescência (KAWANO et al., 1998; ABARCA et al., 2001; PASSARDI et al., 2004).

#### 4.3.1.1. Lipoperóxidos

A formação de lipoperóxidos, que é uma das conseqüências da produção de ERO, é um indicador utilizado para avaliar o nível de estresse oxidativo presente nas plantas (VERMA; DUBEY, 2003). A importância das EROs em causar alterações nos lipídios tem levado a inúmeras pesquisas para determinar o melhor marcador em tecidos biológicos (THÉRON et al., 2000).

Aumento dos teores de lipoperóxidos foram relatados em plantas submetidas a severo estresse hídrico (BAIASAK et al., 1995; CECHIN et al., 2008), altas temperaturas (BECANA et al., 2000), radiação UV (MALANGA; PUNTARULO, 1995), toxidez por cádmio e zinco (PRASAD et al., 1999) e aplicação de herbicidas (CATANEO et al., 2005; FERREIRA et al., 2010). Não obstante, pesquisas verificaram que metais como cobre, níquel, alumínio e cádmio induziram peroxidação de lipídios em *Silene cucubalus* (DEVOS et al., 1989), trigo (PANDOLFINI et al., 1992), soja (CAKMAK; HORST, 1991) e feijão (SOMASHEKARIAH et al., 1992). Em trabalho utilizando o fungicida oxiclreto de cobre em plantas de batata, Ferreira (2004) também observou aumento dos teores de lipoperóxidos, sendo este aumento diretamente proporcional à dose de fungicida utilizada.

#### 4.3.1.2. Açúcares solúveis

Existem outros indicadores bioquímicos para a detecção de estresse oxidativo nas plantas, dentre os quais, a quantificação de açúcares solúveis. Estas moléculas podem exercer sinais e respostas de defesa que são úteis para as plantas, por controlar o nível das EROs. Conseqüentemente, os açúcares solúveis podem regular a defesa contra vários estresses produtores de EROs (COUÉE et al., 2006). Além disso, a glicose, um açúcar solúvel redutor, é o principal precursor carbônico inicial para a síntese de carotenóides (PALLET; YOUNG, 1993) e de ascorbato (FOYER, 1993; SMIRNOFF et al., 2001), poderosos antioxidantes. Estes compostos estão envolvidos nas defesas contra o estresse oxidativo, por meio dos ciclos ascorbato-glutationa, na homeostase das reações de óxido-redução ou na desintoxicação de peróxidos (COUÉE et al., 2006).

Sarria Villa (2010) observou um incremento significativo na concentração de açúcar redutor em plantas de citrumelo Swingle inoculadas com os dois patógenos, *Phytophthora nicotianae* e *Phytophthora citrophthora*. Estudo com *Arabidopsis thaliana* mostrou que em folhas infectadas pelo *Albugo candida* houve aumento na concentração de açúcares solúveis totais (TANG et al., 1996).

#### 4.3.1.3. Pigmentos fotossintéticos

Sob condições de estresses as plantas podem sofrer mudanças no conteúdo dos pigmentos fotossintéticos através da indução de mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência nas plantas. A síntese de compostos, como as EROs, resulta em mudanças na translocação do carbono e do nitrogênio e, com isso, alterações no sistema fotossintético (ALDEA et al, 2006).

O ataque por patógenos nas plantas pode reduzir a absorção de luz visível, sugerindo mudanças nas características foliares (EL OMARI et al., 2001), como a destruição dos pigmentos fotossintetizantes, clorofilas *a* e *b*, causando redução da taxa de fotossíntese (SABRI et al., 1997). Redução na taxa fotossintética (TANG et al., 1996; SADRAS et al., 2000; EL OMARI et al., 2001; PSHIBYTKO et al., 2006) e na condutância estomática (SADRAS et al., 2000; EL OMARI et al., 2001) são relatadas sob estas condições de estresse. Tang et al. (1996) sugeriram que a redução da taxa da fotossíntese pode estar relacionada à redução do conteúdo de clorofila e/ou da enzima Rubisco, uma vez que os dados desta pesquisa evidenciaram não ter efeito na condutância estomática.

Pshibytko et al. (2006) relataram que em plantas de tomate o fungo *Fusarium wilt* influenciou a supressão da atividade fotossintética das plantas por alterações do centro de reação do fotossistema II, supressão do transporte de elétrons e diminuição da atividade da enzima Rubisco. Sabri et al (1997) observaram alterações nos pigmentos fotossintéticos, clorofilas *a* e *b*.

O conhecimento da maneira pela qual um fitopatógeno mobiliza e altera a fisiologia e o crescimento da planta hospedeira pode, ao mesmo tempo, auxiliar no

estabelecimento das bases de controle ou manejo das doenças e permitir a supressão ou diminuição dos danos causados às culturas.

#### 4.3.1.4. Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) celular é formado espontaneamente a partir dos radicais superóxidos gerados pelo fotossistema I (PSI), ou por reação catalisada pelo superóxido dismutase (SOD) (ARORA et al., 2002) e também durante o ciclo fotorrespiratório, com envolvimento da Rubisco (ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase) nos cloroplastos e pela oxidase do glicolato nos peroxissomos (APEL; HIRT, 2004). A Rubisco, sob baixa concentração de  $CO_2$ , catalisa uma reação competitiva em que o  $O_2$  é favorecido como substrato em relação ao  $CO_2$ , produzindo glicolato que é translocado dos cloroplastos para os peroxissomos, onde é oxidado a glioxilato e peróxido de hidrogênio, mediante catálise pela glicolato oxidase (APEL; HIRT, 2004).

O  $H_2O_2$  é um oxidante relativamente estável e ausente de carga, o que facilita sua passagem através da camada bilipídica na membrana celular e favorece a rápida elicitação da resposta vegetal (APOSTOL et al., 1989). Por ser um oxidante forte, pode iniciar o dano oxidativo nas células foliares levando à interrupção da função metabólica e perda da integridade celular, resultando em senescência (PRASAD et al., 1994), além de alterar o estado redox de células circundantes, com iniciação de uma resposta antioxidante agindo como um sinal de estresse oxidativo (PRASAD et al., 1994; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2000).

Até pouco tempo o  $H_2O_2$  era visto apenas como um composto tóxico para a célula, porém, atualmente, sabe-se que esta ERO é muito mais do que isso. O  $H_2O_2$  atua como uma molécula sinalizadora que controla diferentes respostas e estímulos, tanto em células animais, como vegetais (FINKEL, 2000). A geração de  $H_2O_2$  é aumentada em resposta a diferentes condições de estresse, sugerindo que este composto desempenha papel importante no processo de aclimação e tolerância cruzada, a qual, em exposição prévia a um determinado estresse pode induzir tolerância a subseqüentes exposições ao mesmo estresse ou a outro tipo diferente deste (NEILL et al., 2002).

O estresse oxidativo gerado a partir do ataque de fitopatógenos gera uma rápida síntese deste composto, com consecutiva liberação no apoplasto (BOLWELL, 1999). O real papel do  $H_2O_2$  no mecanismo de defesa de plantas ainda gera discussões. Sua participação na defesa de plantas contra o ataque de patógenos biotróficos é conhecida, atuando na indução da morte celular no local da infecção e, impedindo, assim, o crescimento e desenvolvimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro (PELLINEM et al., 2002).

#### 4.4. Mecanismos de defesa

Sob condições de estresse por patógenos, as plantas possuem mecanismos de defesa que podem ser passivos, ou seja, estruturas que previnem a colonização de tecidos, como cutícula cerosa, e mecanismos de defesa induzidos, como aumento da concentração citoplasmática de  $Ca^{+2}$ , geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), fitoalexinas, entre outros (KUC, 1982).

O acúmulo de substâncias ou estruturas pode ocorrer sob condições de estresse, que são formadas a partir dos carboidratos da via metabólica principal que são utilizados para o crescimento vegetativo, mas são desviados pelas plantas para a produção de metabólitos secundários (JANSEN et al., 2000). Um desses mecanismos protetores é a mudança nas concentrações de compostos fenólicos nas células epidérmicas das plantas (LIU et al., 2005), produzidos como uma resposta de defesa das plantas à patógenos (KYUNG et al., 2005), agindo contra as EROs (KYUNG et al., 2005).

Algumas plantas também podem acumular outros componentes sob condições de estresse, como açúcares solúveis. Estudo com *Arabidopsis thaliana* mostrou que em folhas infectadas pelo *Albugo candida* houve aumento na concentração de açúcares solúveis totais (TANG et al., 1996).

As diferentes espécies de plantas podem se proteger sob condições de estresse através de ajustamentos bioquímicos, porém a resposta mais comum são as EROs (AGRAWAL; RATHORE, 2007), as quais incluem ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila (BAKER; ORLANDI, 1995) e possuem papel crucial no



controle e regulação de processos biológicos como a morte celular programada, sinalização hormonal, resposta a estresse e defesa a patógenos (BOWLER, 1992).

Produção e acumulação de ânions  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  em parede celular tem sido relacionada à presença de agentes patogênicos (MARTINEZ et al., 1998). Aumento da produção de ânion  $O_2^{\bullet-}$ , foi observado em folhas de *Lycopersicon esculentum* durante as primeiras horas após a inoculação do *Oidium neolycopersici* (MLÍCKOVÁ et al., 2004). O ataque de patógenos também pode induzir mudanças nos níveis de  $H_2O_2$ , levando a uma variedade de respostas fisiológicas (YANG; POOVAIAH, 2002), como servir de mecanismo imediato para resistência às doenças e desempenhar um papel importante na resposta a apoptose de células (OROZCO-CARDENAS; RYAN, 1999).

As células das plantas, porém, são equipadas com um eficiente sistema de defesa antioxidante, como enzimas peroxidases, ascorbato peroxidase catalase, superóxido dismutase e uma variedade de moléculas que estão envolvidas neste mecanismo e removem as EROs pelo sistema de desintoxicação, proporcionando às células proteção contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo (TAYLOR et al., 2002).

#### **4.4.1. Enzimas antioxidantes**

O grau de estresse oxidativo em uma célula é determinado pela quantidade de  $H_2O_2$  e de radicais  $O_2^{\bullet-}$  e  $OH^{\bullet}$ . O sistema de defesa antioxidante das plantas inclui diversas enzimas localizadas nos diferentes compartimentos celulares. Dentre as principais enzimas pode-se destacar as glutathione S-transferases (GST), superóxido dismutases (SOD) e as peroxidases (POD) que, juntamente com outras enzimas promovem a eliminação de EROs. O balanço das atividades da superóxido dismutase e da peroxidase é crucial na supressão dos níveis tóxicos de EROs nas células (APEL; HIRT, 2004).

##### **4.4.1.1. Glutathione S-transferases**

As glutathione S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) são enzimas de desintoxicação por metabolizarem um ampla variedade de compostos exógenos tóxicos, chamados “xenobióticos”. São enzimas multifuncionais, compostas por duas subunidades, que catalisam a conjugação do tripeptídeo glutathione (GSH,  $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina) a uma variedade de substratos hidrofóbicos, eletrofílicos e geralmente citotóxicos. A adição de glutathione, via grupo tiol da cisteína à um sítio eletrofílico de um substrato xenobiótico, produz conjugados solúveis em água e com toxicidade reduzida (JEPSON et al., 1994; MARRS, 1996).

Além disso, as GSTs promovem a conjugação de GSH com produtos endógenos de dano oxidativo iniciados por radicais hidroxila citotóxicos, incluindo peróxidos de lipídios de membrana, tão bem como produtos de degradação oxidativa do DNA, que resultam em sua desintoxicação (DUDLER et al., 1991; BARLING et al., 1993).

#### **4.4.1.2. Superóxido dismutases**

As superóxido dismutases (SODs, EC 1.15.1.1) são metaloproteínas (Cu, Zn, Mg) que catalisam a dismutação de radicais superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio (BOWLER et al., 1992).

As SODs são ubíquas nos organismos aeróbicos, onde desempenham importante função na defesa contra a toxicidade causada por ERO, sendo desta forma consideradas importantes no mecanismo de tolerância ao estresse. Há três classes de SOD diferenciadas de acordo com o metal presente em seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn SODs), ferro (Fe-SODs) e manganês (Mn-SODs). As enzimas Fe-SODs estão presentes nos cloroplastos, enquanto que as Mn-SODs situam-se na matriz mitocondrial. As Cu/Zn SODs são normalmente encontradas no citosol, sendo que algumas plantas contêm uma isoforma nos cloroplastos (TSANG et al., 1991).

#### 4.4.1.3. Peroxidases

As peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) desempenham função na proteção contra o estresse oxidativo, onde catalisam a reação entre um agente redutor e o  $H_2O_2$ , para produzir um composto oxidado e água (IUBMB, 2007). Elas possuem uma variedade de isoformas, que usam diferentes redutores e estão localizadas em diferentes compartimentos celulares (CAMPA, 1991). Estas enzimas, além de apresentarem ação antioxidante, elas desempenham importante papel na biossíntese da parede celular (PASSARDI et al., 2004).

Vários papéis têm sido atribuídos a essa enzima em interações planta-patógeno (PASSARDI et al., 2004), como regulação da formação de  $H_2O_2$  nas plantas (KIM et al., 2008), resultando em condições adversas ao microorganismo (PASSARDI et al., 2004). Aumento da atividade da peroxidase solúvel foi observado em folhas de *Lycopersicon chmielewskii* infectadas pelo *Oidium neolycopersici* (MLÍCKOVÁ et al., 2004). Tomanková et al (2006) relataram que o aumento da produção de  $H_2O_2$  estava correlacionado com o aumento da atividade das enzimas guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidase em três espécies de *Lycopersicon* infectadas pelo *O. neolycopersici*.

## 5.OBJETIVOS

### 5. 1. Objetivo geral

O trabalho visou estudar as respostas bioquímicas, indicativas de estresse oxidativo, induzidas por *C. gloeosporioides* em diferentes clones de *H. brasiliensis* possibilitando o uso desses conhecimentos como marcadores bioquímicos para melhoramento genético deste vegetal, visando resistência à antracnose-das-folhas.

### 5.2. Objetivos específicos

Analisar a resposta da planta à infecção causada pelo fungo *C. gloeosporioides* quanto as alterações das enzimas antioxidantes GST, SOD e POD e dos indicadores de estresse oxidativo (lipoperóxidos, pigmentos fotossintéticos, fenóis totais, açúcares solúveis e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Verificar as alterações destes parâmetros bioquímicos e a resposta diferencial dos três clones de *H. brasiliensis* durante o progresso da infecção por *C. gloeosporioides*.

Ampliar o conhecimento dos processos fisiológicos e bioquímicos de plantas de *H. brasiliensis* sob condições de estresse causado pelo ataque de *C. gloeosporioides*.

## 6. MATERIAL E MÉTODO

### 6.1. Material vegetal e condução do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Patologia Florestal do Departamento de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agronômicas e no Laboratório de Xenobióticos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências, ambos da UNESP, Botucatu-SP.

O município de Botucatu tem como coordenadas a região central 22°51'03''S e 48°25'37''W e altitude de 786 m. O clima, segundo a classificação de Köppen é Cfa – moderado chuvoso, com quatro a seis meses consecutivos com temperatura média do ar acima de 10 °C. A temperatura média anual é de 22,8 °C no mês mais quente e de 16,7 °C no mês mais frio, sendo a média anual de 20,6 °C. Quanto a precipitação pluviométrica a média é de 1518,8 mm, sendo 229,5 mm e 37,5 mm para os meses de maior e menor precipitação, respectivamente (Martins, 1989). O tipo de solo enquadra-se na classe dos Latossolos Vermelho Escuro com textura arenosa (PACOLA, 1997).

