

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

**ESTRESSE OXIDATIVO EM CLONES DE SERINGUEIRA SOB
ATAQUE DE OÍDIO**

GISELY CRISTINA GONZALEZ

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

**BOTUCATU – SP
Setembro/2011**

UNIVERSIDADE PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CÂMPUS DE BOTUCATU

**ESTRESSE OXIDATIVO EM CLONES DE SERINGUEIRA SOB
ATAQUE DE OÍDIO**

GISELY CRISTINA GONZALEZ

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Catarina Cataneo

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Furtado

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da UNESP – Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Mestres 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)

G643e Gonzalez, Gisely Cristina, 1984-
 Estresse oxidativo em clones de seringueira sob ataque
 de oídio / Gisely Cristina Gonzalez. - Botucatu : [s.n.],
 2011
 xiv, 90 f. : il. color, gráfs., tabs., fots.

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

 1. Bioquímica. 2. Enzimas antioxidantes. 3. Oídio.
 4. Plantas - Efeito da tensão. 5. Seringueira. I. Cataneo,
 Ana Catarina. II. Furtado, Edson Luiz. III. Universidade
 Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de
 Botucatu). Faculdade de Ciências Agronômicas. IV. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS

CAMPUS DE BOTUCATU

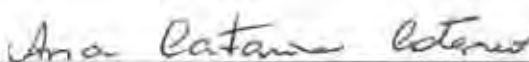
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ESTRESSE OXIDATIVO EM CLONES DE SERINGUEIRA SOB ATAQUE
DE OÍDIO"

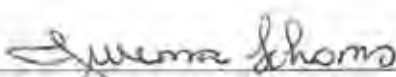
ALUNA: GISELY CRISTINA GONZALEZ

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ANA CATARINA CATANEO

Aprovado pela Comissão Examinadora


PROFA. DRA. ANA CATARINA CATANEO


PROFA. DRA. TERESINHA DE FÁTIMA FUMIS


PROFA. DRA. JUREMA SCHONS

A terra não pertence ao homem; é o homem que pertence a terra, disso temos certeza. Todas as coisas estão interligadas, como o sangue que une uma família. Tudo está relacionado entre si. Tudo quanto agride a terra, agride os filhos da terra, não foi o homem quem teceu a trama da vida. Ele é meramente um fio da mesma. Tudo que ele fizer a terra, a si próprio fará.

F. Pierre

Dedico

*Aos meus pais, por serem
importantes em todos os momentos da
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo;

Aos meus pais, Luis e Elizabeth, por serem pessoas maravilhosas que sempre me apoiaram e me incentivaram. Essa conquista não é apenas minha, e sim nossa, pois vocês são fundamentais na minha vida. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs, Carina e Ana Beatriz, pelo apoio, carinho, incentivo e amor.

A querida professora Doutora Ana Catarina Cataneo pela oportunidade, confiança, orientação, amizade e por seu exemplo de profissionalismo e competência.

Ao professor Doutor Edson Luiz Furtado, pela prontidão de sanar as dúvidas, apoio, incentivo e amizade.

A professora Doutora Martha Mischan pela prontidão, orientação e dedicação.

As professoras doutoras Inês Cechin, Jurema Schons, Luciana Franscisco Fleuri, Teresinha de Fatima Fumis e aos doutores José Claudionir Carvalho e Leonardo Cesar Ferreira pelo apoio, dedicação, amizade e sábios esclarecimentos.

A todos os professores e funcionários da pós-graduação e graduação que contribuíram para o meu aprendizado e formação profissional.

A Cristiane, Giselaïne, Juan, Maíra, Marina, Mário, Martha e Natalia pelo companheirismo, amizade, troca de experiências e ajuda nas análises bioquímicas.

Aos amigos Ariane, Edvar, Jéssica, José Francisco, Rafael, Renata, Rosemeire e Valéria por toda alegria e apoio pelas palavras de incentivo.

Ao viveiro POLIFER pelos clones de *Hevea brasiliensis* cedidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
1. RESUMO.....	01
2. SUMMARY.....	03
3. INTRODUÇÃO.....	05
4. OBJETIVOS.....	08
5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
5.1 A cultura de seringueira.....	09
5.1.1 O gênero <i>Hevea</i>	09
5.1.1.1 Espécie <i>Hevea brasiliensis</i>	10
5.1.2 Histórico.....	11
5.1.2.1 A seringueira no estado de São Paulo.....	12
5.1.3 Importância econômica.....	13
5.2 <i>Oidium heveae</i> e seringueira.....	13
5.2.1 Etiologia.....	14
5.2.2 Sintomas.....	15
5.3 Interação planta-patógeno.....	16
5.4 Indicadores de estresse oxidativo.....	20
5.4.1 Lipoeróxidos.....	20
5.4.2 Açúcares solúveis.....	21
5.4.3 Pigmentos fotossintéticos.....	21
5.4.4 Peróxido de hidrogênio.....	22
5.5 Enzimas antioxidantes.....	23
5.5.1 Glutathione S-transferases.....	23

5.5.2 Superóxido dismutases.....	24
5.5.3 Peroxidases.....	24
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
6.1 Material vegetal e condução do experimento.....	26
6.2 Coleta das amostras.....	28
6.3 Análises bioquímicas.....	29
6.3.1 Quantificação dos indicadores de estresse.....	29
6.3.1.1 Lipoperóxidos.....	29
6.3.1.2 Extração e quantificação de açúcares totais e redutores.....	30
6.3.1.3 Pigmentos fotossintéticos.....	31
6.3.1.4 Peróxido de hidrogênio.....	32
6.3.2 Determinações enzimáticas.....	32
6.3.2.1 Obtenção dos extratos enzimáticos.....	33
6.3.2.2 Determinação da atividade da glutational S-transferase.....	34
6.3.2.3 Determinação da atividade da superóxido dismutase.....	35
6.3.2.4 Determinação da atividade da pirogalol peroxidase.....	36
6.3.2.5 Determinação de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos.....	37
6.4 Delineamento experimental.....	38
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
8. CONCLUSÕES.....	73
9. REFERÊNCIAS	75

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Análise fatorial (*) de lipoperóxidos, clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total, carotenóides, açúcares solúveis totais e redutores e H ₂ O ₂ em plantas de <i>H. brasiliensis</i> , clones RRIM600, GT1 e PR255, sadias ou infectadas por <i>O. heveae</i> . Valores p = probabilidade de um valor > F.....	41
2. Comparação das médias (*) dos teores de lipoperóxidos de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	42
3. Comparação das médias (*) dos teores de clorofila total de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	45
4. Comparação das médias (*) dos teores de clorofila <i>a</i> de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	47
5. Comparação das médias (*) dos teores de clorofila <i>b</i> de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	49
6. Comparação das médias dos teores de carotenóides de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	52
7. Comparação das médias (*) de açúcares solúveis totais de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	55
8 Comparação das médias (*) de açúcares solúveis redutores de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	57

9. Comparação das médias (*) de peróxido de hidrogênio de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	61
10. Análise fatorial (*) de GST, SOD e POD em plantas de <i>H. brasiliensis</i> , clones RRIM600, GT1 e PR255, sadias ou inoculadas por <i>O. heveae</i> . Valores p = probabilidade de um valor > F	63
11. Comparação das médias (*) da atividade da GST de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	65
12. Comparação das médias (*) de superóxido dismutase de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	67
13. Comparação das médias (*) da atividade das peroxidases de clones de <i>H. brasiliensis</i> sadias e inoculadas por <i>O. heveae</i> as 0, 48, 96, 144 e 192 h.....	70

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Sintomas visuais da face abaxial de folíolos de <i>H. brasiliensis</i> infectadas por <i>O. heveae</i>	15
2. Sintomas visuais da face adaxial de folíolos de <i>H. brasiliensis</i> infectadas por <i>O. heveae</i>	15
3. Esquema da ação da SOD na eliminação das EROs.....	24
4. Esquema da ação da POD na eliminação das EROs.....	25
5. Clones de <i>H. brasiliensis</i> RRIM600(a), GT1 (b) e PR255 (c).....	27
6. Pulverização nas folhas de <i>H. brasiliensis</i> com solução aquosa contendo conídios de <i>O. heveae</i>	28
7. Plantas de <i>H. brasiliensis</i> deixadas no escuro por 12 horas após pulverização por <i>O. heveae</i>	28
8. Esquema do preparo das amostras foliares de <i>H. brasiliensis</i>	28
9. Esquema da técnica da determinação do conteúdo de lipoperóxidos.....	30
10. Esquema da técnica da determinação do conteúdo açúcares solúveis totais e redutores.....	31

11. Esquema da técnica da determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos.....	32
12. Esquema da determinação de peróxido de hidrogênio.....	33
13. Esquema da técnica utilizada da obtenção dos extratos enzimáticos.....	34
14. Esquema da técnica da determinação Glutathione S-transferase.....	34
15. Esquema da técnica utilizada na determinação da atividade da superóxido dismutase.....	36
16. Esquema da técnica da determinação da atividade da pirogallol peroxidase.....	37
17. Esquema da técnica da determinação dos teores de proteínas.....	38
18. Teores de lipoperóxidos em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.....	43
19. Teores de lipoperóxidos em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	43
20. Teor de Clorofila total em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.....	46
21. Teor de Clorofila total em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	46

22. Teores de Clorofila <i>a</i> em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.	48
23. Teores de Clorofila <i>a</i> em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	48
24. Teores de Clorofila <i>b</i> em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.....	50
25. Teores de Clorofila <i>b</i> , em em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	50
26. Teores de carotenóides em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.	53
27. Teores de carotenóides em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	53
28. Teores de açúcares solúveis totais em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.....	56
29. Teores de açúcares solúveis totais em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	56
30. Teores de açúcares solúveis redutores em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.	58
31. Teores de açúcares solúveis redutores em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	58

32. Teores de peróxido de hidrogênio em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.....	62
33. Teores de peróxido de hidrogênio em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	62
34. Atividade da GST em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.	66
35. Atividade da GST em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	66
36. Atividade da SOD em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.	68
37. Atividade da SOD em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	68
38. Atividade da POD em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.	71
39. Atividade da POD em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de <i>O. heveae</i> em diferentes períodos.....	71

1. RESUMO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A.D.C.) Müell. Arg.] possui a maior capacidade produtiva de látex ao compará-la com outras espécies do mesmo gênero, podendo ser utilizada para reflorestamento, recuperação de áreas degradadas e em sistemas agroflorestais. Porém, a produtividade desta cultura pode ser afetada pela ocorrência de fungos patogênicos, dentre eles o *Oidium heveae* e causa uma das mais importantes doenças da seringueira, o oídio. No presente trabalho foi estudada a infestação do *O. heveae* em mudas de três clones de *H. brasiliensis*: RRIM 600, GT1 e PR255, com o objetivo de determinar algumas alterações bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo e conhecer a correlação destes com a resistência dos clones infectados. O presente experimento foi conduzido em ambiente aberto sob condições fotoperiódicas naturais em setembro de 2010. No início do período experimental as plantas de seringueira foram infectadas através da pulverização de uma solução aquosa contendo *O. heveae* na concentração de 16×10^4 conídios mL⁻¹. No dia da inoculação e após 48, 96, 144 e 192 h foram coletadas amostras foliares para determinação das atividades das enzimas antioxidantes glutatona S-transferase, superóxido dismutase e peroxidase, bem como os indicadores de estresse oxidativo, tais como, lipoperóxidos, pigmentos fotossintéticos, açúcares solúveis e peróxido de hidrogênio. O estresse gerado pelo patógeno não alterou significativamente o teor de lipoperóxidos e os açúcares solúveis totais e redutores. Degradação nos pigmentos fotossintéticos e diminuição nos teores de H₂O₂ no período de infecção foi observada nos clones de seringueira estudados. Atividade das enzimas

antioxidantes GST, SOD e POD foi maior no clone RRIM600 e não foi alterada nos demais clones após inoculação por *O. heveae*. Portanto, houve estresse oxidativo nos clones de seringueira estudados, indicado pela degradação dos pigmentos fotossintéticos e diminuição dos teores de peróxido de hidrogênio. O clone RRIM600 apresentou reação ao ataque do patógeno, através do aumento da atividade das enzimas antioxidantes GST, SOD e POD.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes; *Hevea brasiliensis*; *Oidium heveae*; indicadores de estresse.