Foram utilizadas plantas de três clones de *Hevea brasiliensis*, GT1, RRIM 600 e PR 255, provenientes do viveiro Polifer localizado no município de Macauba-SP. As mudas de *H. brasiliensis* foram mantidas em casa de vegetação, sob condições de temperatura mínima entre 18 – 24 °C e máxima entre 28 – 36 °C, condições fotoperiódicas naturais e irrigação por aspersão, localizada no Departamento de Produção Vegetal – Setor de

Defesa Fitossanitária, na Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Campus de Botucatu. O período de aclimatação foi de 3 meses na casa de vegetação.

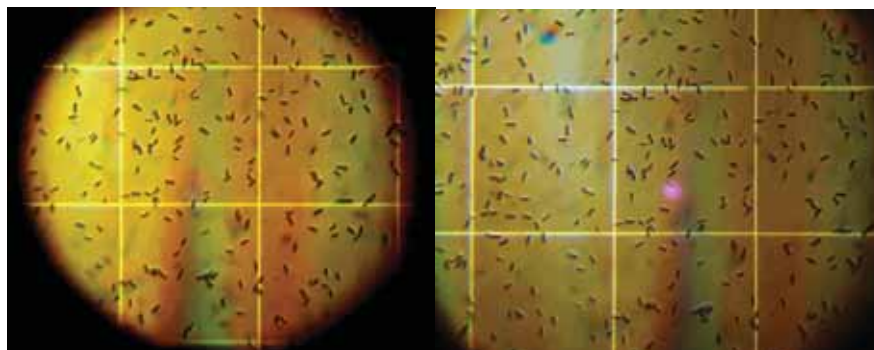
Os isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* foram obtidos a partir de lesões em folhas de seringueira coletados em plantios no Departamento de Defesa Fitossanitária, na Faculdade de Ciências Agronômicas. As amostras foram levadas ao laboratório no qual foi feita a verificação dos conídios mediante exame no microscópio óptico com objetiva de 40x, onde constatou-se a presença de conidióforos simples e alongados, conídios hialinos unicelulares, em forma de bastonete. Para o isolamento parte de cada amostra foi submetida à solução de álcool a 70% por um minuto, solução de hipoclorito de sódio a 2% por 2 minutos e subsequentemente foi feito um enxágüe com água autoclavada estéril. Posteriormente, foram colocadas dentro da câmara de fluxo laminar sobre papel toalha para a secagem. Em seguida, foram colocados cortes finos em placas de Petri de 8 cm de diâmetro contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA) Difco® (39 g/L) e, oxitetraciclina (0,06 g/L) e mantidas em câmara incubadora (BOD) a temperatura de  $25 \pm 1$  °C durante 8 dias. Após o crescimento em meio BDA foram retirados discos de 7 mm das bordas dos isolados e, transferidos para o centro de novas placas de Petri, contendo o mesmo meio e incubadas por 8 dias a  $25 \pm 1$  °C em fotoperíodo de 12 horas (Figura 2).



**Figura 2.** Aspecto das colônias de *Colletotrichum gloeosporioides* em meio BDA Difco®

Para verificação da capacidade de esporulação, no nono dia foi obtido uma suspensão de esporos, adicionando-se 20 mL de água destilada esterilizada em cada placa. Uma alíquota de 10 mL foi retirada para quantificação de esporos em câmara de

Neubauer (Figura 3). As plântulas foram inoculadas com uma suspensão de  $1,5 \times 10^5$  conídios/mL, através de pulverização.



**Figura 3.** *Colletotrichum gloeosporioides* observados no microscópio ótico em câmara de Neubauer.

No dia da inoculação e após 48, 96 e 144 h de inoculação, amostras das folhas foram coletadas, devidamente identificadas, levadas ao Laboratório de Xenobióticos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências. Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes glutathione S-transferase, superóxido dismutase e peroxidase, bem como os teores de indicadores de estresse oxidativo, tais como, lipoperóxidos, pigmentos fotossintéticos e peróxido de hidrogênio as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para a determinação de fenóis totais, açúcares solúveis as amostras de lâminas foliares foram coletadas e secas em estufa a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 6.2. Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial e análise de covariância  $3 \times 2 \times 4$  sendo: 3 clones de seringueira (RRIM600, GT1 e PR225), 2 tratamentos (plantas infectadas e sadias) e 4 períodos de infecção (0, 48, 96 e 144 horas). Foram utilizados 8 repetições de plantas para a determinação das enzimas antioxidantes, lipoperóxidos, 11 repetições para pigmentos fotossintéticos e 4 repetições para açúcares solúveis totais e redutores.

Foi ajustado um modelo linear generalizado para medidas repetidas com erro aleatório gama e função de ligação logarítmica (NELDER; WEDDERBURN, 1972; LIANG ZELGER, 1986) para as seguintes variáveis respostas: Enzimas (SOD, GST, PIRO), Açúcares (ASR e AST), Lipoperóxidos, Peróxidos de Hidrogênio, Clorofilas (Cl *a*, Cl *b* e Cl *total*) e Carotenóides, clones (RRIM 600, GT1 e PR255) e tempos (0, 48, 96 e 144 horas). A qualidade do ajuste dos modelos foi avaliada pela *Deviance* residual por grau de liberdade. Assim, *Deviance* residual com valores próximo à unidade, indicou boa qualidade de ajuste. Inicialmente foi feito um ajuste para verificar a significância das interações entre clones e tempos para cada uma das variáveis. No caso de significância, procedeu-se o estudo dentro de cada fator. Caso contrário, as comparações foram realizadas considerando-se somente os efeitos principais (clone e/ou tempo). Em ambos os casos foi utilizado o Teste da Razão de Verossimilhança (assintoticamente com distribuição Qui-Quadrado) (NELDER; WEDDERBURN, 1972).

### **6.3. Análises bioquímicas**

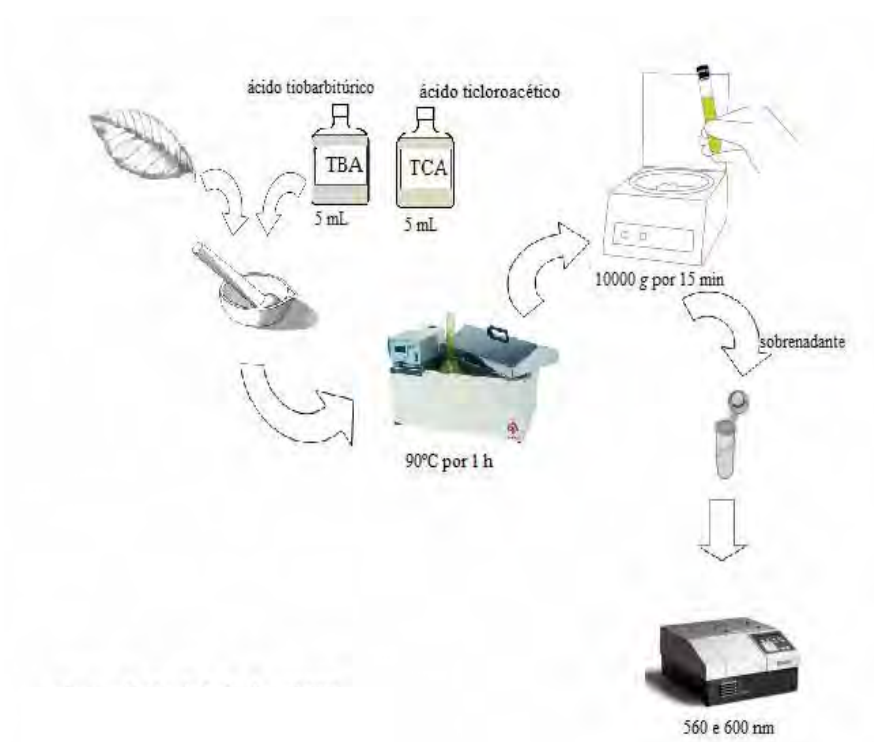
#### **6.3.1. Quantificação dos indicadores de estresse oxidativo**

##### **6.3.1.1. Lipoperóxidos**

A peroxidação de lipídios foi determinada pela técnica de Heath e Packer (1968), através da determinação de malondialdeído (MDA), que é um produto da decomposição da peroxidação de lipídios.

Amostras de lâminas foliares, após a determinação da massa fresca, foram homogeneizadas em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido ticloroacético (TCA) 10% e incubadas em banho fervente (90 °C) por 1h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em 10.000g por 15 minutos. Após o resfriamento foi separado o sobrenadante e realizadas leituras de absorvância a 560 e 600 nm. O coeficiente de absorvância do malondialdeído ( $155 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) foi utilizado para os cálculos. Os resultados foram expressos em nmol de lipoperóxidos  $\text{g}^{-1}$  tecido fresco.

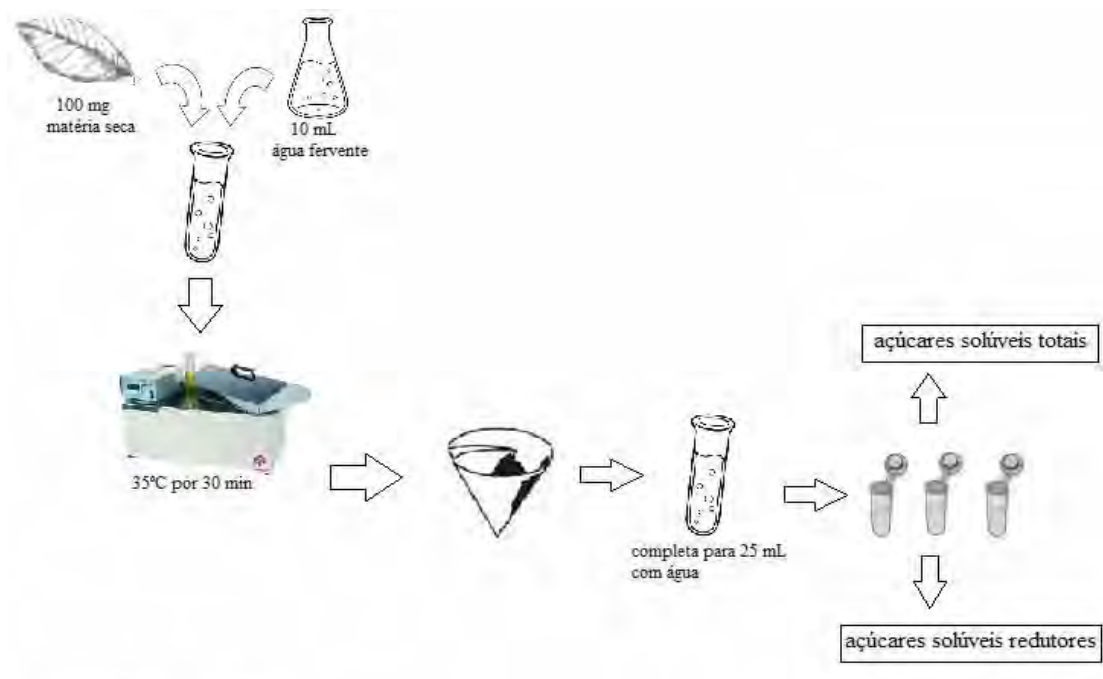




**Figura 4.** Esquema de determinação do conteúdo Lipoperoxídeos

### 6.3.1.2. Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e redutores

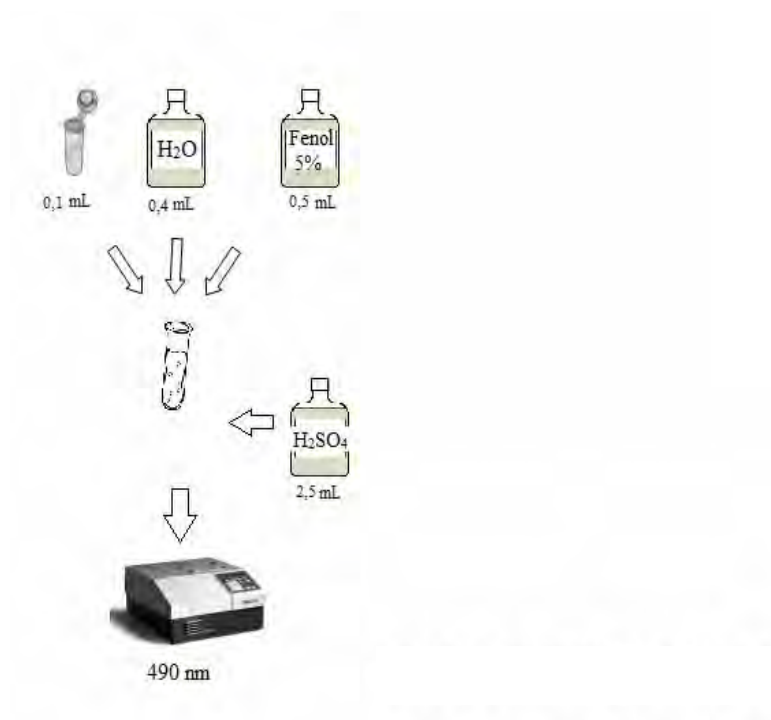
Para extração dos açúcares solúveis, foi utilizado 100 mg de matéria seca de cada amostra. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de água fervente, e mantidos em banho-maria a 35 °C por 30 minutos. Após filtração em algodão esterilizado, completou-se o volume do extrato para 25 mL com água destilada e utilizado para a quantificação dos teores de açúcares solúveis totais e redutores (CREPALDI et al., 2001). A quantificação de açúcares solúveis totais foi feita pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), e a quantificação dos açúcares solúveis redutores foi realizada pelo método DNS. Foi utilizada a glicose para a construção da curva de referência, e os resultados expressos em percentagem de açúcares solúveis totais ou redutores na matéria seca.



**Figura 5 .** Esquema da técnica da determinação do conteúdo açúcares solúveis



**Figura 6 .** Esquema da técnica da determinação do conteúdo açúcares solúveis redutores.



**Figura 7.** Esquema da técnica da determinação do conteúdo açúcares solúveis totais.

### 6.3.1.3. Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos das lâminas foliares com acetona 80%, como descrito por Arnon (1949). O extrato cetônico foi utilizado para as leituras de absorvância a 647 e 663 nm. Os teores de clorofila “a”, clorofila “b” e clorofilas totais foram calculados através das fórmulas propostas por Lichtenthaler (1987). Os resultados foram expressos em  $\text{mg.g}^{-1}$  de matéria fresca.



**Figura 8.** Esquema da técnica da determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos.

#### 6.3.1.4. Peróxido de hidrogênio

Os teores de peróxido de hidrogênio foram determinados de acordo com Sergiev et al. (1997) (Figura 9). As amostras das folhas foram homogeneizadas em banho de gelo com 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 15 minutos e aos 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 10 mmol.L<sup>-1</sup> pH 7,0 e 1 mL de KI. A absorbância da reação foi medida a 390 nm. Os cálculos foram determinados utilizando-se curva de referência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e expressos em μmol .g<sup>-1</sup> de matéria fresca.



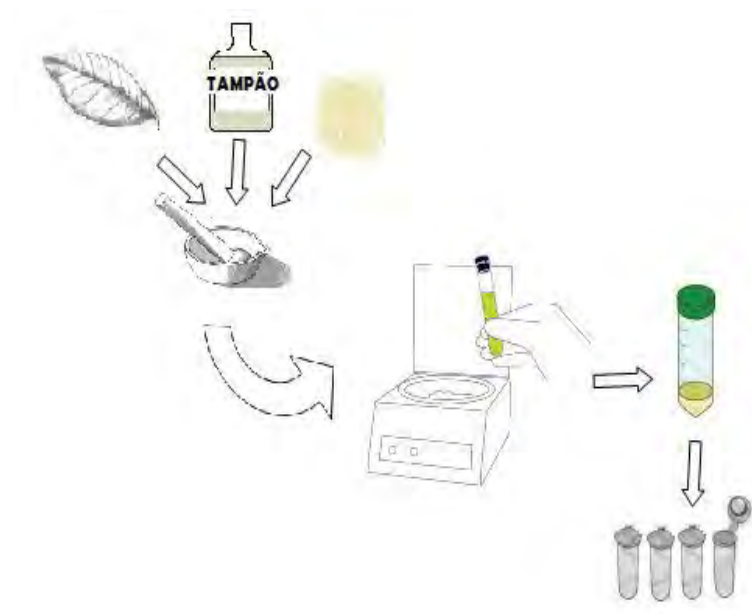
**Figura 9.** Esquema da técnica da determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio.

### 6.3.2. Determinações enzimáticas

#### 6.3.2.1. Obtenção dos extratos enzimáticos

Para a obtenção dos extratos enzimáticos foi utilizado o método descrito por Ekler et al. (1993). Amostras das folhas das plantas foram homogeneizadas com a utilização de almofariz gelado em 5 mL de tampão gelado TRIS-HCl 0,2 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,8 contendo 1 mmol.L<sup>-1</sup> de EDTA e 7,5% (peso.volume<sup>-1</sup>) de polivinilpolipirrolidona e uma pequena quantidade de areia lavada e esterilizada. Após centrifugação a 4 °C (20 minutos a 14.000g), utilizando-se centrífuga refrigerada, o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a ±20 °C, para posterior determinação das atividades enzimáticas da glutathiona S-

transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), e conteúdo de proteína solúvel nos extratos enzimáticos.



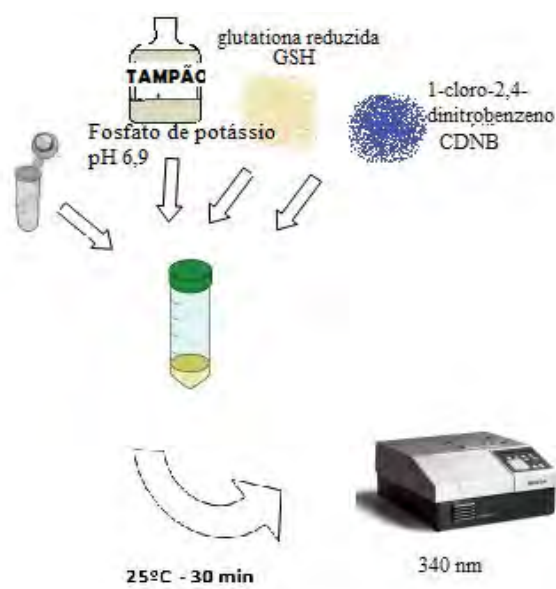
**Figura 10.** Esquema da técnica da determinação dos extratos enzimáticos.

#### **6.3.2.2. Determinação da atividade da glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)**

A atividade da GST foi determinada de acordo com as condições citadas no trabalho de Wu et al. (1996). A mistura da reação foi composta de 30  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, tampão fosfato de potássio pH 6,9  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$ , glutathione reduzida (GSH)  $3,3 \text{ mmol.L}^{-1}$  e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB)  $30 \text{ mmol.L}^{-1}$ , num volume final de 3,0 mL e mantida a  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos.

A mudança na absorvância devido à formação do conjugado GSH-CDNB foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. O coeficiente de extinção molar  $10 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  (MANNERVIK; GUTHENBERG, 1981) foi usado para

calcular a atividade específica da enzima, expressa em  $\text{mmol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{mg}$  de proteína<sup>-1</sup>. Os teores de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos foram estimados pelo método de Lowry et al. (1951).



**Figura 11.** Esquema da técnica da determinação Glutationa S-transferase.

### 6.3.2.3. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Beauchamp e Fridovich (1971), tendo como base a capacidade da enzima em converter radicais superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio molecular (BOWLER et al., 1992).

No sistema de reação foi utilizado tampão fosfato de sódio  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 7,8 com adição de uma mistura de nitroblue tetrazolium (NBT)  $33 \mu\text{mol.L}^{-1}$  + EDTA 0,66

mmol.L<sup>-1</sup> (5:4), mistura L-metionina 10 mmol.L<sup>-1</sup>+ riboflavina 0,0033 mmol.L<sup>-1</sup> (1:1) e 30 µL extrato enzimático, totalizando um volume de 3,0 mL.

A mistura de reação foi mantida a 25 °C e sob iluminação por um período de dez minutos, utilizando uma lâmpada fluorescente. A redução do NBT foi determinada através de leituras de absorbância em espectrofotômetro a 560 nm. Os teores de proteínas solúveis do extrato enzimático foram estimados pelo método de Lowry et al. (1951). Uma unidade enzimática (U) da atividade da SOD expressa em U.mg de proteína<sup>-1</sup> foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% da inibição da razão de redução do NBT.



**Figura 12.** Esquema da técnica da determinação da atividade da superóxido dismutase.

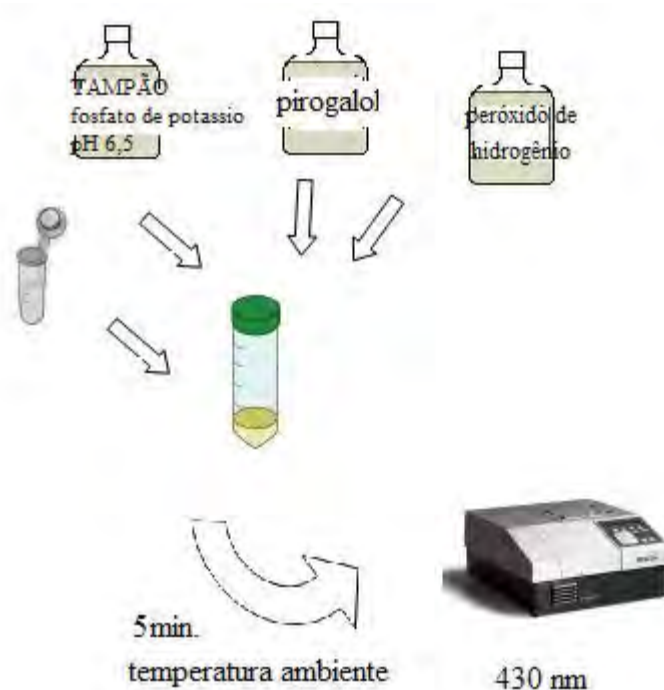
#### 6.3.2.4. Determinação da atividade da pirogalol peroxidase (PG-POD, EC 1.11.1.7)

A atividade da PG-POD foi determinada de acordo com as condições citadas no trabalho de Teisseire e Guy (2000). A mistura de reação foi composta de extrato



enzimático, tampão fosfato de potássio pH 6,5 50 mmol.L<sup>-1</sup>, pirogalol 20 mmol.L<sup>-1</sup>, e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 5 mmol.L<sup>-1</sup>, num volume final de 1,0 mL e mantida a temperatura ambiente durante 5 minutos.

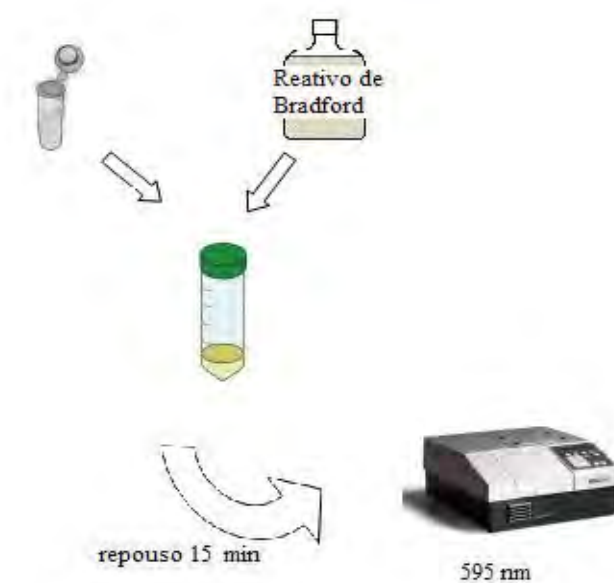
A mudança na absorbância devido à formação da purpurogalina foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 430 nm. O coeficiente de extinção molar da purpurogalina (2,5 mmol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em mmol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>. Os teores de proteínas solúveis dos extratos enzimáticos foram estimados pelo método de Lowry et al. (1951).



**Figura 13.** Esquema da técnica da determinação da atividade da pirogalol peroxidase.

### 6.3.2.5. Quantificação dos teores de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos

Os teores de proteínas solúveis dos extratos enzimáticos, necessários para o cálculo da atividade específica da peroxidase foram quantificados pelo método de Lowry et al. (1951). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível a 660 nm, utilizando-se caseína como proteína padrão.



**Figura 14.** Esquema da quantificação dos teores de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos.

## 7. RESULTADO E DISCUSSÃO

Assume-se, em fitopatologia, que imunidade é regra e suscetibilidade exceção (ROMEIRO, 1985; AGRIOS, 1997). Se assim não fosse, qualquer patógeno seria capaz de infectar qualquer planta e, a curto prazo em termos evolutivos, os vegetais desapareceriam da face da terra (ROMEIRO, 1985). Isso não acontece exatamente porque os mecanismos de defesa de plantas contra patógenos existem em multiplicidade e são extremamente eficientes (GOTO, 1990; OKU, 1994; ROMEIRO, 1995). Pode ser observado neste estudo, concordância com a bibliografia citada, onde a planta respondeu bioquimicamente ao ataque de antracnose-das-folhas.

O estudo da resposta antioxidante tem o objetivo implícito de procurar na resposta ao estresse uma ferramenta para entender como o ambiente afeta um organismo. A resposta oxidativa é universal em plantas submetidas à estresse, entretanto, a variedade de respostas é muito maior do que as circunstâncias que produzem essa resposta, fazendo com que seja quase impossível determinar um padrão geral de comportamento (CARRILLO; VALLE, 2010).

Patógenos e outros fatores ambientais podem induzir a formação de EROs na maioria dos organismos aeróbicos, as quais são produzidas em vários compartimentos celulares, tais como cloroplastos, mitocôndrias, glioxissomos e peroxissomos, bem como no citosol. Conseqüentemente podem promover danos em biomoléculas podendo culminar com a morte celular (SCANDALIOS, 1993).

As interações planta-patógeno são classificadas em compatíveis (patógeno virulento e hospedeiro suscetível) e incompatíveis (patógeno avirulento e

hospedeiro resistente). Nas interações incompatíveis, o sistema de defesa da planta é eficientemente ativado, conduzindo à resistência, mas é tardiamente ativado ou não ativado em interações compatíveis, condicionando a doença (STAKAWICZ et al., 1995).

O efeito antimicrobiano direto das EROs numa dada interação planta-patógeno, depende de suas concentrações e da sensibilidade do patógeno a essas concentrações (MEDHY et al., 1996).

Nos últimos anos, tem-se dado especial atenção aos danos celulares causados pelo acúmulo de EROs sob condições de estresse (BLOKHINA et al., 2003).

Na literatura são escassos os relatos de trabalhos que relacionem antracnose das folhas e espécies florestais. Assim, tornou-se necessário, a efeitos comparativos e ilustrativos, mencionar pesquisas realizadas com espécies agrícolas expostas as mais diversas condições geradoras de estresses.

## **7.1. Indicadores de estresse oxidativo**

### **7.1.1. Lipoperóxidos**

A formação de lipoperóxidos, que é uma das conseqüências da produção de EROs, é utilizada para se avaliar o nível de estresse oxidativo presente (VERMA; DUBEY, 2003). Os lipoperóxidos são indicadores de estresse, pois as EROs quando produzidas em excesso, podem ser destrutivos para a célula ao reagir com os ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios das membranas e alterar a sua funcionalidade, promovendo a peroxidação de lipídios, causando alterações das membranas.

A elevada produção de EROs pode iniciar o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares, formando hidroperóxidos de lipídios. A peroxidação de lipídios de membranas é um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo, por causar a diminuição da fluidez, modificações de permeabilidade iônica e de outras funções associadas às membranas (QUEIROZ et al., 1998). Os eventos bioquímicos resultantes de diminuição da fluidez das membranas incluem a interferência nas funções das proteínas, redução do suprimento de energia, perda de compartimentalização, liberação acentuada de íons e outros

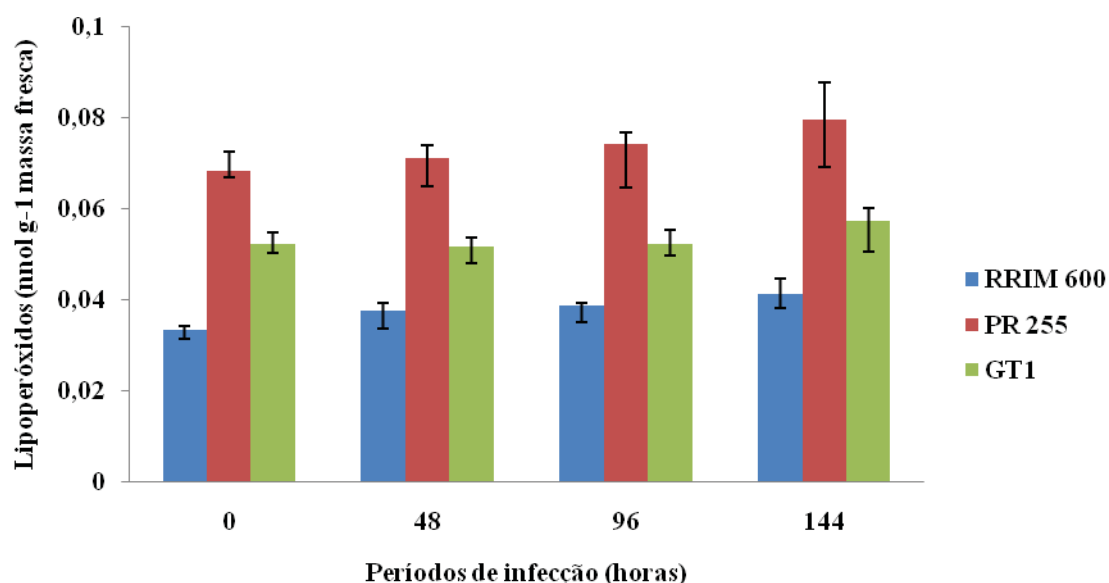
eventos que rompem o metabolismo normal e levam ao desbalanço e perda das funções essenciais (AZIZ; LARHER, 1998).

Foi verificado que os clones de seringueira apresentam diferenças quanto aos teores de lipoperóxidos (Tabela 1 e Figura 15). O clone PR255 apresentou os maiores teores de lipoperóxidos, em comparação com os outros clones analisados. Analisando os teores de lipoperóxidos ao longo do período de infecção, foi verificado que não ocorreu alteração nos níveis de lipoperóxidos nos clones de seringueira, como efeito da infecção por antracnose até o período de 144 horas de infecção.

**Tabela 1.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) dos teores de lipoperóxidos ( $\text{nmol g}^{-1}$  massa fresca) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
Clone	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	
<b>RRIM600</b>	0,0333 <b>cA</b> (0,0023)	0,0376 <b>cA</b> (0,0033)	0,0387 <b>cA</b> (0,0022)	0,0414 <b>cA</b> (0,0036)	<0,0001
<b>PR255</b>	0,0684 <b>aA</b> (0,0041)	0,0711 <b>aA</b> (0,0057)	0,0742 <b>aA</b> (0,0076)	0,0797 <b>aA</b> (0,0117)	<0,0001
<b>GT1</b>	0,0522 <b>bA</b> (0,0025)	0,0518 <b>bA</b> (0,0029)	0,0523 <b>bA</b> (0,0034)	0,0574 <b>bA</b> (0,0072)	<0,0001

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.