OXIDATIVE STRESS IN DIFFERENT CLONES OF RUBBER UNDER ATTACK OF POWDERY MILDEW. Botucatu, 2011. 90p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: GISELY CRISTINA GONZALEZ

Advisor: ANA CATARINA CATANEO

Co-advisor: EDSON LUIZ FURTADO

2. SUMMARY

The rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. Of Juss.) Muell. Arg.] has the largest production capacity of latex in comparison of other species of the genus and can be used for reforestation, rehabilitation of degraded lands and agroforestry. However, the productivity of this crop may be affected by the occurrence of pathogenic fungi, such as *Oidium heveae* and causes one of the most important diseases of rubber trees, powdery mildew. In this work was studied the infestation of *O. heveae* on seedlings of three clones of *H. brasiliensis* RRIM 600, GT1 and PR255, in order to determine some biochemical changes related to oxidative stress related to resistance of infected clones. This experiment was conducted in open air under natural photoperiodic conditions in September 2010. At the beginning of the trial period the rubber plants were infected by spraying an aqueous solution containing *O. heveae* at concentration of 16×10^4 conidia mL⁻¹. On the day of inoculation and after 48, 96 144 and 192 h leaf samples were collected for determination of the activities of antioxidant enzymes glutathione S-transferase, superoxide dismutase and peroxidase, as well as indicators of oxidative stress, such as lipoperoxides, photosynthetic pigments, soluble sugars and hydrogen peroxide. The stress generated by the pathogen did not significantly alter the content of lipoperoxides and total and reduced soluble sugars. Degradation in photosynthetic pigments and decreased the levels of H₂O₂ in the period of infection was observed in clones of rubber studied. Activity of antioxidant enzymes GST, SOD and POD was higher in clone RRIM600 and was unchanged in the other clones after inoculation by *O. heveae*. Therefore, the oxidative

stress in rubber three clones studied, indicated by the degradation of photosynthetic pigments and low levels of hydrogen peroxide. The clone RRIM600 presented reaction to pathogen attack by increasing the activity of antioxidant enzymes GST, SOD and POD .

Keywords: Antioxidant enzymes; *Hevea brasiliensis*; *Oidium heveae*; stress indicators.

3. INTRODUÇÃO

A seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd.ex Adr. De Juss.) Müell. Arg.], é uma espécie arbórea que possui a maior capacidade produtiva de látex, ao compará-la com outras espécies do mesmo gênero, e um dos cultivos mais importantes do Brasil, podendo também ser utilizada para reflorestamento, recuperação de áreas degradadas e em sistemas agroflorestais. Essa espécie pode ser afetada pelo fungo fitopatogênico *Oidium heveae* Steinm., uma das mais importantes doenças da seringueira, o qual ocorre com maior intensidade nos países asiáticos, porém, no Brasil, têm sido relatados surtos da doença, principalmente no Estado de São Paulo (FURTADO; SILVEIRA, 1993).

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 permanente” (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.

Embora ocorram estresses abiótico e biótico nas plantas, 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 (SMIRNOFF, 1998). O segundo é comum em densas coberturas vegetais e onde os animais e microorganismos 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 plantações, reduzindo a colheita e seu valor, e pode 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 e enzimas antioxidantes (FLOWERS et al., 2000).

A necessidade de novas cultivares de seringueira adaptáveis a diferentes regiões ecológicas constitui um ponto basicamente 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 aquelas sujeitas a diferentes características edafoclimáticas. Segundo Ortolani et al. (1983) vários elementos agroclimáticos, tais como, deficiência hídrica, temperatura e pluviosidade afetam vários componentes do crescimento e produção e 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 única planta matriz. Todas as árvores de um clone possuem a mesma constituição genética, responsável pela uniformidade existente entre elas (GONÇALVES, 1998). Dentre os diferentes tipos de clones de *Hevea brasiliensis* há aqueles que são resistentes ou suscetíveis a *O. heveae*. Por isso, sob estresse por oídio, o uso de clones resistentes é recomendado como medida de controle (GASPAROTTO et al., 1997).

Um melhor conhecimento das respostas bioquímicas em seringueira sob estresse biótico potencializaria a produção e a diminuição dos riscos aos heveicultores. Portanto, este estudo visou direcionar o conhecimento dos aspectos bioquímicos envolvidos no mecanismo de interação planta-patógeno, envolvendo três clones de *H. brasiliensis*, RRIM600, GT1 e PR255, sob estresse por *O. heveae* e elucidar as respostas dos diferentes clones de seringueira infectados por oídio, avaliando as alterações bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo.

4. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Estudar a relação dos indicadores bioquímicos de estresse oxidativo (lipoperóxidos, pigmentos fotossintéticos e açúcares solúveis totais) e alterações das enzimas antioxidantes (GST, SOD e POD), com a resistência de diferentes clones de *H. brasiliensis* infectados por oídio (*O. heveae*);
- Avaliar a possibilidade da possibilidade de uso desses conhecimentos como marcadores bioquímicos para melhoramento genético de *H. brasiliensis*, visando resistência a oídio (*O. heveae*).

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 A Cultura de seringueira

5.1.1 O gênero *Hevea*

O gênero *Hevea*, pertence à família Euphorbiaceae, compreende onze espécies (GONÇALVES, 1998), as quais ocorrem em uma área abrangendo a Bacia Amazônica por inteiro, estendendo-se em direção ao sul da Bolívia Oriental sub-andina e ao norte até a parte alta da bacia do rio Orenoco e o baixo Essequibó. Essa grande área cobre parte do Brasil, Bolívia, Peru, Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname e Guiana. No Brasil, a área de distribuição geográfica abrange os Estados do Amazonas, Pará, Acre, Roraima e Amapá até o meridiano 46° à noroeste do Estado do Maranhão, norte do Estado do Mato Grosso e Rondônia (MOZAMBANI, 1994).

A seringueira pertencente ao gênero *Hevea*, da família Euphorbiaceae, possui a *Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Muell.-Arg. como a espécie mais importante (GONÇALVES et al., 2002).

5.1.1.1 Espécie *Hevea brasiliensis*

A espécie *Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. de Juss.) Müell. Arg., popularmente conhecida por seringueira, seringueira-branca ou árvore-da-borracha, é caracterizada pela presença de látex, folhas compostas trifolioladas com folíolos membranáceos e glabros, atingindo cerca de 20 e 30 m de altura. Planta semidecídua, heliófita, característica da floresta tropical amazônica de várzeas inundáveis, possui madeira que pode ser utilizada para confecção de tabuados, forros e caixotaria, porém seu maior valor encontra-se no látex, matéria prima da borracha natural, e nas suas sementes, as quais podem ser extraído um óleo secativo, utilizado na indústria de tintas e vernizes (LORENZI, 2002).

Atualmente vários clones de seringueira estão sendo desenvolvidos no mercado, com a finalidade principal de obtenção de elevado potencial de produção e vigor. Os clones são obtidos a partir da propagação vegetativa de uma planta matriz, sendo que todas as árvores de um clone possuem a mesma constituição genética, responsável pela uniformidade existente entre elas (GONÇALVES, 1998). Como exemplos os clones RRIM 600, GT 1 e PR255.

O clone RRIM 600, o mais resistente ao ataque de patógenos e desenvolvido pelo Rubber Research Institute of Malaysia, apresenta indivíduos altos, fuste ereto e de crescimento rápido quando jovem, copa estreita e folhagem esparsa com folhas verde claras. Devido à formação tardia de ramos, pode ocorrer a quebra de plantas, por ação de ventos. Essa cultivar possui casca fina, tornando-a delicada 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 GT1, considerado suscetível a interação planta patógeno, foi desenvolvido na Indonésia, tem caule bem vertical e pode apresentar irregularidades como estrias ou torções na região do enxerto. A abertura de sua copa é bastante tardia e de hábito variável, pois algumas árvores não apresentam galhos líderes e outras sim. 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 e 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).

O clone PR255, moderadamente resistente ao ataque de patógenos, foi desenvolvido pela Proefstation voor rubber, na Indonésia. Caracterizado pela alta produção e possuidor de bons caracteres secundários, o vigor no período de imaturidade é bom e o incremento médio do caule na fase adulta é boa. Possui caule alto e reto. A 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 $1.806 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$. (GONÇALVES; MARQUES, 2008).

5.1.2 Histórico

O subproduto mais importante de *H. brasiliensis*, o látex, foi descoberto em meados do século XVIII e atualmente é a principal fonte natural de borracha natural no mundo.

Em 1827, o Brasil foi o país que iniciou a exportação de borracha natural, principalmente para Europa e Estados Unidos. A crescente demanda pelo subproduto ocorreu no século XIX com o advento do processo de vulcanização, com o intuito da fabricação de pneumáticos e possibilitou o início da indústria automobilística. Assim, o Brasil passou a explorar os seringais nativos e constituiu-se o maior produtor e exportador de borracha natural (PEREIRA et al., 2001).

Os ingleses vislumbraram então, a possibilidade de cultivar seringueira nas colônias localizadas no sudoeste da Ásia, cujas condições edafoclimáticas eram similares às da Amazônia. Enquanto no Brasil utilizava-se o sistema de produção baseado no extrativismo, na Ásia era adotado o sistema de exploração comercial, que foi o principal fator de sucesso na Ásia. Além disso, na Ásia não existia *Microcyclus ulei*, fungo causador do mal-

das-folhas, principal doença dos seringais, sobretudo na Amazônia (PEREIRA et al., 2001).

A baixa produtividade dos seringais brasileiros, em função das técnicas de cultivo adotadas e da ocorrência do mal-das-folhas, provocou quedas na participação brasileira no mercado mundial. Devido à expansão da produção asiática e o aumento da demanda por borracha em função do crescimento da indústria automobilística, o Brasil mudou a posição de exportador para importador (GONÇALVES et al., 2002). Situação que perdura até os dias atuais (RUBBER STATISTICAL NEWS, 2009).

Na década de 80, na busca da auto-suficiência da borracha, o Brasil investiu em pesquisas para o desenvolvimento da cultura da seringueira na Amazônia e no sul da Bahia, porém não foram bem sucedidas devido às condições climáticas favoráveis para alta incidência de doenças. Assim, nas décadas de 80 a 90, a heveicultura migrou para as regiões centro-oeste e sudeste do país, onde as condições eram mais favoráveis ao desenvolvimento da cultura e desfavoráveis aos seus principais patógenos, especialmente *M. ulei* (PEREIRA et al., 2001).

5.1.2.1 A seringueira no estado de São Paulo

Desde 1916, com a introdução das primeiras sementes de seringueira no estado de São Paulo e o plantio comercial desta cultura em 1950 até os dias atuais, a heveicultura vem solidificando suas bases em território paulista (GONÇALVES et al., 2002; MARTINEZ, 2006).

Em avaliações feitas entre 1978-80, a área plantada de seringais era superior a 2.000 ha no estado de São Paulo. Aos poucos, os agricultores e o poder público foram verificando que a heveicultura, além de rentável, apresentava-se como uma das grandes opções de cultivo permanente para sustentação do desenvolvimento de várias regiões do estado, além de constituir-se numa forma de reflorestamento com benefícios ao meio ambiente e seu produto final substituía a matéria prima importada. No campo social, desenvolveu-se mão de obra especializada no meio rural, propiciando investimentos industriais, envolvendo pequenos, médios e grandes produtores (GONÇALVES et al., 2002).