**Figura 15.** Teores de lipoperóxidos em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

### 7.1.2. Açúcares solúveis totais e redutores

Os açúcares podem exercer sinais e respostas de defesa que são úteis para as plantas, por controlar o nível das EROs, que induzem o estresse (COUÉE et al., 2006).

Quando as plantas são infectadas pelos patógenos, ocorre aumento na respiração, visto que os tecidos passam a utilizar as reservas de carboidratos para a produção de energia, com o objetivo de proteger e regenerar os tecidos injuriados pelo patógeno invasor (PASCHOLATI; LEITE, 1995). As diversas interações patógeno-planta indicam uma enorme complexidade química envolvida. Do grupo de substâncias químicas, as proteínas e os carboidratos mostram-se como os compostos mais envolvidos no reconhecimento hospedeiro-patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1994).

A atividade das ATPases foi demonstrada tanto no patógeno, como na planta hospedeira, mostrando que a atividade ocorre graças a um investimento metabólico, não se tratando portanto de um simples processo passivo (LEITE; STAMGARLIN, 2008).

No presente trabalho foi verificado efeito significativo da infecção de *C. gloeosporioides* sobre os teores de açúcares solúveis redutores e totais em plantas de seringueira (Tabelas 2 e 3, respectivamente).

Os maiores valores dos teores de açúcares solúveis redutores e totais foram observados no clone PR255, em comparação com os demais clones analisados (Tabelas 2 e 3 e Figuras 16 e 17). Os teores destes açúcares solúveis aumentaram em todos os clones no decorrer da infecção. Os maiores valores foram detectados às 144 horas de infecção no clone RRIM 600 e no período de 96 h nos clones PR255 e GT1.

Situações de estresse desencadeiam alterações nos teores de carboidratos solúveis nas plantas.

Sob condições de deficiência hídrica foi constatado aumento nos carboidratos solúveis, em particular de açúcares redutores, em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) (CHAVES FILHO; STACCIARINI-SERAPHIN, 2001) e açúcares solúveis totais em folhas de alfafa (*Medicago sativa*) (IRIGOYEN et al., 1992). Em plantas jovens de *S. amazonicum* (paricá) e *S. parahyba* (guapuruvu) submetidas a dois ciclos de deficiência hídrica constatou-se aumento dos teores de açúcares solúveis totais (CARVALHO, 2001). Em plantas de espinafre (*Spinacea oleracea*) ocorreu aumento da síntese de sacarose durante o estresse hídrico (INGRAM; BARTELS, 1996). Resultados semelhantes foram encontrados por Marur (1998) em plantas de *Gossypium hirsutum* L. sob condições de estresse hídrico, que apresentaram teor de amido reduzido e níveis de açúcares redutores aumentados.

Aumento nos teores de carboidratos solúveis é detectado em interação planta-patógeno. Foi verificado por Sarria Villa (2010) incremento significativo na concentração de açúcares solúveis redutores em plantas de tangerina inoculadas com *Phytophthora nicotianae* e *P. citrophthora*.

Roitsch (1999) menciona que diferentes situações de estresse, inclusive por ataque de patógenos, causam direta ou indiretamente acúmulo de EROs e são também associadas ao acúmulo de açúcares solúveis.

Diante do exposto, podemos considerar que no presente trabalho foi verificado acúmulo diferencial de açúcares solúveis redutores e totais entre os clones de seringueira. Nossos resultados corroboram com pesquisas que relacionam aumento de

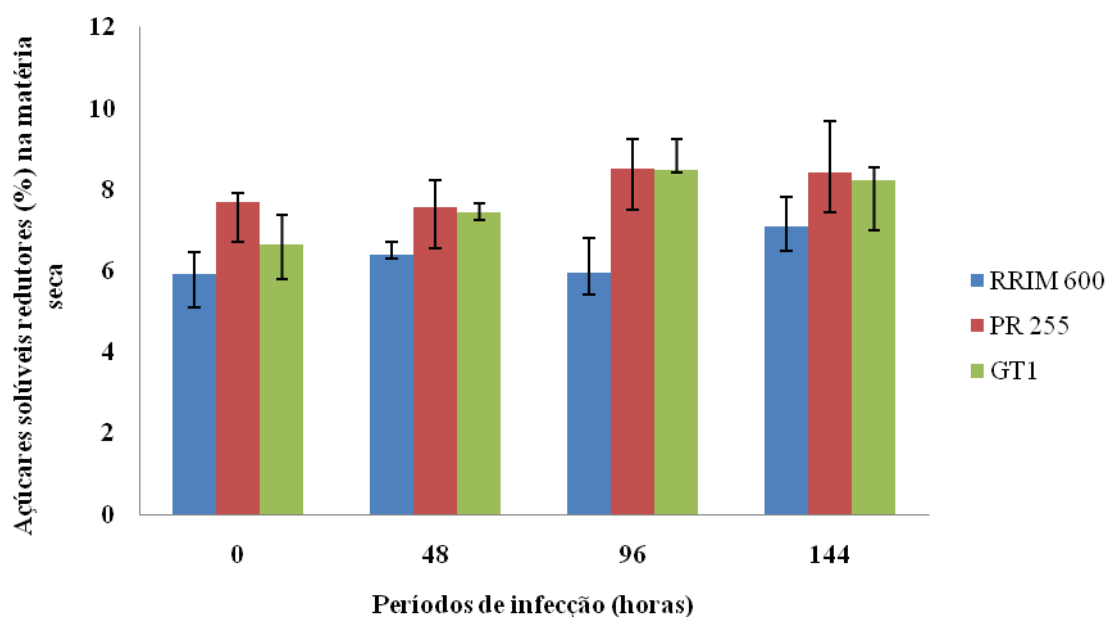
carboidratos solúveis sob estresse, tanto por deficiência hídrica, quanto por ataque de patógenos, podendo ser considerado uma resposta adaptativa das plantas a estas condições.

**Tabela 2.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) dos teores de açúcares solúveis redutores (% na matéria seca) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
Clone	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	
<b>RRIM600</b>	5,92 <b>cB</b> (0,92)	6,40 <b>bB</b> (0,31)	5,95 <b>bB</b> (0,84)	7,08 <b>bA</b> (0,78)	<0,0001
<b>PR255</b>	7,70 <b>aB</b> (0,21)	7,57 <b>aB</b> (0,68)	8,51 <b>aA</b> (1,30)	8,44 <b>aA</b> (1,37)	<0,0001
<b>GT1</b>	6,64 <b>bB</b> (0,95)	7,45 <b>aB</b> (0,32)	8,49 <b>aA</b> (0,72)	8,24 <b>aA</b> (1,20)	<0,0001

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.



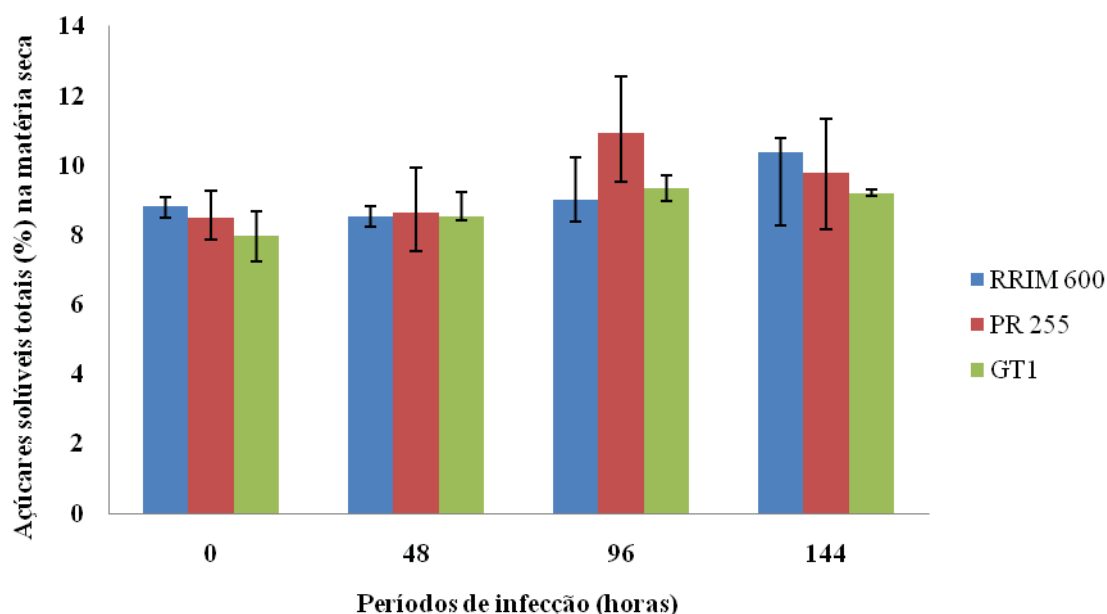


**Figura 16.** Teores de açúcares solúveis redutores em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

**Tabela 3.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) dos teores de açúcares solúveis totais (% na matéria seca) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
<b>Clone</b>	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	
<b>RRIM600</b>	8,83 aB (0,35)	8,53 aB (0,34)	9,02 bB (1,20)	10,38 aA (2,15)	<0,0001
<b>PR255</b>	8,51 aB (0,86)	8,63 aB (1,52)	10,91 aA (1,79)	9,78 bA (1,87)	<0,0001
<b>GT1</b>	7,97 bB (0,88)	8,53 aB (0,68)	9,33 aA (0,43)	9,19 bA (0,10)	<0,0001

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.



**Figura 17.** Teores de açúcares solúveis totais em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

### 7.1.3. Pigmentos fotossintéticos

A degradação da clorofila é iniciada durante a senescência das plantas, por fatores endógenos, como aumento de permeabilidade da membrana e mudança de pH, ou por fatores externos, como estresse hídrico, redução de luz, mudanças de temperatura e aumento do teor de etileno. Esses fatores interferem no processo normal, acelerando ou retardando a degradação da clorofila (HEATON; MARANGONI, 1996; TAKAMIYA et al., 2000).

Células fotossintetizantes estão constantemente expostas ao acúmulo de EROs, resultando em estresse oxidativo, durante vários processos metabólicos básicos (FOYER, 1997). Sob condições naturais de estresse, diferentes EROs podem ser produzidas simultaneamente nos cloroplastos.

Uma função importante dos carotenóides é agir como fotoprotetor na prevenção de danos fotooxidativos (COGDELL, 1988; RAU, 1988). Cogdell (1988) afirma que quando a clorofila é excitada pela luz, ocorre a produção de radicais livres. Contudo, os carotenóides são capazes de prevenir a ação reativa do oxigênio singleto produzida pela clorofila. Degradações no conteúdo de clorofila são indicativos da diminuição da capacidade de absorção da energia luminosa.

No presente trabalho foram detectadas interações significativas da infecção de *C. gloeosporioides* sobre os teores de clorofila total, clorofila *a* e clorofila *b* em plantas de seringueira (Tabelas 4 e 6, respectivamente). Os teores destes parâmetros diminuíram na maioria dos clones no decorrer da infecção, indicando que o *C. gloeosporioides* causou degradação de clorofila, acarretando estresse oxidativo nas plantas (Figuras 18 a 20). A maior degradação dos pigmentos foi detectada no clone RRIM600 a partir das 96 horas de infecção.

Neste estudo foi observado que a infecção causada por patógenos causa degradação dos pigmentos fotossintéticos nas plantas. Concordantes com a literatura consultada.

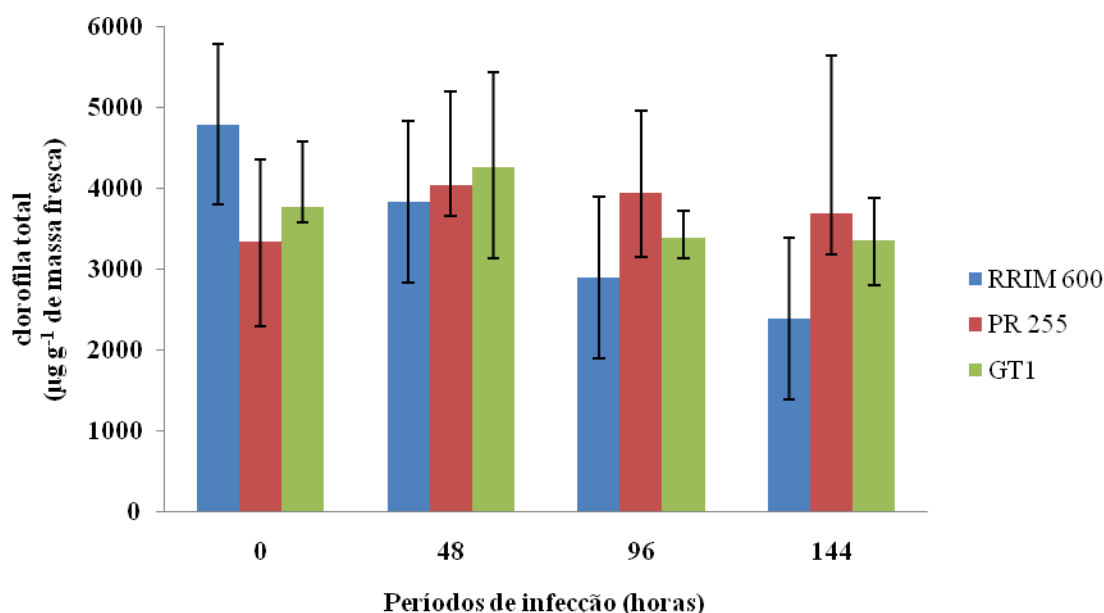
De acordo com Holloway et al. (1992) em plantas infectadas por oídio, a taxa fotossintética diminuiu com o progresso da doença, devido à perda progressiva de componentes dos fotossistemas e clorofila durante a infecção.

Diminuição no conteúdo de clorofila foi observado em plantas de feijão infectadas por *Erysiphe graminis* (COGHLAN; WALTERNS, 1992) e por *Blumeria graminis* (AKHKHA et al., 2000), em plantas de aveia contaminadas por *E. graminis* (SABRI et al., 1997) e em plantas de tomate infectadas por *Botrytis cinerea* (KUZNIAK; SKLODOWSKA, 2001). Redução na taxa fotossintética (TANG et al., 1996; SADRAS et al., 2000; EL OMARI et al., 2001; PSHIBYTKO et al., 2006) e na condutância estomática (SADRAS et al., 2000; EL OMARI et al., 2001) são relatadas sob condições de estresse por patógenos.

**Tabela 4.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) dos teores de clorofila total ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa fresca) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
<b>Clone</b>	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	
<b>RRIM600</b>	4799,13 <b>bA</b> (915,51)	3833,55 <b>aA</b> (1155,07)	2899,50 <b>bB</b> (575,96)	2396,90 <b>bB</b> (529,98)	<0,0001
<b>PR255</b>	3421,20 <b>aB</b> (1366,78)	2837,54 <b>aB</b> (1693,38)	3905,92 <b>aA</b> (1558,22)	3495,64 <b>aA</b> (1243,47)	<0,0001
<b>GT1</b>	3257,28 <b>aA</b> (1361,77)	3748,17 <b>aA</b> (1183,51)	3193,93 <b>aA</b> (483,78)	3169,12 <b>aA</b> (586,32)	<0,0001

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.