Com a intensificação do plantio, que nos anos 90 atingiu uma área plantada superior a 38.000 ha, distribuída entre mais de 2.000 produtores, o Estado de São Paulo assumiu a liderança da produção brasileira (BENESI, 2011; MARTINEZ, 2006).

5.1.3 Importância Econômica

Em 1994 a produção de borracha natural atingiu o patamar de 45.093 t, dos quais 88,1% eram oriundos de seringais de cultivo e 11,9% de seringais nativos. Houve uma estimativa de que, neste período, do total de borracha (natural e sintética) que o Brasil consumia num ano, 20% era de borracha natural, matéria prima para finalidades específicas (TRINDADE; FURTADO, 1997). Vale evidenciar que o Brasil deixou de ser o maior produtor de borracha natural e atualmente representa 1,18% da produção mundial da borracha natural e necessita importar 234,2 mil toneladas por ano. Atualmente, a China é o maior consumidor de borracha natural (RUBBER STATISTICAL NEWS, 2009).

Atualmente, apesar do crescimento na produção mundial de látex entre os anos 2003 e 2005, há um déficit mundial de produção de 60 milhões de toneladas (RUBBER STATISTICAL NEWS, 2009), 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.

5.2 *Oidium heveae* e seringueira

A cultura de *H. brasiliensis* pode ser afetada por várias doenças, as quais incluem o mal-das-folhas, antracnose e oídio. O último, o fungo *O. heveae*, é um dos principais fitopatógenos obrigatórios de ocorrência cosmopolita que pode diminuir a qualidade e produtividade da seringueira, além de diversas outras culturas de grande importância econômica (GASPAROTTO et al., 1997).

Em plantas de seringueira, o *O. heveae* é caracterizado por atacar folíolos jovens e maduros, pecíolos e brotos tenros (AUER, 2001) e por ser uma das mais importantes doenças da Malásia e outros países do Oriente (FURTADO; SILVEIRA, 1993). No Brasil, esta doença foi relatada pela primeira vez em 1958, no município de Campinas, SP (ROSSETI, 1958). Depois, em 1977, surgiu em plantas no Instituto Biológico em São Paulo e, em 1981, no estado de Pernambuco (GASPAROTTO et al., 1984). Em 1992, nova ocorrência foi observada no Estado de São Paulo atacando plantas em diversas fases de desenvolvimento (FURTADO; SILVEIRA, 1993).

5.2.1 Etiologia

Os agentes causais de oídios são fungos da Divisão *Ascomycota*, Família *Eryshiphaceae*. A fase imperfeita ou assexuada destes fungos correspondente ao gênero *Oidium*, é a principal responsável pela ocorrência da doença nas condições brasileiras (STADNIK& RIVERA, 2001). Segundo Batista et al. (2011), a fase foi relacionada a um fungo do gênero *Erypiphe* sp em estudo no Japão.

O *O. heveae* é um parasita obrigatório, cujo crescimento micelial e esporulação conidial se dão principalmente na face superior do folíolo. As hifas são ramificadas e septadas e dão origem a conidióforos curtos, eretos e não ramificados, a partir dos quais se desenvolvem os conídios, arranjados em cadeias. Os conidióforos são eretos, produzindo de dois a sete conídios hialinos, elípticos, catenulados, medindo 25-45 µm x 12-25 µm. O micélio é branco e se desenvolve superficialmente sobre a área lesionada (GASPAROTTO et al., 1997; STADNIK; RIVERA, 2001).

5.2.2 Sintomas



Fotos: GONZALEZ, G.C.

Figura 1. Sintomas visuais da face abaxial de folíolos de *H. brasiliensis* infectadas por *O. heveae*.



Fotos: GONZALEZ, G.C.

Figura 2. Sintomas visuais da face adaxial de folíolos de *H. brasiliensis* infectadas por *O. heveae*.

Os sintomas são facilmente identificáveis e sempre se manifestam na forma de eflorescência ou bolor pulverulento, de coloração branca ou levemente cinza. Esta eflorescência, formada por micélio, conidióforos e conídios do patógeno, pode ser encontrada em diversos órgãos vegetais como meristemas, ramos jovens, flores, frutos em formação e, principalmente, na face superior das folhas. Em alguns casos, no entanto, pode ser constatada também na face inferior. O patógeno coloniza a área foliar junto às nervuras, especialmente próximo à nervura principal (STADNIK; RIVERA, 2001).

Nos folíolos jovens há o desenvolvimento do micélio branco em ambas as faces da folha, inteiramente ou em colônias. Eles enrugam, tornam-se purpúreos, depois pretos e caem, deixando os pecíolos presos aos ramos. As infecções também ocorrem em pecíolos e brotos tenros e como consequência as folhas maduras tornam-se enrugadas e distorcidas. Em folhas mais velhas, as colônias do fungo podem esporular intensamente por diversas semanas e as lesões adquirem aspecto marrom-avermelhado (GASPAROTTO et al., 1997). Folíolos com mais de 30% da superfície coberta pelo fungo apresentam amarelecimento intenso e desprendem-se com facilidade (FURTADO; SILVEIRA, 1993).

Segundo Rossetti (1958), o ataque do oídio pode manifestar-se em diferentes intensidades, como descrito: a) Algumas manchas nas folhas, sem provocar sua queda; b) Algumas folhas deformadas e manchadas, mas sem desfolha; c) Infecção mais grave, com pronunciada deformação e queda de folhas e d) Plantas gravemente infectadas com perda completa da folhagem e novos ataques sucessivos na brotação que advém após o desfolhamento.

Nas inflorescências de frutos jovens causa danos às flores e queda de frutos tenros (GASPAROTTO et al., 1984). O ataque às inflorescências reduz a quantidade de sementes quando é muito intenso, as flores podem cair e as poucas que permanecem presas à árvore, raramente conseguem abrir e amadurecer (BEELEY, citado por ROSSETTI, 1958).

Segundo Furtado e Silveira (1993), o *O. heveae* tem como hospedeiros também o pinhão paraguaio (*Jatropha curcas*) e a erva de andorinha (*Euphorbia pirulifera*).

5.3 Interação planta-patógeno

Na natureza há uma grande diversidade de microorganismos que estão diretamente em contato com as plantas, mas que não causam, na sua maioria, qualquer dano a estas, o que evidencia a predominância da resistência sobre a suscetibilidade. Caso isso não

ocorresse, qualquer microorganismo seria capaz de infectar uma planta, o que ocasionaria, em pouco tempo, a extinção das espécies vegetais (PASCHOLATI; LEITE, 1994).

Uma das principais revelações das pesquisas sobre defesa vegetal é que a resistência a patógenos é usualmente complexa e tem como base a ação combinada a diversos fatores. A interação entre planta e patógeno pode ter efeito no desenvolvimento e na morfologia do hospedeiro (MORIONDO et al., 2005), no entanto, é evidenciada uma enorme variedade interespecífica em resposta ao estresse biótico (LUCAS, 1998). Vários parâmetros morfológicos e fisiológicos podem ser alterados sob interação planta-patógeno, como massa seca, fenologia (SADRAS et al., 2000), crescimento e área foliar das plantas (MORIONDO et al., 2005).

As defesas vegetais podem ser classificadas como estruturais, baseada em características anatômicas, e químicas, relacionadas a compostos biologicamente ativos (SHEWRY; LUCAS, 1997). Como exemplos de defesas estruturais têm-se a presença de pêlos, espinhos, tricomas e ceras recobrendo principalmente a superfície de caules e frutos (BOWLES, 1990). Já as substâncias relacionadas a defesa química, destacam-se aminoácidos não protéicos, saponinas, fenóis, alcalóides, quitinases, glucanases, flavonóides, inibidores de proteases e alergenos (BOWLES, 1990).

As defesas estruturais e químicas podem ser suficientes para prevenir a colonização de tecidos vegetais. Porém, se a penetração ocorrer, como mecanismo de resposta, as plantas conseguem mudar a constituição de compostos moleculares (SHEWRY; LUCAS, 1997) como a ativação do sistema de defesa induzido.

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).

O acúmulo de substâncias ou estruturas pode ocorrer sob condições de estresse, que são formadas a partir dos carboidratos da via metabólica principal e utilizadas

para o crescimento vegetativo, mas são desviados pelas plantas para a produção de metabólitos secundários (JANSEN; VAN DEN NOORT, 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, agindo contra as Espécies Reativas de Oxigênio (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 as folhas infectadas pelo *Albugo candida* obtiveram 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 é a produção de EROs (AGRAWAL; RATHORE, 2007). Sob condições de estresse, pode ocorrer a destruição do sistema de transporte de elétrons, e, com isso, formar a produção de EROs. Os cloroplastos e as mitocôndrias são as principais organelas para a produção das EROs, uma vez que possuem alta atividade de oxidação metabólica ou com fluxo de elétrons sustentado, o que resulta em estresse oxidativo e conseqüente oxidação de biomoléculas (MITTLER et al., 2004).

As 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). Aumento da produção das EROs tem sido relatado durante interações entre plantas e patógenos, o qual é o principal causador da peroxidação lipídica dos constituintes das membranas celulares, causando alterações das mesmas (ADAM et al., 1995).

O estresse oxidativo é considerado como o agente redutor em muitas situações envolvendo estresse de planta (BELIGNI; LAMATTINA, 1999). Diversas situações de estresse levam à produção na célula das plantas da maioria das formas reduzidas: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o mais poderoso oxidante, o radical hidroxila

(OH[•]) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; BAKER; ORLANDI, 1995). Quando presente em quantidades relativas baixas, as EROs, especialmente H₂O₂ pode agir como sinais para a ativação de respostas de defesa contra o estresse (LEVINE; WU, 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 íons, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (BOWLER et al., 1992; DODGE, 1994). A produção e os efeitos das 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, 1998; BELIGNI; LAMATTINA, 1999).

A produção e acumulação de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio em parede celular tem sido relacionada à presença de agentes patogênicos (MARTINEZ et al., 1998). Aumento da produção de ânion superóxido foi observado em folhas de *Lycopersicon esculentum* durante as primeiras horas pós-inoculação do *Oidium neolycopersici* (MLÍCKOVÁ et al., 2004). O ataque de patógenos também pode induzir mudanças nos níveis de H₂O₂ 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 as enzimas glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutases (SOD), peroxidases (POD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), 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).

5.4 Indicadores de estresse oxidativo

5.4.1 Lipoperóxidos

A formação de lipoperóxidos, que é uma das conseqüências da produção de EROs, é um indicador utilizado para se avaliar nas plantas o nível de estresse oxidativo presente (VERMA; DUBEY, 2003). A importância das EROs em causar alterações nos lipídios tem levado a inúmeras pesquisas para determinar o melhor marcador em tecidos e fluidos biológicos (THÉRON et al., 2000). Aumentos 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, 1994), 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* (DE VOS et al., 1989), trigo (PANDOLFINI et al., 1992), soja (CAKMAK; HORST, 1991) e feijão (SOMASHEKARIAH et al., 1992).

Em trabalho utilizando o fungicida oxiclureto 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.

Assim, 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).

5.4.2 Açúcares solúveis

Existem outros indicadores bioquímicos para a detecção de senescência 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).

5.4.3 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).

No que diz respeito aos carotenóides, estes pigmentos estão relacionados à proteção celular contra danos oxidativos, em que se destaca o ciclo das xantofilas (MITLER, 2006), com a função de dissipar o excesso de energia da clorofila na forma de calor (VIDAL; MEIROTTO JUNIOR, 2001).

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 em plantas de aveia infectadas por *Erysiphe graminis* diminuição nos pigmentos fotossintéticos, clorofilas *a* e *b*.

5.4.4 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 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 elicitación da resposta vegetal (APOSTOL et al., 1989). Por ser um oxidante forte, pode iniciar 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, esta ERO pode atuar como uma molécula sinalizadora que controla diferentes respostas e estímulos, tanto em células animais, como vegetais (FINDEL, 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 uma 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). 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).

5.5 Enzimas antioxidantes

As plantas possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos para minimizar o efeito do estresse oxidativo. Flavonóides, alcalóides, glutathione entre outros são exemplos de mecanismos antioxidantes não enzimáticos. Já a glutathione S-transferases, superóxido dismutase e peroxidases pertencem ao grupo dos mecanismos antioxidativos enzimáticos (APEL; HIRT, 2004; SCANDALIOS, 2005).

5.5.1 Glutathione S-transferases

As glutathione S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2010) são enzimas de desintoxicação por metabolizarem um ampla variedade de compostos exógenos tóxicos, chamados “xenobióticos”. Elas são enzimas multifuncionais, compostas por duas subunidades, que catalisam a conjugação do tripeptídeo glutathione (GSH, γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) 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 destes compostos, 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; BARTLING et al., 1993).

5.5.2 Superóxido dismutases

As superóxido dismutases (SODs, EC 1.15.1.1) (INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY - IUBMB, 2010) são metaloproteínas 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 pelas EROs, 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).



Figura 3. Esquema da ação da SOD na eliminação das EROs.

5.5.3 Peroxidases

As peroxidases (PODs, EC 1.11.1.7) (IUBMB, 2010) estão presentes em todas as fases de crescimento das plantas e envolvidas em uma ampla quantidade de processos fisiológicos (KIM et al., 2008). As PODs existem em uma variedade de isoformas, que usam diferentes redutores e estão localizadas em vários compartimentos celulares (CAMPA, 1991). Elas desempenham um importante papel na biossíntese da parede celular e nas reações de oxiredução causadas por alterações ambientais, reações infecciosas e fermentos (Figura 4) (HIRAGA et al., 2001).

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*.



Figura 4. Esquema da ação da POD na eliminação das EROs.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Material vegetal e condução do experimento

O experimento foi conduzido em área pertencente ao Laboratório de Patologia Florestal, do setor de Defesa Fitossanitária, no Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas e as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Xenobióticos do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências, ambos da UNESP, Botucatu, SP.

Clones de *H. brasiliensis*, RRIM 600, GT1 e PR255, obtidos da empresa Polifer S/A, localizada em Macauba, São Paulo, foram plantados em vasos com capacidade para 10L contendo solo devidamente adubado com NPK e mantidos em ambiente aberto localizado no Departamento de Produção Vegetal – Setor de Defesa Fitossanitária, na Faculdade de Ciências Agronômicas – UNESP, Campus de Botucatu, sob condições de campo, temperatura média entre 12,9 e 24,2°C, umidade relativa de 46,2% e irrigadas com

água da torneira sempre que necessário (Figura 5). O experimento foi realizado em setembro de 2010.



Figura 5. Clones de *H. brasiliensis* RRIM600(a), GT1 (b) e PR255 (c).

Os três clones foram divididos em dois grupos: plantas saudáveis e plantas inoculadas. Para obtenção do inóculo, uma solução aquosa contendo 16×10^4 conídios/mL foi preparada a partir de folhas de *H. brasiliensis* infectadas por *O. heveae* coletadas em jardim clonal do setor de Defesa Fitossanitária, da Faculdade de Ciências Agronômicas. A contagem dos conídios foi determinada em câmara de Neubauer.

As folhas das plantas saudáveis foram pulverizadas com água destilada, já a inoculação nos clones de *H. brasiliensis* foi realizada através da pulverização nas folhas com a solução aquosa contendo conídios de *O. heveae* até o ponto de escoamento (Figura 6). Ambos os tratamentos foram mantidos durante 12 h no escuro (Figura 7).



Figura 6. Pulverização nas folhas dos clones de *H. brasiliensis* com solução aquosa contendo conídios de *O. heveae*.



Figura 7. Plantas de *H. brasiliensis* deixadas no escuro por 12 horas após pulverização com *O. heveae*.

6.2 Coleta das amostras

No dia da inoculação e após 48, 96, 144 e 192 h, amostras das folhas foram coletadas, devidamente embaladas e identificadas. Parte das amostras foi congelada em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* a -80°C , para posterior determinação da atividade das enzimas antioxidantes, glutathione S-transferase, superóxido dismutase e peroxidase, e dos indicadores de estresse oxidativo, lipoperóxidos e pigmentos fotossintéticos; e outra parte colocada em saco de papel e posteriormente secadas em estufa de circulação forçada a 60°C e finalmente trituradas em almofariz para determinação de açúcares solúveis totais e redutores (Figura 8).



Figura 8. Esquema do preparo das amostras foliares de *H. brasiliensis*.

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 de suas massas frescas 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 1 h. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em 10000 *g* por 15 minutos. Após o resfriamento foi separado o sobrenadante e realizadas leituras de absorbância a 560 e 600 nm. O coeficiente de

absorbância do malondialdeído ($155 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi utilizado para os cálculos. O esquema da técnica encontra-se na Figura 9.



Figura 9. Esquema da técnica da determinação do conteúdo de lipoperóxidos.

6.3.1.2. Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e redutores

Para extração dos açúcares solúveis foi utilizado 100 mg de massa seca de folhas trituradas para cada amostra, as quais 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, o volume do extrato foi completado 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 e redutores foi realizada pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) e de Somogy-Nelson (1945), respectivamente. Foi utilizada a glicose para a construção da curva de referência, e os resultados foram expressos em percentagem de açúcares solúveis totais ou redutores na matéria seca. O esquema da técnica encontra-se na Figura 10.

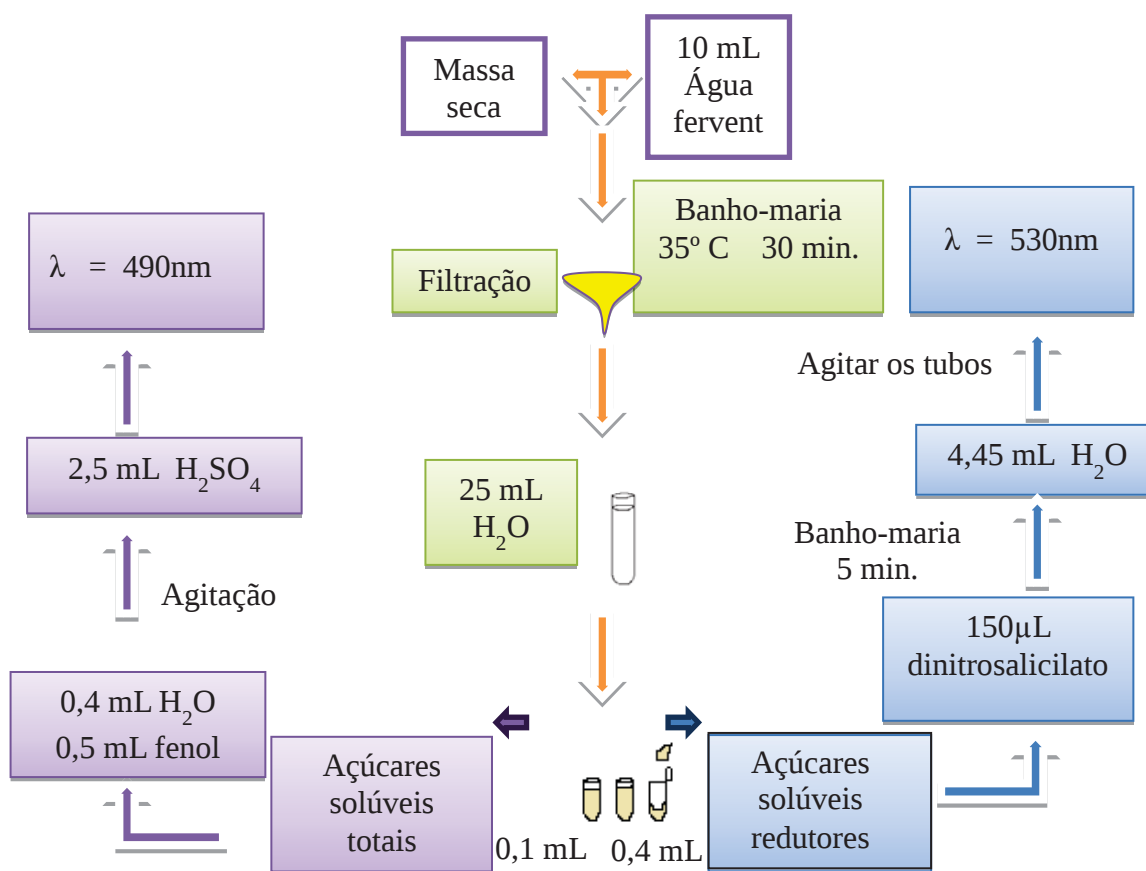


Figura 10. Esquema da técnica da determinação do conteúdo açúcares solúveis totais e redutores.

6.3.1.3 Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos das lâminas foliares com acetona 80%, como descrito no método de Arnon (1949). O extrato cetônico foi utilizado para as leituras de absorbância a 470, 647 e 663nm, conforme esquema da Figura 11. Os teores de clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenóides foram calculados através das fórmulas propostas por Lichtenthaler (1987). Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de massa fresca.

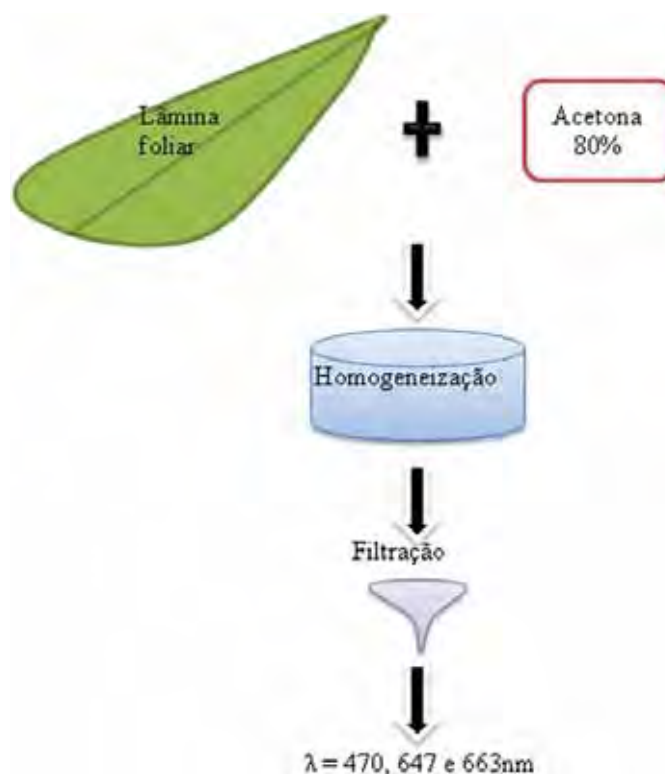


Figura 11. Esquema da técnica da determinação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos.

6.3.1.4 Peróxido de hidrogênio

Os teores de peróxido de hidrogênio foram determinados de acordo com Sergiev et al. (1997). 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 12.000g por 15 minutos e a 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de tampão fosfato de potássio 10 mmol.L⁻¹ pH 7,0 e 1 mL de KI. A absorvância do sobrenadante foi medida a 390 nm, conforme esquema ilustrado na Figura 12.