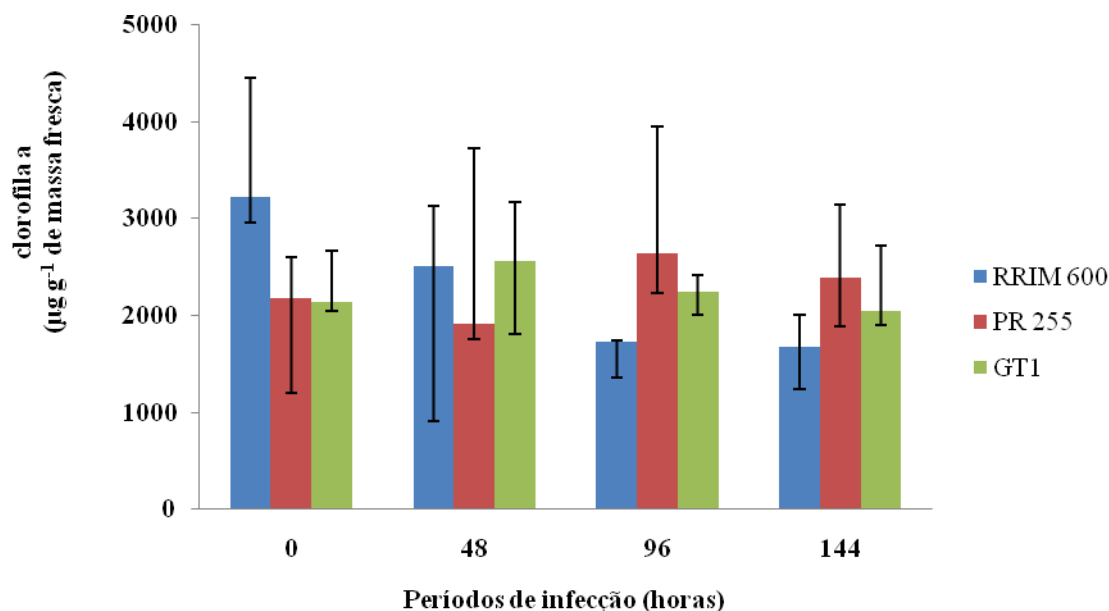


**Figura 18.** Teores de clorofila total em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

**Tabela 5.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) dos teores de clorofila *a* ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa fresca) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
Clone	Média	Média	Média	Média	
	(Desvio padrão)	(Desvio padrão)	(Desvio padrão)	(Desvio padrão)	
RRIM600	3229,00	2504,94	1728,09	1680,47	<0,0001
	<b>aA</b> (729,41)	<b>aA</b> (1031,66)	<b>aB</b> (247,81)	<b>aB</b> (372,18)	
PR255	2173,91	1916,01	2637,49	2394,71	<0,0001
	<b>bA</b> (778,17)	<b>aA</b> (1031,23)	<b>bA</b> (951,20)	<b>bA</b> (863,57)	
GT1	2142,76	2569,34	2248,82	2052,90	<0,0001
	<b>bA</b> (773,94)	<b>aA</b> (737,97)	<b>bB</b> (351,31)	<b>bB</b> (464,79)	

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.

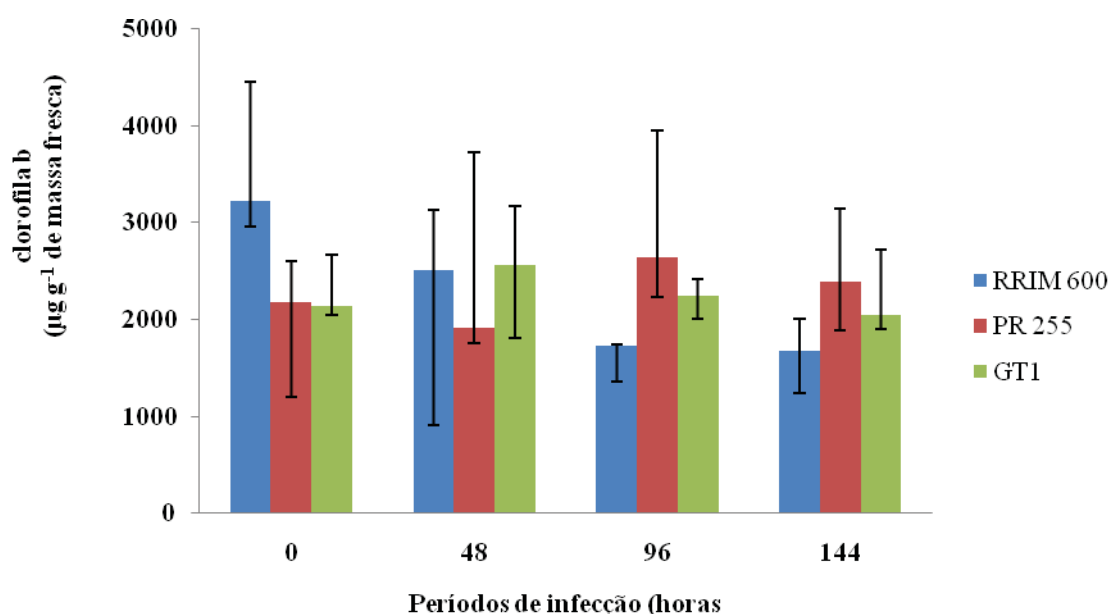


**Figura 19.** Teores de clorofila *a* em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

**Tabela 6.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) dos teores de clorofila *b* ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa fresca) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
<b>Clone</b>	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	
<b>RRIM600</b>	1570,13 <b>aA</b> (190,76)	1328,61 <b>aA</b> (139,65)	1171,41 <b>aA</b> (342,01)	716,42 <b>bB</b> (164,52)	<0,0001
<b>PR255</b>	1247,29 <b>aA</b> (747,74)	921,53 <b>aA</b> (672,26)	1268,42 <b>aA</b> (634,62)	1100,93 <b>aA</b> (382,16)	<0,0001
<b>GT1</b>	1114,51 <b>aA</b> (596,49)	1178,83 <b>aA</b> (455,10)	945,11 <b>bA</b> (149,91)	1116,22 <b>aA</b> (291,64)	<0,0001

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.



**Figura 20.** Teores de clorofila *b* em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

Tang et al. (1996) sugeriram que a redução da taxa da fotossíntese pode estar relacionada à redução do conteúdo de clorofila e/ou da enzima Rubisco (ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase), uma vez que os dados desta pesquisa evidenciaram não ter efeito na condutância estomática.

Em folhas de meloeiro Aguiar (2009) observou que a adição de cloreto de sódio à solução nutritiva provocou reduções significativas nos teores de clorofila *a* e clorofila *b* na ordem de 9% e 13%, respectivamente. Degradação do teor de clorofila também foi observada por KUZNIAK (2001) em plantas de tomate infectadas por *Botrytis cinerea* (KUZNIAK; SKLODOWSKA, 2001).

Os carotenóides são metabólitos que protegem as plantas dos efeitos citotóxicos das EROs (MITTLER, 2004). Além desta ação, é de conhecimento que a redução dos teores de carotenóides pode acarretar em estresse oxidativo, em virtude da degradação oxidativa das clorofilas e da rápida destruição das membranas dos tilacóides pelo excesso de EROs geradas (KIM et al., 2008).

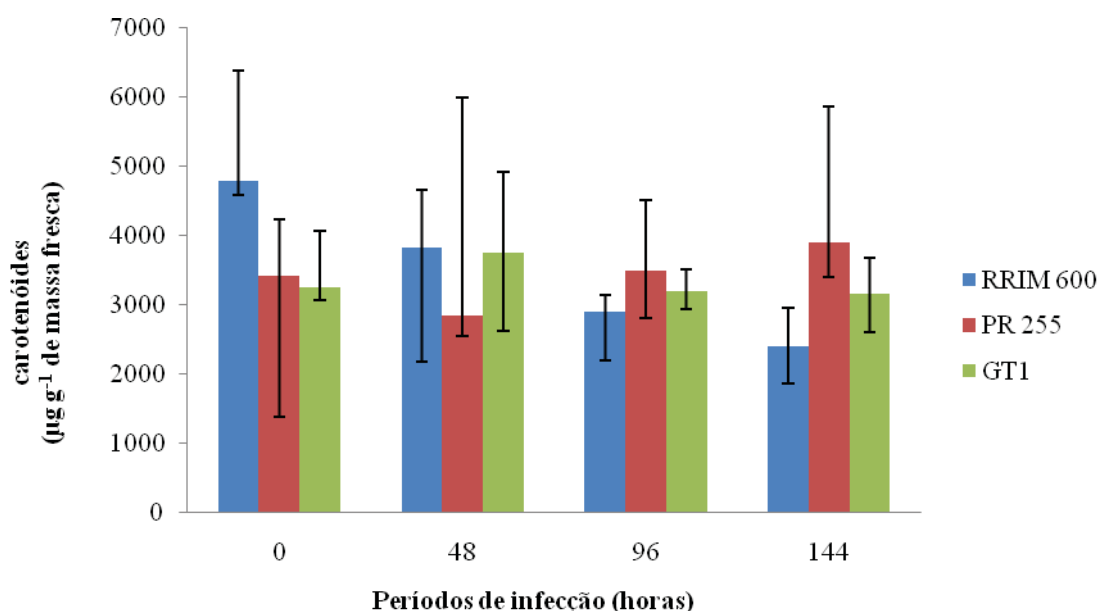
No presente trabalho o efeito do patógeno foi significativo ( $P \leq 0,05$ ) no teor de carotenóides de plantas de seringueira infectadas por *C. gloeosporioides* (Tabela 7). De modo geral, não foi detectada degradação de carotenóides em plantas de seringueira infectadas por *C. gloeosporioides* (Tabela 7 e Figura 21).

Deste modo, até o período de infecção analisado, 144 horas, o *C. gloeosporioides* não causou degradação de carotenóides, que apresenta função de extinguir as EROs formadas pela presença do patógeno.

**Tabela 7.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) dos teores de carotenóides ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa fresca) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
<b>Clone</b>	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	
<b>RRIM600</b>	1201,21 <b>aA</b> (218,77)	831,12 <b>aA</b> (438,63)	554,06 <b>aA</b> (90,57)	826,60 <b>aA</b> (201,51)	<0,0001
<b>PR255</b>	797,69 <b>bA</b> (285,61)	895,05 <b>aA</b> (261,09)	1023,63 <b>bA</b> (277,68)	1043,39 <b>aA</b> (338,03)	<0,0001
<b>GT1</b>	826,80 <b>bA</b> (209,53)	940,53 <b>aA</b> (230,93)	914,64 <b>bA</b> (138,55)	816,38 <b>aA</b> (300,56)	<0,0001

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.



**Figura 21.** Teores de carotenóides em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.



#### 7.1.4. Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio atua como uma molécula sinalizadora nas plantas, que controla diferentes respostas e estímulos (FINKEL, 2000). A geração de  $H_2O_2$  é aumentada em resposta a diferentes condições de estresse, sugerindo que este composto desempenha papel importante no processo de aclimação e tolerância cruzada, na qual uma exposição prévia a um determinado estresse pode induzir tolerância a subseqüentes exposições ao mesmo tipo de estresse ou a outro diferente (NEILL et al., 2002).

O estresse oxidativo gerado a partir do ataque de fitopatógenos gera uma rápida síntese deste composto, com consecutiva liberação no apoplasto (BOLWELL, 1999; OROZCO-CARDENAS et al., 2001; RAO; DAVIS, 2001).

O real papel do  $H_2O_2$  no mecanismo de defesa de plantas ainda gera discussões. Sua participação na defesa de plantas contra o ataque de patógenos biotróficos é conhecida, atuando na indução da morte celular no local da infecção e, impedindo assim, o crescimento e desenvolvimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro (PELLINEN et al., 2002).

A grande produção de peróxido de hidrogênio, juntamente com outros tipos de EROs, como o ânion superóxido e o radical hidroxila, que caracteriza a explosão oxidativo é um dos primeiros eventos que ocorrem nas plantas sob condições de estresse (DIONISIO-SESE; TOBITA, 1998). A geração de  $H_2O_2$  ocorre em interações planta-patógeno como mecanismo de defesa à penetração na parede celular por vários fungos (MELLERSH et al., 2002; GAYOSO et al., 2004). Esta ERO pode difundir a grandes distâncias resultando em mudanças no estado redox das células e tecidos (FOYER et al., 1997), causando efeitos deletérios para alguns componentes celulares, mas também podem atuar como mecanismo de defesa aos vegetais como agir diretamente sobre os patógenos, efetuar a peroxidação de lipídios, fortalecer a parede celular e além disso as plantas podem usá-lo como mensageiros secundários em cascata de transdução de sinal para ativar mecanismos de defesa das plantas (SCHRECK; BAEUERLE, 1991; FOYER; NOCTOR, 2005) e morte celular (PAVET et al., 2005).

No presente estudo foi observada uma elevação dos teores de peróxido de hidrogênio nas plantas de seringueira infectadas por *C. gloeosporioides*, sendo que estatisticamente houve uma interação entre clone e período de infecção (Tabela 8).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 8 e Figura 22 pode se observar que a infecção por *C. gloeosporioides* não causou alteração dos teores de peróxido de hidrogênio no clone de seringueira PR255. No clone RRIM600 e GT1 a infecção causou aumento dos teores de peróxido de hidrogênio a partir das 48 horas e 96 horas, respectivamente.

Os resultados corroboram com diversas pesquisas, que relatam aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio, como função de situações estressantes, desempenhando função de defesa nas plantas.

De acordo com a literatura, a produção de  $H_2O_2$  pode desempenhar importante papel a uma variada gama de estresses bióticos e abióticos. Estímulos ambientais como estresse hídrico (YANG; POOVAIAH, 2002), radiação ultravioleta e ataque de patógenos podem induzir mudanças nos níveis de  $H_2O_2$  e levar a várias respostas fisiológicas em plantas (YANG; POOVAIAH, 2002).

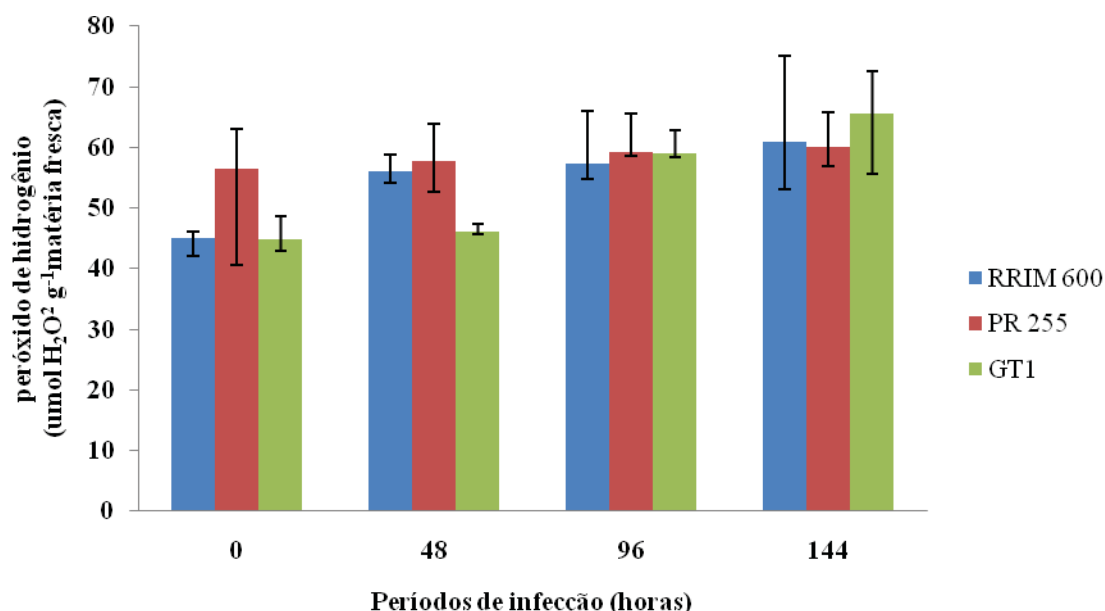
Chen et al. (2008) relataram maior acúmulo de  $H_2O_2$  na cultivar de soja Nannong 493 – 1 do que na cultivar Hefeng, ambas após inoculação de *Phytophthora sojae*. Maior acúmulo de  $H_2O_2$  foi observado em feijão 24 horas após a inoculação por *Bipolaris sorokiniana* e a acumulação permaneceu por semanas em torno dos locais da infecção (PLAZEK et al., 2003).