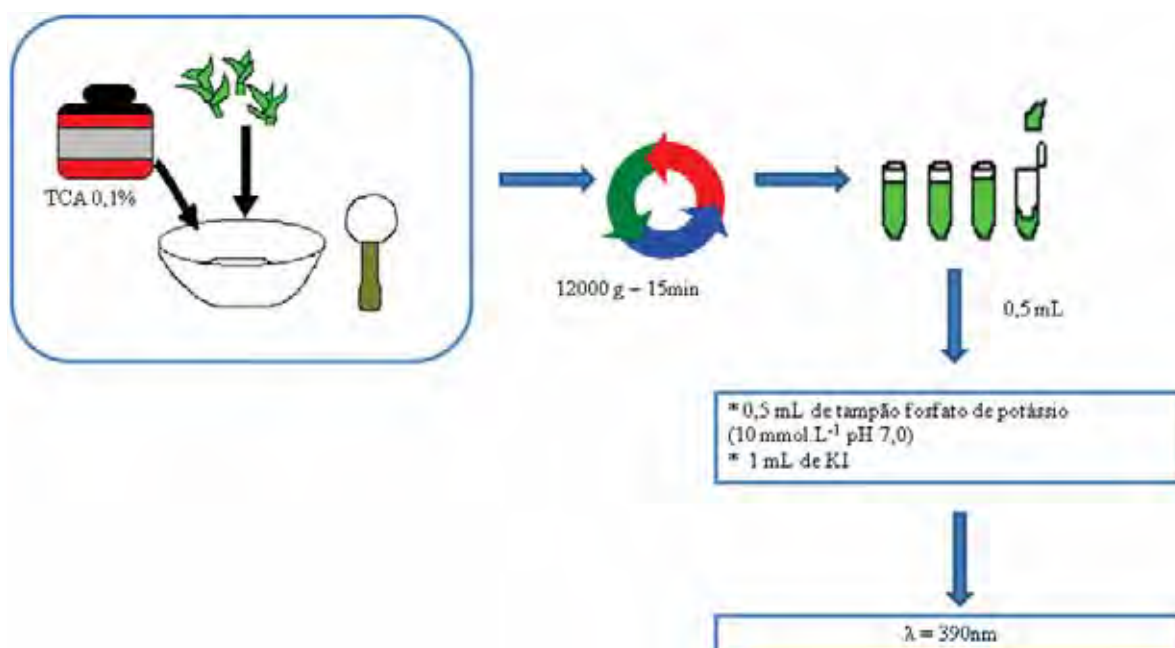


Figura 12. Esquema da técnica da determinação de peróxido de hidrogênio.

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 em almofariz gelado em 5 mL de tampão gelado TRIS-HCl 0,2 mol L⁻¹ pH 7,8 contendo 1 mmol.L⁻¹ de EDTA e 7,5% (peso volume⁻¹) de polivinilpolipirrolidona e uma pequena quantidade de areia lavada e esterilizada. Após centrifugação a 4⁰C (20 minutos em 14000 g), o sobrenadante foi coletado e armazenado em *freezer* a -20⁰C, para posterior determinação das atividades enzimáticas da glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e pirogalol peroxidase (PG-POD) (Figura 13).

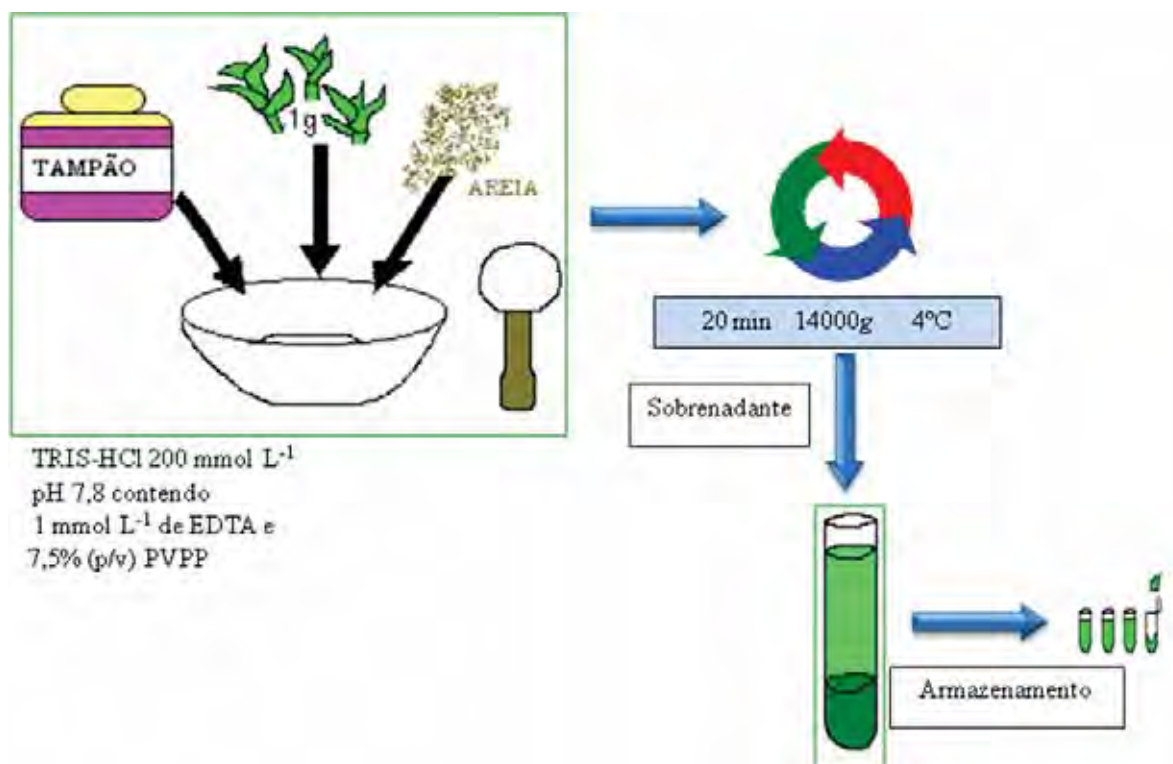


Figura 13. Esquema da técnica utilizada na obtenção dos extratos enzimáticos.

6.3.2.2 Determinação da atividade da glutathiona S-transferase

A atividade da GST foi determinada de acordo com as condições citadas no trabalho de Wu et al. (1996). A mistura de reação foi composta de extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ pH 6,9, glutathiona reduzida (GSH) 3,3 mmol L⁻¹ e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 30 mmol L⁻¹, num volume final de 3 mL e mantida a 25°C durante 30 minutos (Figura 14).

A mudança na absorbância devido à formação do conjugado GSH-CDNB foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm. O coeficiente de extinção molar 10 mmol L⁻¹ cm⁻¹ (MANNERVIK; GUTHENBERG, 1981) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em mmol L⁻¹ min⁻¹ mg de proteína⁻¹. A

quantidade de proteína solúvel do extrato enzimático foi estimado pelo método de Lowry et al. (1951).

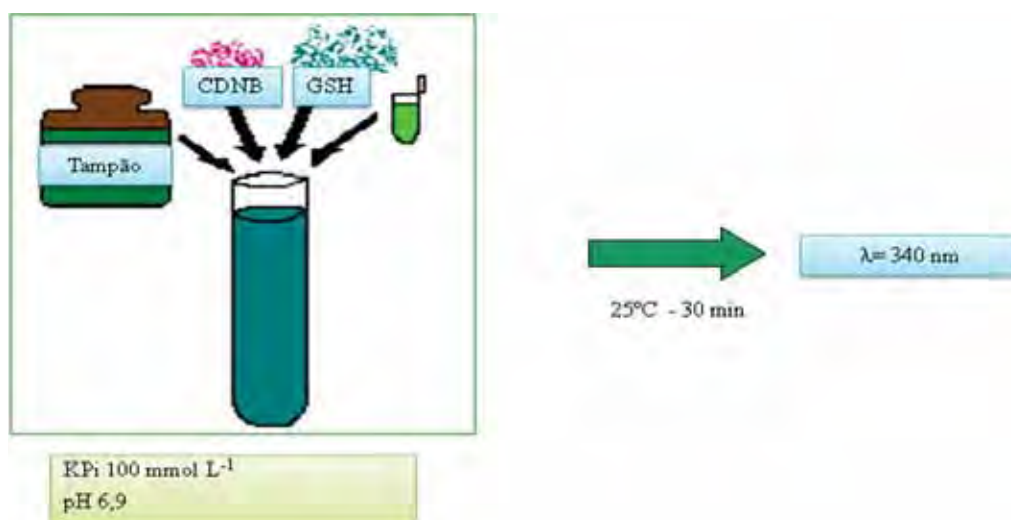


Figura 14. Esquema da técnica utilizada na determinação Glutathione S-transferase.

6.3.2.3 Determinação da atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Beauchamp; Fridovich (1971), tendo como base a capacidade da enzima em converter radicais superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (BOWLER et al., 1992).

Utilizou-se no sistema de reação tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 7,8 com adição de uma mistura de “nitroble tetrazolium” (NBT) $33 \mu\text{mol L}^{-1}$ mais EDTA $0,66 \text{ mmol L}^{-1}$ (5:4), mistura L-metionina 10 mmol L^{-1} e riboflavina $0,0033 \text{ mmol L}^{-1}$ (1:1) e extrato enzimático, totalizando um volume de 3 mL.

A mistura de reação foi mantida em condições ambientais e com iluminação por um período de 10 minutos, utilizando uma lâmpada fluorescente. A redução do tetrazólio foi determinada através de leituras de absorbância em espectrofotômetro a 560 nm.

O conteúdo de proteína solúvel do extrato enzimático foi estimado pelo método de Lowry et al (1951). Uma unidade enzimática (U) da atividade da SOD expressa em U mg de proteína⁻¹ foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% da inibição da razão de redução de NBT medida a 560 nm. O esquema da técnica encontra-se na Figura 15.



Figura 15. Esquema da técnica utilizada na determinação da atividade da superóxido dismutase.

6.3.2.4. Determinação da atividade da pirogalol peroxidase

A atividade da PG-POD foi determinada de acordo com o trabalho de Teisseire & Guy (2000). A mistura de reação foi composta de extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 50 mmol L^{-1} pH 6,5, pirogalol 20 mmol L^{-1} , e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 5 mmol L^{-1} , num volume final de 1 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 ($2,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi usado para calcular a atividade específica da

enzima, expressa em $\text{mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$. A quantidade de proteína solúvel do extrato enzimático foi estimado pelo método de Lowry et al. (1951). O esquema da técnica encontra-se na Figura 16.



Figura 16. Esquema da técnica utilizada na determinação da atividade da pirogalol peroxidase.

6.3.2.5. Determinação de proteínas solúveis nos extratos enzimáticos

Os teores de proteínas solúveis dos extratos enzimáticos, necessários para o cálculo da atividade específica da glutathione S-transferase, peroxidase e superóxido dismutase foram quantificados pelo método de Lowry et al. (1951). As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível a 660 nm, utilizando-se albumina sérica bovina como proteína de referência. O esquema da técnica encontra-se na Figura 17.



Figura 17. Esquema da técnica da determinação dos teores de proteínas.

6.4 Delineamento Experimental

Para cada combinação Clone x Tratamento, foi ajustado o modelo polinomial até grau 3 e escolheu-se a equação significativa de maior grau.

Foi realizada a análise de variância para cada coleta do experimento inteiramente casualizado com 6 tratamentos em esquema fatorial 3 x 2, 3 clones de seringueira (RRIM600, GT1 e PR255) e 2 tratamentos (plantas infectadas e sadias), em 5 períodos após tratamento – pulverização de conídios de *Oidium heveae* nas plantas infectadas (0, 48, 96, 144 e 192 h) e utilizados: 9 repetições para determinação de H₂O₂, 8 repetições para a determinação das enzimas antioxidantes, lipoperóxidos e pigmentos fotossintéticos e 4 repetições para açúcares solúveis totais e redutores. Foi feito o teste F e o teste de Tukey para comparação das médias. Utilizou-se o nível de significância $\alpha = 0,05$.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Literatura que relaciona alterações bioquímicas pela ação de patógenos em espécies florestais é muito escassa. Deste modo, neste trabalho discutiu-se a maioria dos resultados baseados em pesquisas realizadas com espécies agrícolas sob estas condições de estresses.