Portanto, baseado nos resultados aqui apresentados pode-se considerar que o aumento da produção de peróxido de hidrogênio em seringueira é uma resposta da planta, na tentativa de proteção contra o estresse desencadeado pela infecção fúngica.

**Tabela 8.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) dos teores de peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g}^{-1}$  matéria fresca) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
<b>Clone</b>	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	
<b>RRIM600</b>	45,02 <b>bB</b> (2,13)	56,16 <b>aA</b> (3,21)	57,39 <b>aA</b> (5,04)	60,89 <b>aA</b> (9,59)	<0,0001
<b>PR255</b>	56,45 <b>aA</b> (9,50)	57,80 <b>aA</b> (4,72)	59,18 <b>aA</b> (4,12)	60,15 <b>aA</b> (4,46)	<0,0001
<b>GT1</b>	44,75 <b>cC</b> (2,75)	46,12 <b>bC</b> (0,99)	59,09 <b>aB</b> (3,99)	65,57 <b>aA</b> (7,92)	<0,0001

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.



**Figura 22.** Teores de peróxido de hidrogênio em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

## 7.2. Enzimas antioxidantes

Segundo Allen et al. (1997) a hipótese de que enzimas antioxidantes são críticas na prevenção do estresse oxidativo em plantas é baseado em várias linhas de evidências. A atividade de uma ou mais enzimas é geralmente incrementada em plantas expostas a condições de estresse, no caso patógenos, e a sua elevada atividade está relacionada com o incremento da tolerância ao estresse.

Algumas das enzimas antioxidantes envolvidas na eliminação das EROs em plantas incluem a SOD, GST e POD. Ao lado de outros mecanismos fisiológicos, a eficiência do sistema antioxidante aumenta a capacidade de tolerância da planta, devido à diminuição dos efeitos causados pelas EROs (GIANNAKOULA et al., 2010).

Nas Tabelas 9 a 11 verifica-se interação entre clone e períodos de infecção, em relação à atividade das enzimas antioxidantes analisadas. Foram observados que a infecção por *C. gloeosporioides* causou aumento da atividade de enzimas antioxidantes nos clones de seringueira analisados, evidenciando que o agente biótico aplicado inicia uma resposta de maneira universal. A tendência ao aumento destas enzimas antioxidantes nas plantas de seringueira, indica que existem mecanismos ativados para defesa frente a EROs geradas pela presença do fungo.

### 7.2.1 Atividade de Glutathione S-transferases

A glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) desempenha um papel importante na resposta de estresse em plantas; sendo considerada uma enzima de desintoxicação, por metabolizar grande variedade de compostos xenobióticos, por meio da conjugação destes com glutathione reduzida, formando substâncias de baixa toxicidade. A GST tem função de dirigir as atividades citoprotetoras e podem ser essenciais para proteger as plantas sob estresse ambiental e doenças, bem como auxiliar o desenvolvimento normal das plantas (DUDLER et al., 1991; BARLING et al., 1993).

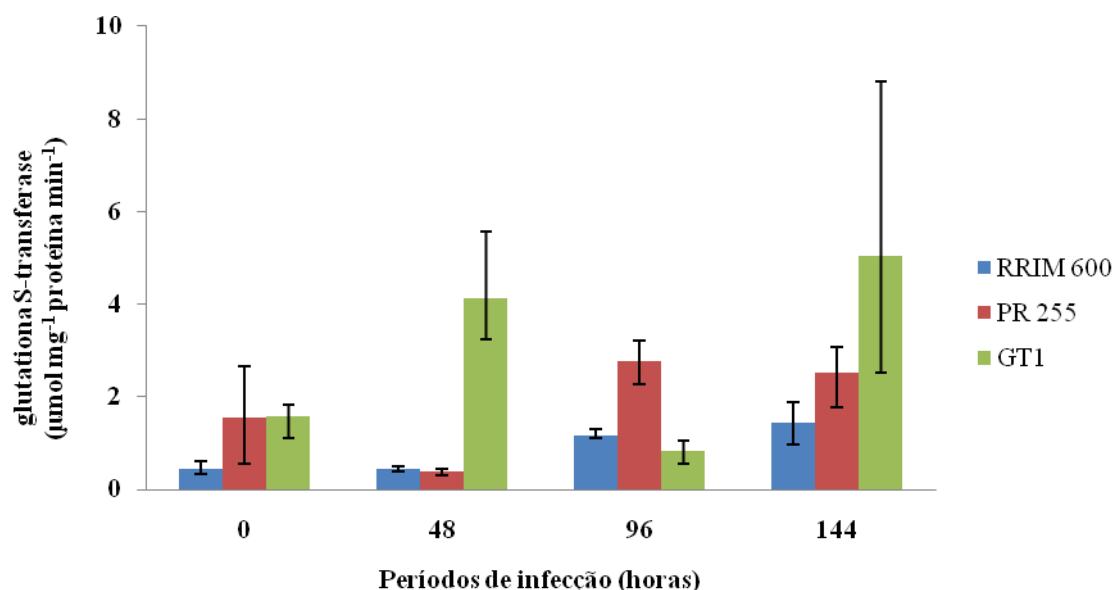
De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9 e Figura 23 pode ser verificado que em todos os clones de seringueira infectadas houve aumento da atividade da GST, principalmente no último período de infecção, às 144 horas. Analisando a GST ao longo da progressão da doença, pode-se destacar a resposta do clone de seringueira GT1, no período de 48 e 96 horas com respeito ao aumento da atividade desta enzima, frente à infecção pelo *C. gloeosporioides*.

Os resultados do presente trabalho pode ser observado aumento da atividade se GST, que são em parte concordantes com os relatos de Cataneo et al. (2003) em plantas de milho submetidas à estresse pelo tratamento com o herbicida glifosato.

**Tabela 9.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) da atividade da glutationa S-transferase ( $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ ) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
<b>Clone</b>	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	
<b>RRIM600</b>	0,45 <b>bB</b> (0,15)	0,44 <b>aB</b> (0,08)	1,15 <b>bA</b> (0,14)	1,43 <b>bA</b> (0,50)	<0,0001
<b>PR255</b>	1,55 <b>aB</b> (1,13)	0,40 <b>aC</b> (0,12)	2,78 <b>aA</b> (0,53)	2,51 <b>bA</b> (0,72)	<0,0001
<b>GT1</b>	1,57 <b>aC</b> (0,46)	4,12 <b>aB</b> (1,25)	0,82 <b>cD</b> (0,29)	5,03 <b>aA</b> (3,33)	<0,0001

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.



**Figura 23.** Atividade da glutathione S-transferase em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

### 7.2.2. Atividade de Superóxido dismutase

Sob condições ambientais adversas, os vegetais podem apresentar capacidade de resposta através da alteração de seu metabolismo, principalmente quando o fator estressante induz a formação de EROs. Dentre as formas de resposta antioxidativa, destaca-se a atividade da superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação de um radical superóxido a peróxido de hidrogênio, impedindo a atuação deste agente oxidante e nocivo, principalmente sobre as membranas (BOWLER et al., 1992).

Na Tabela 10 e Figura 24 pode ser detectado que em todos os clones de seringueira ocorreu aumento da atividade de SOD nos períodos de 96 e 144 horas, em função da progressão da infecção por *C. gloeosporioides*. A maior atividade da enzima foi detectada no clone GT1 às 144 horas de infecção.

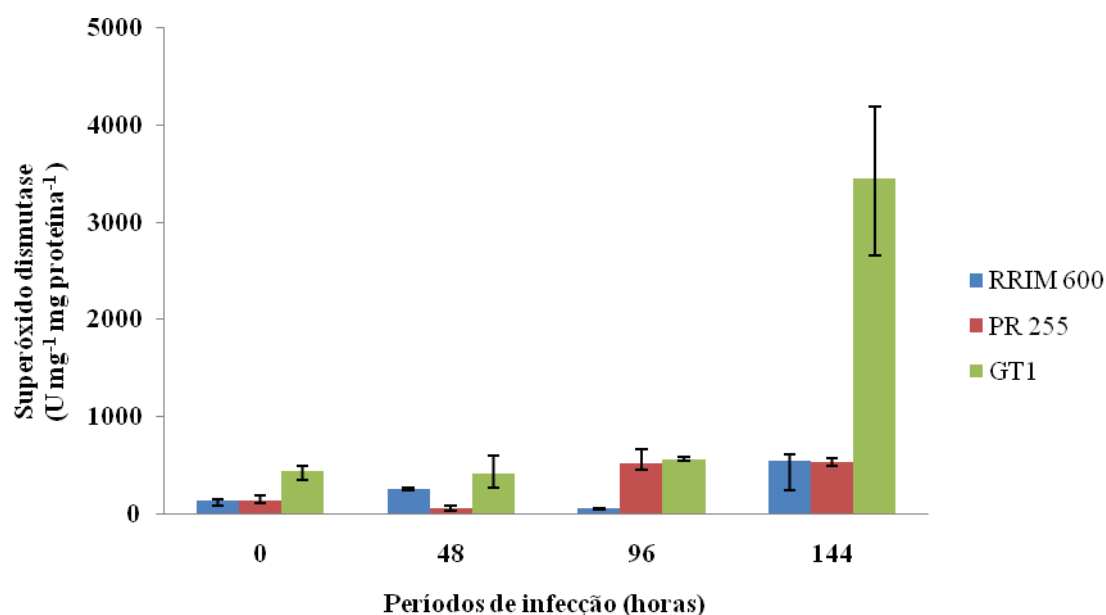
Os resultados do presente estudo são concordantes com a literatura consultada, onde foram relatados aumentos da atividade da SOD, como resposta a várias

situações de estresse, dentre elas, o ataque de patógenos. Em alguns trabalhos, foram relatados aumentos da atividade desta enzima em plantas em situações de infecção fúngica, como em feijão-caupi sob ação de *Colletotrichum lindemuthianum* (BARRETO, 2005), em batata infectada por *Phytophthora infestans* (IVANOVA et al., 1991) e em trigo infectado por *Puccinia recôndita* (IVANOV et al., 2004).

**Tabela 10.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) da atividade da superóxido dismutase ( $\text{U mg}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ ) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
<b>Clone</b>	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	Média (Desvio padrão)	
<b>RRIM600</b>	128,17 <b>bC</b> (32,15)	253,40 <b>bB</b> (34,32)	51,86 <b>bD</b> (17,54)	544,61 <b>bA</b> (280,11)	<0,0001
<b>PR255</b>	136,42 <b>bB</b> (42,77)	52,24 <b>cC</b> (28,54)	516,36 <b>aA</b> (185,76)	535,73 <b>bA</b> (109,44)	<0,0001
<b>GT1</b>	440,82 <b>aB</b> (112,35)	412,09 <b>aB</b> (183,66)	550,14 <b>aB</b> (32,38)	3455,42 <b>aA</b> (824,16)	<0,0001

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.



**Figura 24.** Atividade da superóxido dismutase em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

### 7.2.3 Atividade de Peroxidase

As PODs são isoenzimas associadas a mudanças nos processos fisiológicos e bioquímicos de plantas submetidas à estresses (GASPAR et al., 1986). Estas enzimas apresentam função antioxidante nas células vegetais expostas a condições de estresse por decomporem o  $H_2O_2$  produzido pela SOD (BOR et al., 2003).

A atividade de PODs tem sido associada a vários processos relacionados à defesa em plantas, até mesmo reações de hipersensibilidade, lignificação e suberização (SILVA, 2007) ou a situações de estresses abióticos, como observado por Domingos et al. (2005), cuja atividade foi progressiva, em função do aumento da concentração de cobre em *Myriophyllum aquaticum*.

Através dos resultados apresentados na Tabela 11 foi observado aumento significativo na atividade da POD como efeito do estresse causado pela infecção por *C. gloeosporioides* em todos os clones de seringueira estudados. Como observado na Figura 25 a atividade da POD foi mais elevada nos clones RRIM600 e PR255 a partir das 96 horas de infecção e no clone GT1 às 144 horas após a inoculação do patógeno.



De acordo com a literatura consultada existe uma relação positiva entre atividade de enzimas antioxidantes com a resistência de plantas a patógenos, deste modo, corroborando com os resultados deste trabalho.

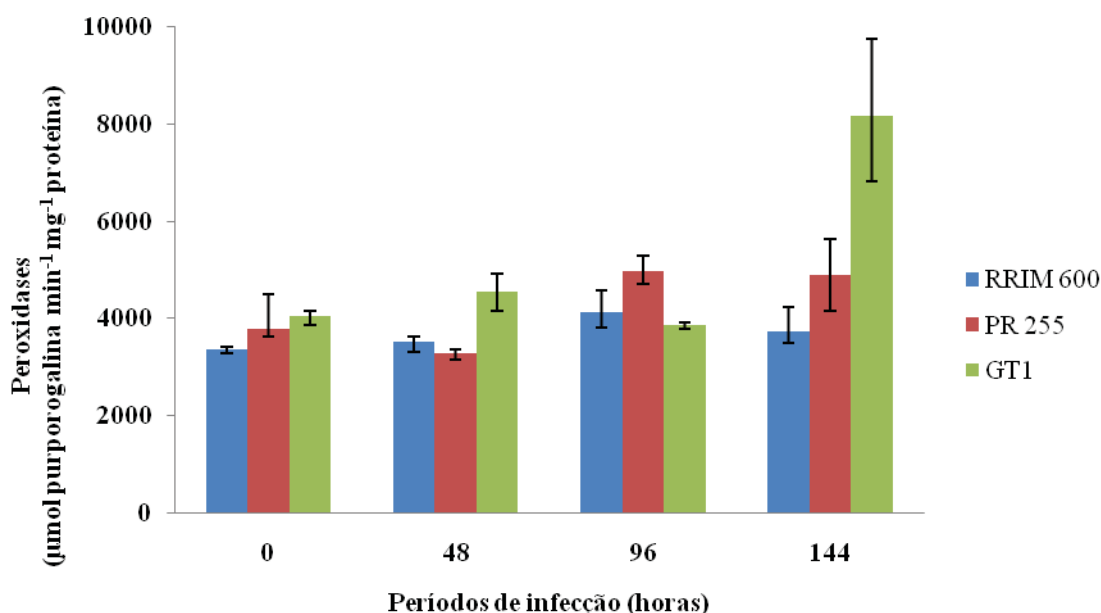
A relação positiva entre a atividade da POD e a resistência de plantas a doenças, foi descrito nos trabalhos realizados por Hammerschmidt et al. (1982), Hammerschmidt e Kuc (1982) e Coffet e Cassidy (1984), onde foram relatados aumento da atividade da POD durante o desenvolvimento da doença, correlacionado-se com a expressão de resistência em diferentes interações patógeno-hospedeiro.

Di Piero e Pascholati (2004) observaram picos de atividade de POD aos 9 e 12 dias após a infecção, respectivamente, em plantas de pepino tratadas com extratos aquosos de *Lentinula edodes* e infectadas por *Colletotrichum lagenarium*. Silva (2007) ao testar extratos aquosos de *Agaricus blazei* e ASM ( $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em plantas de berinjela contra *Ralstonia solanacearum* obteve aumento na atividade de POD para ambos, aos 7 e 12 dias, respectivamente. Expressão local pelo zoósporo *Phytophthora palmivora* em *H. brasiliensis* induziu a produção desta enzima (DUTSADEE; NUNTA, 2008).

**Tabela 11.** Comparação das Médias (\*) (desvio padrão) da atividade da peroxidase ( $\mu\text{mol purporogalina min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ ) em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*

Variável	Períodos de infecção (horas)				Valor-p
	0	48	96	144	
Clone	Média	Média	Média	Média	
	(Desvio padrão)	(Desvio padrão)	(Desvio padrão)	(Desvio padrão)	
RRIM600	3360,84	3524,40	4118,01	3731,29	<0,0001
	<b>bB</b> (78,19)	<b>bB</b> (210,45)	<b>bA</b> (426,56)	<b>cA</b> (441,94)	
PR255	3789,51	3271,60	4963,42	4889,81	<0,0001
	<b>aC</b> (473,15)	<b>bB</b> (234,32)	<b>aA</b> (365,68)	<b>bA</b> (790,55)	
GT1	4058,04	4557,75	3866,82	8181,87	<0,0001
	<b>aB</b> (215,68)	<b>aB</b> (414,46)	<b>cC</b> (99,16)	<b>aA</b> (1573,18)	

(\*) Médias seguidas de letras iguais, minúsculas entre clones e maiúsculas entre períodos de infecção, não diferem significativamente entre si.



**Figura 25.** Atividade da peroxidase em clones de *H. brasiliensis* nos períodos de 0, 48, 96 e 144 horas após a infecção por *C. gloeosporioides*.

Li e Li (1998) estudaram a atividade da POD em folhas de diferentes cultivares de pepino (*Cucumis sativus* L.) infectadas com *Cladosporium cucumerinum* Ell. e Arth e constataram que a atividade foi maior nas cultivares resistentes do que nas suscetíveis. Resultados semelhantes foram observados por Komarova e Davidovich (1997) em plantas de arroz, cujas cultivares resistentes à ferrugem apresentaram atividade de POD 1,5 a 3 vezes maior que as suscetíveis.

Honty et al. (2005) estudaram a atividade da POD em cultivares de pêra sensíveis e resistentes a *Erwinia amylovora*. Dois dias após a inoculação, a atividade da enzima na cv. resistente aumentou ao longo do desenvolvimento da doença, enquanto que na sensível houve um decréscimo da POD. Campos et al. (2004) verificaram aumento de atividade da POD em plantas de feijão resistentes a *Colletotrichum lindemuthianum* somente a partir de 3 dias após a infecção. Em algodão Dai et al. (1996) verificaram aumento de atividade da POD em plantas resistentes a *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearu* 4 horas após a inoculação.

Comparando os três clones de seringueira, foi detectado que no GT1 a magnitude da atividade das enzimas antioxidantes a partir de 144 horas de infecção, GST, SOD e POD, foi maior em comparação aos outros clones analisados (Figuras 23, 24 e 25).

## 8. CONCLUSÕES

Nas condições em que o presente trabalho foi conduzido, é possível concluir que:

- Através de parâmetros bioquímicos analisados foi possível detectar respostas diferenciais entre os clones RRIM600, PR255 e GT1 de *H. brasiliensis* quando submetidas à infecção por *C. gloeosporoides*.

- A infecção por *C. gloeosporoides* em plantas *H. brasiliensis* não causa formação de lipoperóxidos até as 144 h de infecção, entretanto, é constatado estresse oxidativo, detectado pela elevação dos teores de peróxido de hidrogênio, acúmulo de açúcares solúveis e degradação de pigmentos fotossintéticos.

- A elevação da atividade das enzimas antioxidantes, GST, SOD e POD nos clones de seringueira foi decorrente de uma resposta, frente à infecção por *C. gloeosporoides*, porém, este aumento não foi suficiente para evitar o estresse oxidativo.

- As respostas bioquímicas de defesa da seringueira devem ser detalhadamente estudadas para a melhor compreensão das estratégias de defesa empregadas pela planta. Isto possibilitaria a manipulação das vias metabólicas e/ou substâncias intervenientes nos mecanismos ativos de defesa, visando o desenvolvimento de variedades mais aptas a se defenderem das pressões bióticas que lhes são impostas nos ambientes onde são cultivadas.

- Dentre os parâmetros bioquímicos analisados neste trabalho, os melhores indicadores que caracterizaram respostas diferenciais dos clones de seringueira

frente à infecção por *C. gloeosporoides* foram as determinações dos teores de peróxido de hidrogênio, açúcares solúveis e clorofila.

## 9. REFERÊNCIAS

ABARCA, D.; MARTIM, M.; SABATER, B. Differential leaf stress responses in young and senescent plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 113, p. 409-415, 2001.

ADAM, A. L. et al. Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. Phaseolicola. **Planta**, Berlin, v. 19, p. 240-249, 1995.

AGRAWAL, S. B.; RATHORE, D. Changes in oxidative stress defense system in wheat (*Triticum aestivum* L.) and mung bean (*Vigna radiate* L.) cultivars grown with and without mineral nutrients and irradiated by supplemental ultraviolet-B. **Environmental and Experimental Botany**, Varanasi, v. 59, p. 21-33, 2007.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. Malden: Academic Press, 1997. 635 p.

AGUIAR, L. A. A. et al. Compostos orgânicos em folha de meloeiro (cv. Eldorado 300) submetido ao estresse hídrico e salino. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 9., 2009, Pernambuco. **Anais...** Pernambuco: UFRPE, 2009. Não paginado.

AKHKHA, A.; CLARKE, D. D.; DOMINY, P. J. Relative tolerances of wild and cultivated barley to infection by *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (Syn. *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). II- the effects of infection on photosynthesis and respiration. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p. 347-354, 2000.

- ALDEA, M. et al. Comparison of photosynthetic damage from arthropod herbivory and pathogen infection in understory hardwood saplings. **Oecologia**, Urbana, v. 149, p. 221-232, 2006.
- ALLEN, R. D.; WEBB, R. P.; SCHAKE, S. A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 473-479, 1997.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P. F.; LOW, P. S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 90, p. 109-116, 1989.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, New Delhi, v. 82, p. 1227-1236, 2002.
- ARNON, D. I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 24, p. 1-15, 1949.
- AZIZ, A.; LARHER, F. Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassica nappus* L. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 153, n. 5/6, p. 754-762, Nov. 1998.
- BAIASAK, R. et al. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 33, p. 299-321, 1995.
- BAKER, C. J.; ORLANDI, E. W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Saint Paul, v. 33, p. 299-321, 1995.
- BANDYOPADHYAY, U.; BANERJEE, D. R. K. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. **Current Science**, Calcutta, v. 77, p. 658-666, 1999.

BARLING, D. et al. A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **European Journal of Biochemistry**, Bochum, v. 216, p. 579-586, 1993.

BEAUCHAMP, C.; FRODOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, Durham, v. 44, p. 276-287, 1971.

BECANA, M. et al. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 109, p. 372-381, 2000.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, Berlin, v. 208, p. 337-344, 1999.

BLOKHINA, O.; VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, London, v. 91, p. 179-194, 2003.

BOLWELL, G. P. Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. **Current Opinion in Plant Biology**, Danvers, v. 2, p. 287-294, 1999.

BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, Limerick, v. 164, n. 1, p. 77-84, Jan. 2003.

BOSCOLO, P. R. S.; MENOSSI, M.; JORGE, R. A. Aluminum-induced stress oxidative in maize. **Phytochemistry**, New York, v. 62, n. 2, p. 181-189, Jan. 2003.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and salt tolerance. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia plantarum**, Sweden, v. 83, p. 463-468, 1991.



CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: know and potential function. In: EVERSE, J.; EVERSE, K. E.; GRISHAM, M. B. (Eds.). **Peroxidases in chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 25-50.

CAMPOS, A. D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Pelotas, v. 39, p. 637-643, 2004.

CARPENTER, J. B.; STEVENSON, J. A. A secondary leaf spot of the Hevea rubber tree caused by *Glomerella cingulata*. **Plant Disease Reporter**, Washington, DC, v. 38, n. 7, p. 494-499, 1954.

CARRILLO, N.; VALLE, E. M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**. Cordoba, v. 2, n. 2, mar. 2005. Disponível em: <<http://www.safv.com.ar/Carrillo%200305.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

CARVALHO, V. L. et al. Influência de diferentes níveis de produção sobre a evolução da ferrugem do cafeeiro e sobre teores foliares de compostos fenólicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 49-54, jan./fev. 2001.

CATANEO, A. C. et al. Atividade de glutatona S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 307-312, 2003.

CATANEO, A. C. et al. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max*, L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Botucatu, v. 2, p. 23-31, 2005.

CAVALCANTI, F. R. et al. Activities of antioxidant enzymes and photosynthetic responses in tomato pre-treated by plant activators and inoculated by *Xanthomonas vesicatoria*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, p. 198-208, 2006.

CECHIN, I. et al. Ultraviolet-B and water stress effects on growth, gas exchange and oxidative stress in sunflower plants. **Radiation and Environmental Biophysics**, Berlin, v. 47, p. 405-413, 2008.

CHAI, H. B.; DOKE, N. Systemic activation of  $O_2$  generating reaction, superoxide dismutase, and peroxidase in potato plants in relation to induction of systemic resistance to *Phytophthora*

infestans. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**, Nagoya, v. 53, p. 585-590, 1987.

CHAVES FILHO, J. T.; STACCIARINI-SERAPHIN, E. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas jovens de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.-Hil.) em resposta ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 199-204, jun. 2001.

CHEN, Z. M. et al. Aqueous-phase ozonolysis of methacrolein and methylvinyl ketone: a potentially important source of atmospheric aqueous oxidants. **Atmospheric Chemistry and Physics**. Dordrecht, v. 8, p. 2255-2265, 2008.

CHO, U. H.; SEO, N. H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Science**, Limerick, v. 168, p. 113-120, 2005.

COFFEY, M. D.; CASSIDY, D. S. M. Peroxidase activity and induced lignification in rusted flax interactions varying in their degree of incompatibility. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, p. 134-141, 1984.

COGDELL, R. The functions of pigments in chloroplasts. In: GOODWIN, T. W. (Ed.). **Plant pigments**. London: Academic Press, 1988. p. 183-230.

COGHLAN S. E.; WALTERS, D. R. Photosynthesis in green-islands on powdery mildew infected barley leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 40, p. 31-38, 1992.

COUÉE, I. et al. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Rennes, v. 57, p. 449-459, 2006.

CREPALDI, I. C. et al. Composição nutricional do fruto do licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, p. 155-159, 2001.

DAI, G.H. et al. Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 285-306, 1996.

DALLAGNOL, L. J. **Absorção ativa do silício e a mancha parda do arroz:** componentes de resistência e aspectos fisiológicos e bioquímicos da interação planta-patógeno. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

DE VOS, C. H. R. et al. Copper induced damage to permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 135, p. 165-169, 1989.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 57-62, 2004.

DIONISIO-SESE, M. L.; TOBITA, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. **Plant Science**, Limerick, v. 135, p. 1-9, 1998.

DODGE, A. Herbicide action and effects on detoxification process. In: FOYER, C. H.; MULLINEAUX, P. M. (Eds.). **Causes of photoactive stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 219-236.

DOMINGOS, V. D. et al. Efeito do cobre na atividade da enzima pirogalol peroxidase em plantas de *Myriophyllum aquaticum* cultivadas em solução nutritiva. **Planta Daninha**, Botucatu, v. 23, p. 375-380, 2005.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Minnesota, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUDLER, R. et al. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione-S-transferases. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Zurich, v. 4, p. 14-18, 1991.

DUTSADEE, C.; NUNTA, C. Induction of peroxidase, scopoletin, phenolic compounds and resistance in *Hevea brasiliensis* by elicitor and a novel protein elicitor purified from *Phytophthora palmivora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, p. 179-187, 2008.

EKLER, Z.; DUTKA, F.; STEPHENSON, G. R. Safener effects on acetochlor toxicity, uptake, metabolism and glutathione S-transferase activity in maize. **Weed Research**, Ontario, v. 33, p. 311-318, 1993.

EL OMARI, B. et al. Effect of fungal infection on leaf gas-exchange and chlorophyll fluorescence in *Quercus ilex*. **Annals Science**, Barcelona, v. 58, p. 165-174, 2001.

FENG, S. P.; WANG, J. Y. Development, characterization and cross-species/genera transferability of EST-SSR markers for rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Molecular Breeding**, Haikou, v. 23, p. 85-97, 2009.

FERREIRA, F. A. **Patologia florestal**: principais doenças florestais no Brasil. Viçosa, MG: UFV, 1989. 570 p.

FERREIRA, L. C. **Resposta ao estresse oxidativo induzido pelo cobre em plantas de batata (*Solanum tuberosum*)**: aspectos bioquímicos e fisiológicos. 2004. 155 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

FERREIRA, L. C. et al. Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in soybean plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Botucatu, v. 97, p. 47-54, 2010.

FINKEL, T. Redox-dependent signal transduction. **FEBS Letters**, Bethesda, v. 476, p. 52-54, 2000.

FOYER, C. Ascorbic acid. In: ALSCHER, R. G.; HESS, J. L. (Eds.). **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 31-58.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant Cell Environment**, Orsay, v. 29, p. 1056-1071, 2005.

FOYER, C. H. et al. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 100, p. 241-254, 1997.

FURTADO, E. L.; SILVEIRA, A. P. Doenças do painel de sangria da seringueira. In: BERNARDES, M. S. **Sangria da seringueira**. Piracicaba: FEALQ, 1990. p. 111-125.

FURTADO, E. L.; SILVEIRA, A. P. Doenças da seringueira em viveiros e jardins clonais e seu controle. In: MEDRADO, M. J. S. et al. **Formação de mudas e plantio de seringueira**. Piracicaba: ESALQ, 1992. p. 52-64.

FURTADO, E. L.; TRINDADE, D. R. Doenças da seringueira. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2.

GASPAR, T. et al. A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. **Physiologia Plantarum**, Liège, v. 64, p. 418-423, 1986.

GASPAROTTO, L. et al. **Doenças da seringueira no Brasil**. Brasília, DF: EMBRAPA, SPI, 1997. 168 p.

GAYOSO, C. W.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L. Ação inibitória do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, a-pineno e b-pineno sobre fungos isolados de onicomioses. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, São Paulo, v. 1, p. 25-29, 2004.

GIANNAKOULA, A. et al. Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 67, p. 487-494, 2010.

GONÇALVES, P. de S. Recomendação de clones de seringueira para o Estado de São Paulo. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE A HEVEICULTURA PAULISTA, 1., 1998. Barretos. **Anais...** Barretos: APABOR, 1998, p. 115-140.

GONÇALVES, P. S.; MARQUES, J. R. B. Melhoramento genético da seringueira: passado, presente e futuro. In: ALVARENGA, A. P.; CARMO, C. A. F. S. (Eds.). **Seringueira**. Viçosa, MG: Epamig, 2008. p. 401-407.

GONÇALVES, P. S.; CARDOSO, M.; BORTOLETTO, N. Redução do ciclo de melhoramento e seleção na obtenção de cultivares de seringueira. **O Agrônomo**, Campinas, v. 40, n. 2, p. 113-130, 1988.