Situações de estresse biótico, como a patogênese em plantas está envolvido com a elevação da produção de EROs (MEHDY, 1994; BAKER; ORLANDI, 1995; RESENDE et al., 2003; APEL; HIRT, 2004). Nos últimos anos, tem-se dado especial atenção aos danos celulares causados pelo acúmulo de EROs sob condições de estresse (BLOKHINA et al., 2003). Como consequência do efeito destas, ocorre modificações protéicas (GARG; MANCHANDA, 2009), rompimento das cadeias de DNA, destruição de clorofila, peroxidação de lipídios das membranas, causando perda da seletividade e extravasamento de íons (MITTLER et al., 2004) entre outras alterações que podem levar à morte da planta (BAKER; ORLANDI, 1995; QUEIROZ et al, 2002; MITTLER et al., 2004; APEL; HIRT, 2004; AGRAWAL; RATHORE, 2007).

A formação de lipoperóxidos é um indicador de avaliação do nível de estresse oxidativo nas plantas (VERMA; DUBEY, 2003). Aumento dos teores de lipoperóxidos são relatados sob diferentes tipos de estresses abióticos, como encharcamento e senescência em tabaco (*Nicotiana tabacum*) (HURNG & KAO, 1994) e milho (*Zea mays*) (YAN et al., 1996), seca em aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr.) (QUEIROZ et al., 2002) e girassol (*Helianthus annuus*) (CECHIN et al., 2010), salinidade em *Beta vulgaris* L. e *Beta maritima* L. (BOR et al., 2003), radiação ultravioleta-B (MALANGA; PUNTARULO, 1994; CECHIN et al., 2008) e aplicação de herbicidas (FERREIRA, 2004; CATANEO et al., 2005; FERREIRA et al., 2010).

Estresse biótico causado por ataque de patógenos em plantas são também desencadeadores da produção de lipoperóxidos (STRID et al., 1994).

No presente trabalho, no que se refere aos teores de lipoperóxidos, foi observada interação significativa entre clones e infecção no período de 96 a 192 horas de infecção (Quadro 1). Embora tenha sido detectada diferença nos teores de lipoperóxidos entre os clones, de maneira geral, a infecção não causou alteração nos teores deste parâmetro (Quadro 2 e Figuras 18 e 19).

Deste modo, os resultados indicam que o *O. heveae* não causou produção de lipoperóxidos em *H. brasiliensis* até o período analisado. Possivelmente a produção de lipoperóxidos ocorra em períodos mais adiantados do progresso da doença.

Tabela 1. Análise fatorial (*) de lipoperóxidos, clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, carotenóides, açúcares solúveis totais e redutores e H₂O₂ em plantas de *H. brasiliensis*, clones RRIM600, GT1 e PR255, sadias ou inoculadas com conídios de *O. heveae*. Valores p = probabilidade de um valor > F

		Tempo (h)				
		0	48	96	144	192
Lipoperóxidos	Clone	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1061
	Tratamento	0,9687	0,6445	0,2791	0,0379	0,6906
	Clone x Tratamento	0,4260	0,2603	0,0070	0,0006	0,0005
Clorofila <i>a</i>	Clone	0,0733	0,6532	0,3000	0,1210	0,0665
	Tratamento	0,7328	0,0179	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Clone x Tratamento	0,8293	0,0335	0,0016	0,0336	0,0179
Clorofila <i>b</i>	Clone	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0048	0,5749
	Tratamento	0,0017	0,2344	0,9194	<0,0001	0,4080
	Clone x Tratamento	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,9926
Clorofila total	Clone	<0,0001	0,0397	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Tratamento	0,0026	0,0053	<0,0001	<0,0001	0,0004
	Clone x Tratamento	0,0419	0,0137	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Carotenóides	Clone	0,5937	0,1341	0,0293	0,0016	<0,0001
	Tratamento	<0,0001	0,0048	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Clone x Tratamento	<0,0001	<0,0001	0,0072	0,0002	0,0012
Açúcares solúveis totais	Clone	0,0007	0,0003	0,0060	0,0017	0,1343
	Tratamento	0,1872	0,0195	0,2860	0,1651	0,5652
	Clone x Tratamento	0,1722	0,1971	0,9152	0,6812	0,2959
Açúcares solúveis redutores	Clone	<0,0001	0,0701	0,7734	0,0683	0,0010
	Tratamento	0,0497	0,6851	<0,0001	0,8694	0,0902
	Clone x Tratamento	0,0568	0,0597	0,0184	0,0114	0,0008
H ₂ O ₂	Clone	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,6568	0,0004
	Tratamento	0,4999	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0361
	Clone x Tratamento	0,0005	0,0015	<0,0001	0,4106	<0,0001

(*)Valores significativos a $\alpha = 5\%$ destacados pela cor azul.

Tabela 2. Comparação das médias (*) dos teores de lipoperóxidos de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Tempo (h)	Clone	Sadias	Inoculadas	Média
0	RRIM600	0,045	0,041	0,043 a
	GT1	0,026	0,030	0,031 b
	PR255	0,030	0,031	0,028 b
	Média	0,034 A	0,034 A	
48	RRIM600	0,039	0,047	0,043 a
	GT1	0,029	0,025	0,027 b
	PR255	0,026	0,026	0,026 b
	Média	0,031 A	0,033 A	
96	RRIM600	0,047 Aa	0,037 Ba	0,042
	GT1	0,028 Ab	0,031 Aa	0,030
	PR255	0,021 Ab	0,022 Ab	0,021
	Média	0,032	0,030	
144	RRIM600	0,061 Aa	0,050 Aa	0,055
	GT1	0,031 Ab	0,018 Bc	0,025
	PR255	0,025 Ab	0,034 Ab	0,029
	Média	0,039	0,034	
192	RRIM600	0,053 Aa	0,032 Ba	0,042
	GT1	0,037Aab	0,045 Aa	0,042
	PR255	0,026 Ab	0,041 Aa	0,033
	Média	0,038	0,040	

(*) Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

CV = 31,65%

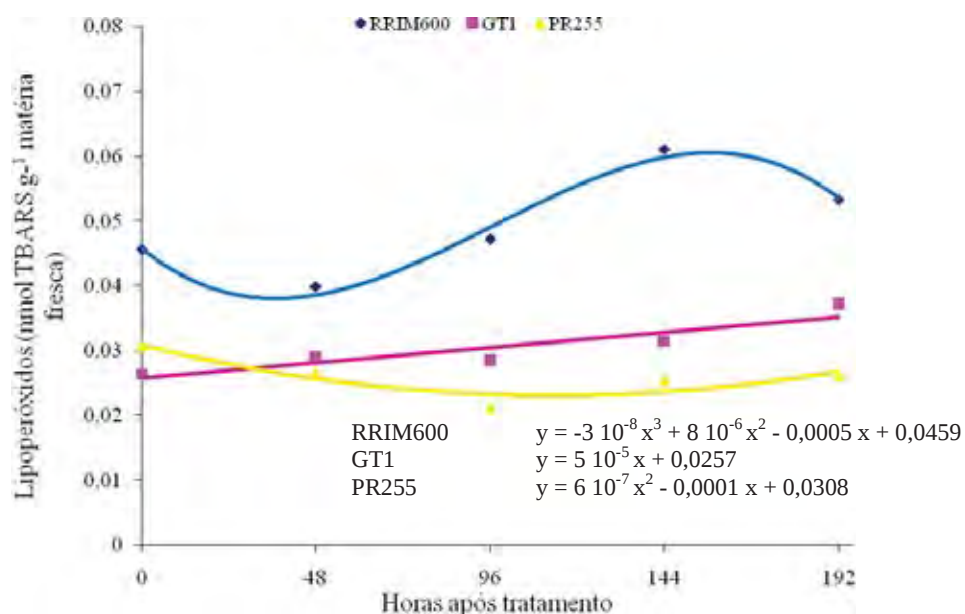


Figura 18. Teores de lipoperóxidos em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

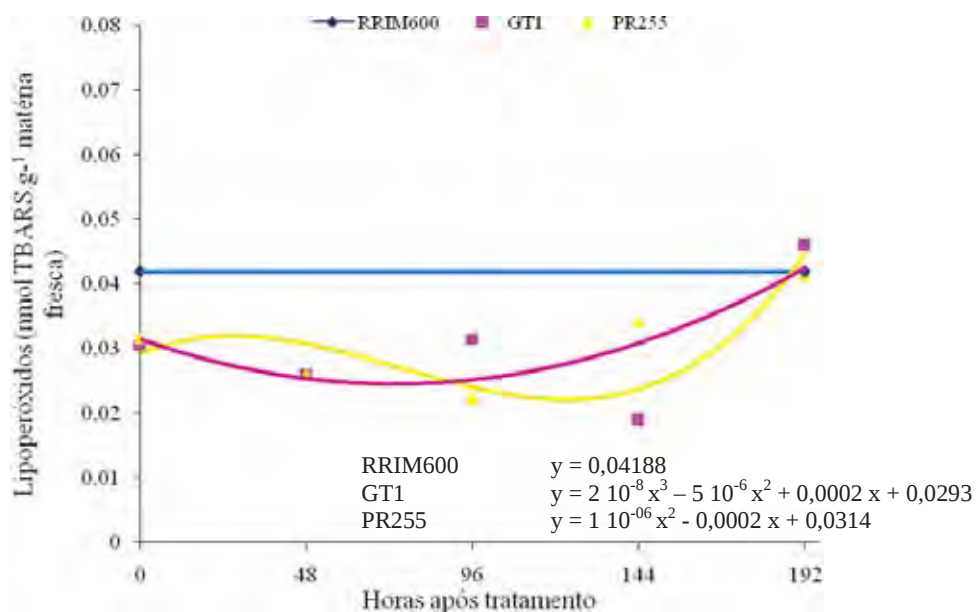


Figura 19. Teores de lipoperóxidos em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

Pigmentos como clorofilas e carotenóides são importantes no processo fotossintético das plantas, participando dos processos de absorção de energia luminosa para posterior transformação da energia em ATP e poder redutor, os quais serão usados na produção de fotoassimilados (MALKIN; NIYOGI, 2000).

Células fotossintéticas estão constantemente expostas ao estresse oxidativo, resultante do acúmulo de EROs durante vários processos metabólicos básicos (FOYER et al., 1997). A geração de EROs pode causar além da peroxidação de lipídios, degradação de pigmentos fotossintéticos, dentre estes, as clorofilas (COGHLAN; WALTERNS, 1992; SABRI et al., 1997; SADRAS et al., 2000; EL OMARI et al., 2001; STADINIK; RIVERA, 2001; AKHKHA et al., 2000; PSHIBYTKO et al., 2006) e os carotenóides (KIM et al., 2004).

No presente estudo houve detectada interação significativa, quanto aos teores de clorofila total entre clones de seringueira e infecção por oídio, bem como para os fatores isolados (Tabela 1).

Nas plantas de seringueira do clone RRIM600, o oídio causou diminuição de clorofila total a partir das 96 horas de infecção. No clone GT1 foi observada diminuição de clorofila total as 96 e 144 h e no clone PR255 as 0, 48 e 192 h de infecção (Tabela 3 e Figuras 20 e 21). Resposta diferencial dos clones ao longo do tratamento foi observada nos teores de clorofila total. No período de 192 h, maior degradação foi observado no clone PR255, seguido do clone RRIM600; já o clone GT1 caracterizou por produzir maiores teores deste pigmento comparado aos demais clones.