GONÇALVES, P. de S.; PAIVA, J. R. de; SOUZA, R. A. de. **Retrospectiva e atualidade do melhoramento genético da seringueira (*Hevea spp.*) no Brasil e em países asiáticos.**

Manaus: Embrapa, CNPSD, 1983. 69 p.

GOTO, M. **Fundamentals of bacterial plant pathogens.** San Diego: Academic Press, 1990. 342 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, London, v. 219, p. 1-14, 1984.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiology of Plant Pathology**, Berlin, v. 20, p. 61-71, 1982.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, California, v. 125, p. 189-198, 1968.

HEATON, J. W.; MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 8-15, Jan. 1996.

HOLLOWAY, P. J.; MACLEAN, D. J.; SCOTT, K. J. Electron transport in thylakoids isolated from barley leaves infected by powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* DC. ex Merat f. sp. *hordei* Marchal. **New Phytologist**, Cambridge, v. 120, p. 145-151, 1992.

HONTY, K. et al. Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by *Erwinia amylovora*. **Acta Biologica Szegediensis**, Budapest, v. 49, p. 127-129, 2005.

HURNG, W. P.; KAO, C. H. Lipid peroxidation enzymes in senescing tobacco leaves during postflooding. **Plant Science**, Limerick, v. 96, n. 1/2, p. 41-44, 1994.

IVANOV, S. et al. Alterations in some oxidative parameters in susceptible and resistant wheat plants infected with *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 162, p. 275-279, 2004.

IVANOVA, D. G. et al. Effect of *Phytophthora infestans* infection on superoxide dismutase dependent cytochrome c - reducing activities of leaves as related to resistance of potato plants to late blight. **Physiology and Biochemistry**, Moscow, v. 78, p. 151-156, 1991.

INGRAN, J.; BARTELS, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 377-403, 1996.

INTERNATIONAL RUBBER STUDY GROUP. **Statistical summary of world rubber situation**. Disponível em: <<http://www.rubberstudy.com/statistics-quarstat.aspx>>. Acesso em: 1 ago. 2006.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. **Enzyme nomenclature – EC 1.11.1.7. (Peroxidase)**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/7.html>>. Acesso em: 25 jun. 2007.

IRIGOYEN, J. J.; EMERICH, D. W.; SANCHEZ-DIAZ, M. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. **Physiology Plant**, Lancaster, v. 84, p. 55-60, 1992.

JANSEN, M. A. K.; VAN DEN NOORT, R. E. Ultraviolet-b radiation induces complex alteration in stomatal behavior. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 110, p. 189-194, 2000.

JEPSON, I. et al. Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. **Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 26, p. 1855-1866, 1994.

JOHN, K. P. A hitherto undescribed leaf disease of hevea rubber caused by a species of *Colletotrichum*. **Journal of the Rubber Research Institute of Malaya**, Kuala Lumpur, v. 14, p. 11-19, 1952.

JUNG, S. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 42, p. 225-231, 2004.

KAWANO, T. et al. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. **Physiology Plant**, Lancaster, v. 39, p. 721-730, 1998.

KIM, Y. H. et al. Overexpression of sweet potato swpa4 peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco. **Planta**, Berlin, v. 227, p. 867-881, 2008.

KOMAROVA, E. P.; DAVIDOVICH, L. A. Involvement of phenolcarbonic acids and phenol-oxidizing enzymes in rye defense necrotic response to leaf rust infection. **Russian Journal of Plant Physiology**, Minsque, v. 44, p. 749-755, 1997.

KUC, J. Induced immunity to plant disease. **Bioscience**, Washington, DC, v. 32, p. 854-860, 1982.

KUZNIAK, E.; SKLODOWSKA, M. Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, Limerick, v. 160, p. 723-731, 2001.

KYUNG, H. K. et al. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, Guelph, v. 95, p. 466-473, 2005.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531 p.

LEITE, B.; STAMGARLIN, J. R. Fisiologia e bioquímica de doenças fúngicas. In: PASCHOLATI, S. F. et al. (Eds.). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 115-152.

LEONARDO, M. Estado nutricional e componentes da produção de plantas de pimentão conduzidas em sistema de fertirrigação durante indução de estresse salino em cultivo protegido. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 4, p. 883-889, 2008.

LEVINE, A. J.; WU, X. P53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. **Proceedings of National Academy of Science**, Washington, DC, v. 91, p. 3602-3606, 1994.



LI, B. J.; LI, F. Y. Changes in activities and electrophoretic patterns of peroxidase and polyphenoloxidases in cucumbers during infection with *Cladosporium cucumerinum*. **Scientia Agricultura Sinica**, Beijing, v. 31, p. 86-88, 1998.

LIANG, K. Y.; SCOTT, L. Z. Longitudinal data analysis using generalized linear models. **Biometrika**, London, v. 73, n. 1, p. 13-22, Apr. 1986.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymology**, New York, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIEBEREI, R. South American leaf blight of the rubber tree (*Hevea* spp.): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. **Annals of Botany**, London, v. 100, p. 1125-1142, 2007.

LIU, H. X. et al. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology Technology**, Foster, v. 35, p. 263-269, 2005.

LOW, P. S.; MERIDA, J. R. The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 96, p. 533-542, 1996.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCAS J. A. **Plant pathology and plant pathogens**. Oxford: Blackwell Science, 1998. 274 p.

MALANGA, G.; PUNTARULO, S. Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, p. 672-679, 1995.

MANNERVIK, B.; GUTHENBERG, C. Glutathione transferases (human placenta). **Methods Enzymology**, New York, v. 77, p. 231-235, 1981.

MARRS, K. A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 127-158, 1996.

MARUR, C. J. Fotossíntese e translocação de carboidratos em algodoeiros submetidos a déficit hídrico após a aplicação de cloreto de mepiquat. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, p. 59-64, 1998.

MARTINEZ, C. et al. Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. malvacearum race 18. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Columbia, v. 11, p. 1038-1047, 1998.

MEDHY, M. C. et al. The role of activated oxygen species in plant disease resistance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 98, p. 365-374, 1996.

MELLERSH, D. G. et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. **The Plant Journal**, Oxford, v. 29, p. 257-258, 2002.

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, Amsterdam, v. 9, p. 490-498, 2004.

MLÍCKOVÁ, K. et al. Plant Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium Neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. **Physiology and Biochemistry**, Navarra, v. 42, p. 753-761, 2004.

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459-481, 2007.

MORIONDO, M. et al. The effect of downy and powdery mildew on grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaf gas exchange. **Phytopathology**, Ithaca, v. 153, p. 350-357, 2005.

NEIL, S. J. et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signal molecules in Planting. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 1237-1247, 2002.

NELDER, J. A.; WEDDERBURN, R. W. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society: series A**, London, v. 135, n. 3, p. 370-384, 1972.

OKU, H. **Plant pathogenesis and disease control**. Boca Raton: Lewis, 1994. 193 p.

OROZCO-CARDENAS, M. L.; RYAN, C. Hydrogen peroxide is generated systematically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 96, p. 6553-6557, 1999.

OROZCO-CARDENAS, M. L.; NARVAEZ-VASQUEZ, J.; RYAN, C. A. Hydrogen peroxide act as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 179-191, 2001.

ORTOLANI, A. A. et al. Modelos agrometeorológicos para estimativa da produção anual e sazonal de latex em seringueira. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 1, p. 147-150, 1996.

PACOLA, A. A. **Transformações e neogênese de minerais em um latossolo vermelho escuro por ação antrópica de cultivo e adição química**. 1997. 177 f. Tese (Livre Docência em Geologia Agrícola)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

PALLET, K. E.; YOUNG, A. J. Carotenoids. In: ALSCHER, R. G.; HESS, J. L. (Eds.). **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 91-110.

PANAGOPOULOS, L.; BORNMAN, J. F.; BJORN, L. O. Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultra weak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. **Journal Photochemistry Photobiology**, Amsterdam, v. 8, p. 73-87, 1990.

PANDOLFINI, T.; GABRIELLI, R. R.; COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant Cell Environ**, Orsay, v. 15, p. 719-725, 1992.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos de resistência as doenças. In: LUZ, W. C. (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas**. Passo Fundo, 1994. v. 2. p. 1-51.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência: In: BERGAMIN, F. A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 193-217.

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. **Trends Plant Science**, Amsterdam, v. 65, p. 1879-1893, 2004.

PAVET V, O. E. et al. Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 139, p. 1291-1303, 2005.

PELLINEM, R. I. et al. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 130, p. 549-560, 2002.

PETCH, T. Description of new Ceylon fungi. **Annual Report of Botanical Gardens**, Peradeniya, v. 3, p. 1-10, 1906.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Oxidative stress response of *Kluyveromyces marxianus* to hydrogen peroxide, paraquat and pressure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, p. 842-847, 2002.

PLAZEK, A.; ZUR, I. Cold-induced plant resistance to necrotrophic pathogens and antioxidant enzyme activities and cell membrane permeability. **Plant Science**, Limerick, v. 164, p. 1019-1028, 2003.

PRASAD, K. V. S. K.; SARANDHI, P. P.; SHARMILA, P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 42, p. 1-10, 1999.

PRASSAD, T. K. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**, Rockville, v. 6, p. 65-74, 1994.

PSHIBYTKO, N. L.; ZENEVICH, L. A.; KABASHNIKOVA, L. F. Changes in the photosynthetic apparatus during *Fusarium* wilt of tomato. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 53, p. 25-31, 2006.

PUSHPARAJAH, E. Problems and potentials for establishing *Hevea* under difficult environment conditions. **Planter**, Kuala Lumpur, v. 59, p. 242-251, 1980.

QUEIROZ, C. G. S. et al. Chilling induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea Arabica* L. roots. **Biology Plantarum**, Praha, v. 41, n. 3, p. 403-413, 1998.

QUEIROZ, C. G. S.; GARCIA, Q. S.; LEMOS FILHO, J. P. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 14, n. 1, p. 59-63, Jan./Apr. 2002.

RAO, M. V.; DAVIS, K. R. The physiology of ozone-induced cell death. **Planta**, Berlin, v. 213, p. 682-690, 2001.

RAU, W. Functions of carotenoids other than in photosynthesis. In: GOODWIN, T. W. (Ed.). **Plant pigments**. London: Academic Press, 1988. p. 231-255.

ROITSCH, T. Source-sink regulation by sugar and stress. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, p. 198-206, 1999.

ROMEIRO, R. S. **Bioquímica da interação bactéria-planta**. Viçosa, MG: UFV, 1985. 37 p.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa, MG: UFV, 1995. 367 p.

RUTH LUPU, S.; GROSSMAN, S.; COHIN, Y. The involvement of lipoxygenase and antioxidants in pathogenesis of powdery mildew on tobacco plants. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 16, p. 241-248, 1980.

RYTER, S. W.; TYRREL, R. M. Singlet molecular oxygen: a possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 24, p. 1520-1534, 1998.

SABRI, N.; DOMINY, N. J.; CLARKE, D. D. The relative tolerances of wild and cultivated oats to infection by *Erysiphe graminis* f.sp. avenae: II. The effects of infection on photosynthesis and respiration. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, p. 321-335, 1997.

SADRAS, V. O. et al. Effect of *Verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower. **Annals of Botany**, Oxford, v. 86, p. 1007-1015, 2000.

SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. **Biology Plantarum**, Praha, v. 43, p. 381-386, 2000.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C. W. 1991. **Plant physiology**. 3rd ed. Belmont: Wadsworth, 1991. 692 p.

SARRIA VILLA, G. A. **Indução de resistência em citros contra *Phytophthora citrophthora* e *Phytophthora nicotianae***: método de inoculação, seleção de indutores, aspectos fisiológicos e bioquímicos. 2010. 85 f. Tese (Mestrado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, p. 7-12, 1993.

SERGIEV, I.; ALEXIEVA, V.; KARANOV, E. Effect os spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. **Compte Rendus Academy Bulgarian Science**, Braila, v. 21, p. 121-124, 1997.

SCHRECK, R.; RIEBER, P.; BAEUERLE, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. **EMBO Journal**, Oxford, v. 10, p. 2247-2258, 1991.

SKERGET, M. et al. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activies. **Food Chemistry**, Barking, v. 89, p. 191-198, 2005.

SILVA, R. F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murchas (*Rasltonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)**. 2007. 109 f. Tese (Doutorado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SILVEIRA, A. P.; CARDOSO, R. M. G. Ocorrência de *Colletotrichum gloeosporioides* em Seringueira (*Hevea brasiliensis*) no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 13, n. 1/2, p. 19, 1987.

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E. L.; LOPES, M. E. B. M. Antracnose: nova doença do painel de sangria da seringueira. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 18, n. 3/4, p. 195-200, 1992a.

SILVEIRA, A. P.; FURTADO, E. L.; LOPES, M. E. B. M. **Antracnose da seringueira no Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Biológico, 1992b. 3 p.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication. **New Phytologist**, New York, v. 125, p. 27-28, 1993.

SMIRNOFF, N. Plant resistance to environmental stress. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 9, p. 214-219, 1998.

SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P. L.; LOEWUS, F. A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 437-467, 2001.

SOMASHEKARIAH, B. V.; PADMAJA, H.; PRASAD, A. R. K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 85, p. 85-89, 1992.

SOMOGY-NELSON, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 160, p. 61-63, 1945.

STASKAWICZ, B. J. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, New York, v. 268, p. 661-667, 1995.

STRID, A.; CHOW, W. S.; ANDERSON, J. M. UV-B damage and protection at the molecular level in plants. **Photosynthesis Research**, The Hague, v. 39, p. 475-489, 1994.

TAKAMIYA, K.; TSUCHIYA, T.; OHTA, H. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, p. 426-431, 2000.

TANG, X.; ROLEE, S. A.; SCHOLDS, S. D. The effect of *Albugo Candida* (white blister rust) on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of leaves of *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 19, p. 967-975, 1996.

TAYLOR, L.; DAYS, D. A.; MILLAR, A. H. Environmental stress causes oxidative damage to plant mitochondria leading to inhibition of glycine decarboxylase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 45, p. 42663–42668, 2002.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, Shannon, v. 153, p. 65-72, 2000.

THÉRON, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, London, v. 3, p. 373-384, 2000.

TOMANKOVA, K. et al. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 68, p. 22-32, 2006.

TSANG, E. W. T. et al. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, p. 783-792, 1991.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Limerick, v. 164, p. 645-655, 2003.

WASTIE, R. L. Nursery screening of hevea for resistance to *Gloeosporium* leaf disease. **Rubber Research Institute of Malaysia**, Kuala Lumpur, v. 23, n. 5, p. 339-350, 1973.

WASTIE, R. L. Diseases of rubber and their control. **PANS**, London, v. 27, p. 268-288, 1975.

WU, J.; OMOKAWA, H.; HATZIOS, K. K. Glutathione S-transferase activity in unsafened and fenclorim-safened rice (*Oryza sativa*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 54, p. 220-229, 1996.



YAN, B. et al. Flooding-induced membrane damage, lipidoxidation and activated oxygen generation in corn leaves. **Plant and Soil**, The Hague, v. 179, n. 2, p. 261-268, 1996.

YANG, R. W. P. Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium calmodulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, DC, v. 99, p. 4097-4102, 2002.

YU, J. et al. Effects of CO<sub>2</sub> enrichment on photosynthesis, lipid peroxidation and activities of antioxidative enzymes of *Platymonas subcordiformis* subjected to UV-B radiations stress. **Acta Botanica Sinica**, São Paulo, v. 46, p. 682-690. 2004.