Tabela 3. Comparação das médias (*) dos teores de clorofila total de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Tempo (h)	Clone	Sadias	Inoculadas	Média
0	RRIM600	1241,581 Ab	1063,505 Ab	1473,930
	GT1	1322,615 Ab	1340,340 Aa	1331,480
	PR255	1584,208 Aa	1363,713 Ba	1152,540
	Média	1382,800	1255,850	
48	RRIM600	1064,668 Ab	1076,220 Aa	1070,410
	GT1	1135,888 Aab	1082,277 Aa	1109,080
	PR255	1224,476 Aa	1064,575 Ba	1144,530
	Média	1141,680	1074,360	
96	RRIM600	1154,392 Ab	980,183 Bb	1067,290
	GT1	1440,705 Aa	1075,257 Bab	1257,980
	PR255	1009,527 Ac	1116,254 Aa	1062,890
	Média	1201,540	1057,230	
144	RRIM600	1171,435 Ab	847,432 Ba	1009,430
	GT1	1485,705 Aa	907,308 Ba	1196,510
	PR255	1025,968 Ac	968,412 Aa	997,190
	Média	1227,700	907,720	
192	RRIM600	1171,435 Aa	866,964 Bb	1019,200
	GT1	949,762 Ab	1101,361 Aa	1025,560
	PR255	964,075 Ab	722,605 Bb	843,340
	Média	1028,420	896,980	

(*) Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Cv = 17,58%

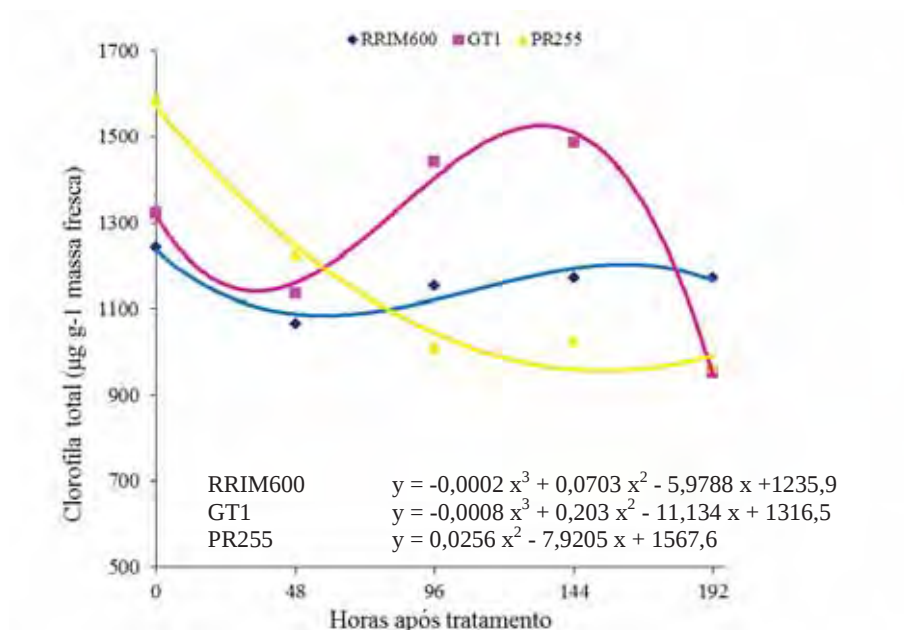


Figura 20. Teor de Clorofila total em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

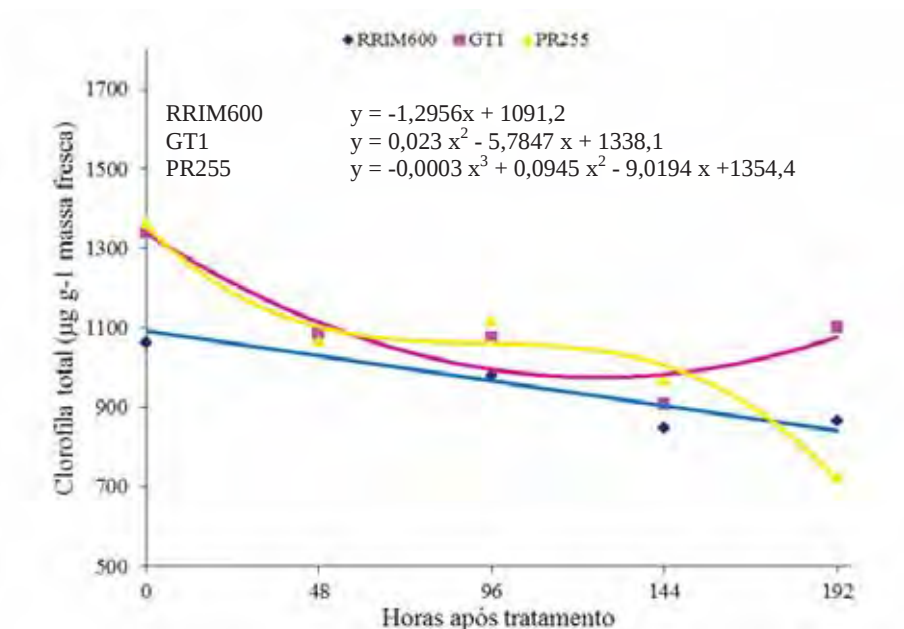


Figura 21. Teor de Clorofila total em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

Na Tabela 1 pode ser observada interação significativa entre clones de seringueira e infecção nos períodos de 48 a 192 h para teores de clorofila *a* (Tabela 4 e Figuras 22 e 23) e nos períodos de 0 a 144 h para teores de clorofila *b* (Tabela 5 e Figuras 24 e 25). Foi observada diferença significativa entre os clones apenas para o teor de clorofila *b*.

Tabela 4. Comparação das médias (*) dos teores de clorofila *a* de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Tempo (h)	Clone	Sadias	Inoculadas	Média
0	RRIM600	820,324	817,418	818,870 a
	GT1	846,188	826,454	836,320 a
	PR255	864,569	869,759	818,870 a
	Média	843,690 A	837,880 A	
48	RRIM600	803,597 Aa	763,153 Aa	800,580
	GT1	793,793 Aa	807,374 Aa	783,380
	PR255	834,870 Aa	731,343 Ba	783,110
	Média	810,750	767,290	
96	RRIM600	821,607 Aa	678,416 Ba	750,010
	GT1	838,237 Aa	710,682 Aa	774,460
	PR255	773,134 Aa	743,404 Aa	758,270
	Média	810,990	710,830	
144	RRIM600	812,490 Aab	620,001 Ba	716,250
	GT1	887,622 Aa	642,779 Ba	765,230
	PR255	797,383 Ab	678,301 Ba	737,840
	Média	832,520	647,030	
192	RRIM600	825,912 Aa	595,159 Ba	710,540
	GT1	774,207 Aa	637,590 Ba	705,900
	PR255	798,970 Aa	510,638 Ba	654,800
	Média	799,700	581,130	

(*) Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Cv = 12,03%

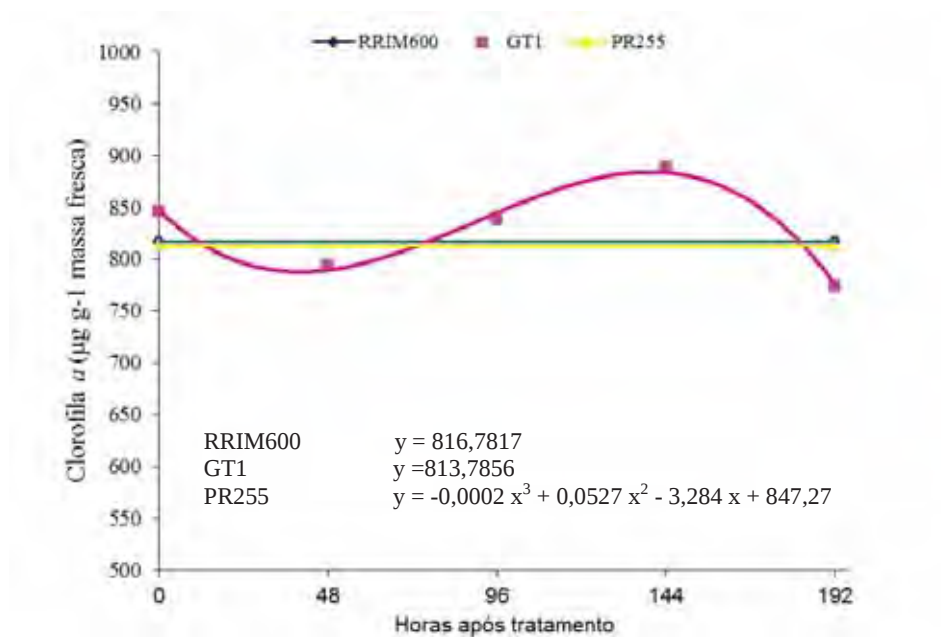


Figura 22 Teores de Clorofila *a* em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

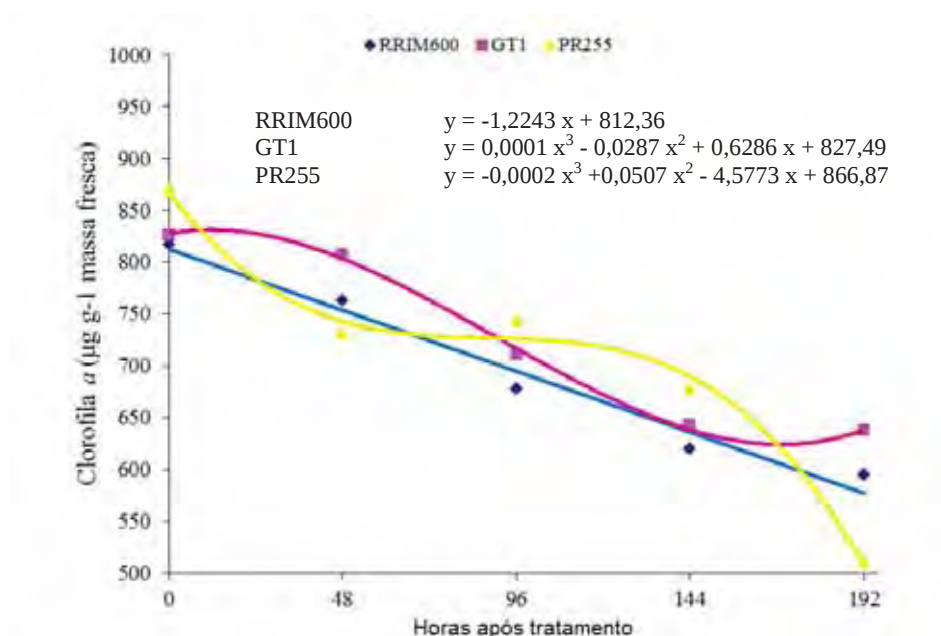


Figura 23. Teores de Clorofila *a* em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

Tabela 5. Comparação das médias (*) dos teores de clorofila *b* de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Tempo (h)	Clone	Sadias	Inoculadas	Média
0	RRIM600	333,032 Ab	310,513 Ab	321,770
	GT1	383,008 Ab	409,673 Aa	396,340
	PR255	493,101 Aa	356,149 Bab	424,620
	Média	403,050	358,780	
48	RRIM600	293,792 Ab	332,302 Ab	313,048
	GT1	365,609 Aa	319,365 Ab	342,487
	PR255	388,182 Aa	424,936 Aa	406,560
	Média	349,195	358,868	
96	RRIM600	295,243 Ab	295,427 Ab	295,340
	GT1	426,545 Aa	338,575 Bab	382,560
	PR255	301,170 Bb	385,635 Aa	343,400
	Média	340,990	339,880	
144	RRIM600	332,834 Ab	251,923 Ba	292,380
	GT1	402,249 Aa	267,897 Ba	335,070
	PR255	315,364 Ab	296,477 Aa	305,920
	Média	350,150	272,100	
192	RRIM600	287,762	271,974	279,870 a
	GT1	277,502	256,191	294,250 a
	PR255	302,193	286,307	266,850 a
	Média	289,150 A	271,490 A	

(*) Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Cv = 20,19%

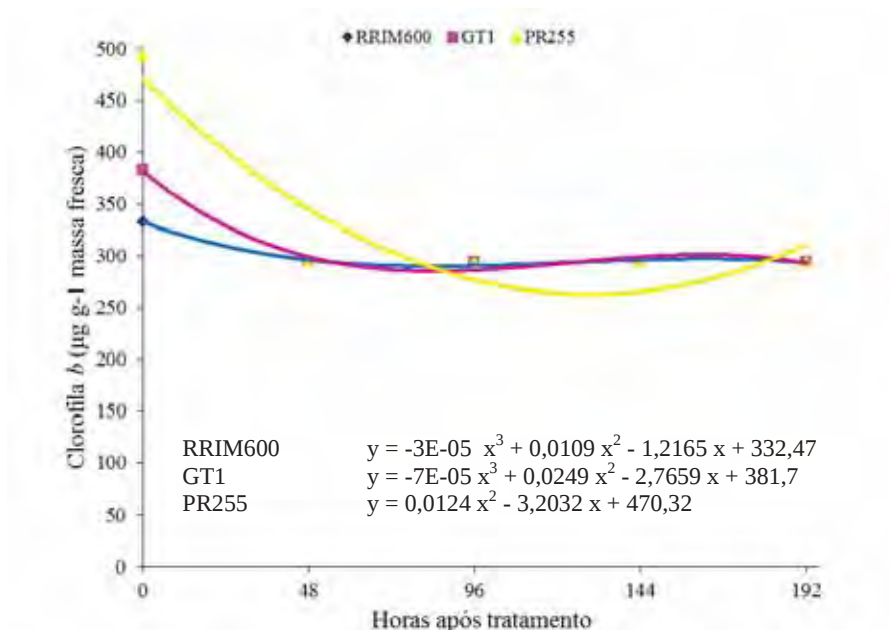


Figura 24. Teores de Clorofila *b* em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

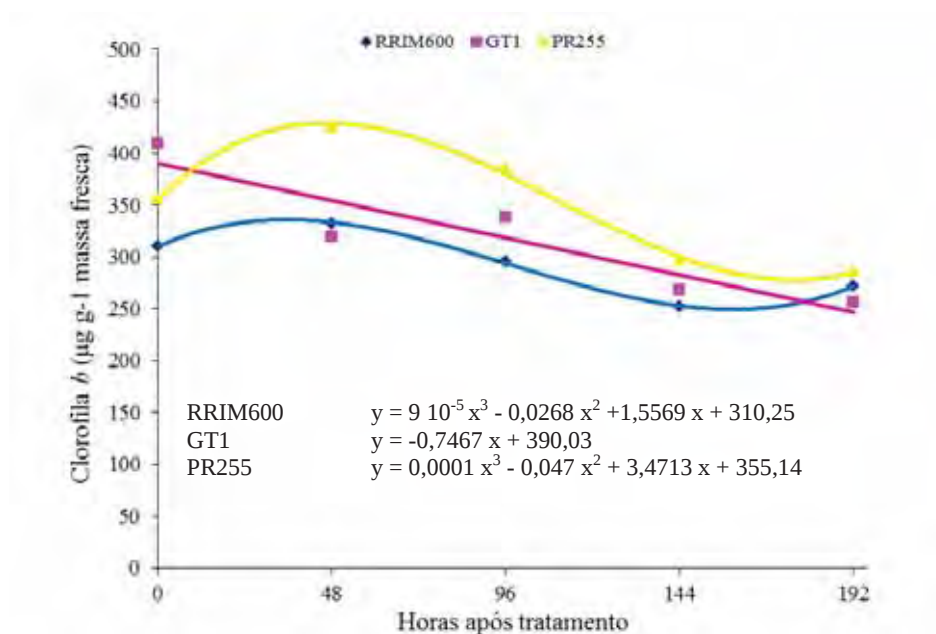


Figura 25. Teores de Clorofila *b* em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

Diante dos resultados pode-se afirmar que o oídio causa degradação de clorofila total em seringueira. Comparando os resultados de clorofila *a* e clorofila *b*, pode ser evidenciado que a infecção por *O. heveae* teve maior efeito sobre a degradação da primeira, principalmente entre 144 e 192 h.

Os resultados são concordantes com diversos trabalhos relacionando degradação de clorofila, como efeito da interação planta-patógeno. Diminuição no conteúdo de clorofila foi observada em plantas de feijão infectadas por *Erysiphe graminis* (COGHLAN; WALTERNS, 1992) e por *Blumeria graminis* (AKHKHA et al., 2000), em plantas de aveia infectadas por *Erysiphe 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; STADINIK; RIVERA, 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. De acordo com Tang et al., (1996) a redução da taxa fotossintética pode estar relacionada à diminuição do conteúdo de clorofila e/ou da ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), mas não apresenta efeito na condutância estomática.

Na Tabela 1 observa-se que para os teores de carotenóides ocorreu interação significativa entre clones de seringueira e infecção por *O. heveae* em todos os períodos analisados. Na Tabela 6 e nas Figuras 26 e 27 que ocorreu redução dos teores de carotenóides em plantas de seringueira do clone RRIM600, como efeito da infecção, em todos os períodos analisados. No clone de seringueira GT1 a diminuição de carotenóides foi verificada as 96 e 144 h e no clone PR255 as 48, 96 e 192 h de infecção.

Apesar de não ter sido encontrado na literatura trabalhos relacionados à ação de patógenos em plantas sobre os teores de carotenóides, é de conhecimento que os carotenóides são metabólitos que protegem as plantas dos efeitos citotóxicos das EROs (MITTLER, 2006), sendo que a redução destes pigmentos pode acarretar estresse oxidativo, em virtude da degradação oxidativa das clorofilas e da rápida destruição das membranas dos tilacóides pelo excesso de EROs geradas (HESS, 2000; KIM et al., 2004).

Pode-se observar que no presente trabalho, a infecção por *O. heveae* causou degradação de carotenóides em plantas de *H. brasiliensis*, principalmente no clone RRIM600.

Tabela 6. Comparação das médias dos teores de carotenóides de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Horas (h)	Clone	Sadias	Inoculadas	Média
0	RRIM600	371,040 Aa	264,534 Bb	317,787
	GT1	323,429 Ab	296,061 Aa	309,745
	PR255	323,662 Ab	301,102 Aa	312,384
	Média	339,377	287,234	
48	RRIM600	318,194 Aa	274,340 Ba	296,267
	GT1	278,039 Ab	307,297 Aa	292,669
	PR255	337,804 Aa	283,911 Ba	310,858
	Média	311,346	288,517	
96	RRIM600	323,479 Aa	237,875 Bb	280,680
	GT1	308,199Aa	300,503 Ba	304,350
	PR255	304,338Aa	239,630 Bb	271,980
	Média	312,066	259,337	
144	RRIM600	348,387 Aa	234,028 Ba	291,210
	GT1	278,914 Ab	227,595 Ba	253,260
	PR255	261,978 Ab	246,727 Aa	254,350
	Média	296,427	236,117	
192	RRIM600	299,283 Aa	222,029 Bb	260,660
	GT1	282,178 Aab	269,833 Aa	276,010
	PR255	247,087 Ab	150,693 Bc	198,890
	Média	276,183	214,185	

* Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Cv = 15,17%

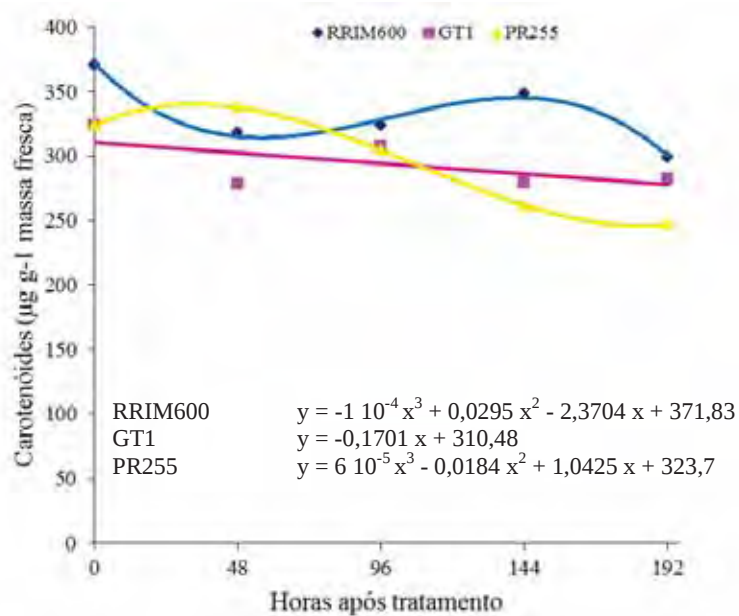


Figura 26. Teores de carotenóides em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

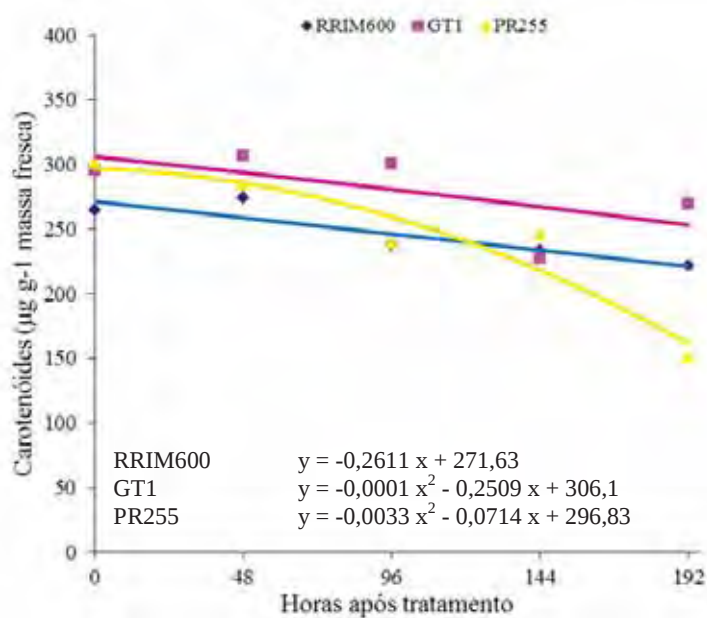


Figura 27. Teores de carotenóides em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

Em vegetais sob estresse ocasionado por patógenos ocorrem alterações nos processos fisiológicos da respiração, decorrentes de maior demanda de energia direcionada para a síntese de compostos envolvidos na resistência das plantas (STADINIK; RIVERA, 2001), a fim de regenerar e proteger os tecidos que sofreram injúria pelo patógeno (LEITE; PASCHOLATI, 1995). Portanto, os patógenos, além de provocarem alterações no conteúdo de pigmentos fotossintéticos, também podem alterar as concentrações de açúcares solúveis totais e redutores (LEITE; PASCHOLATI, 1995; SARRIA, 2010).

Neste trabalho, de acordo com os resultados de açúcares solúveis totais e redutores apresentados no Tabela 1, pode ser verificado que não ocorreu interação significativa entre clones de seringueira e infecção para o primeiro, já o segundo apresentou interação entre clones e tratamento nos períodos de 96 a 192 h. A infecção causou aumento dos teores de açúcares solúveis redutores somente no clone RRIM600 no período de 96 h (Tabelas 7 e 8 e Figuras 28 a 31).

No que diz respeito a estresse biótico pela interação planta-patógeno foi relatado que plantas de tangerina (*Citrumelo swingle*) infectadas com os patógenos *Phytophthora nicotianae* e *Phytophthora citrophthor* apresentaram incremento significativo na concentração de açúcares redutores (SARRIA, 2010).

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. As plantas infectadas aumentam irreversivelmente a atividade da invertase, provavelmente em função das alterações na relação fonte-dreno, entre os órgãos infectados e sadios. Assim, a síntese de sacarose é diminuída e os açúcares solúveis redutores se acumulam em folhas de trigo infectadas (SCHOLLES et al., 1994; WRIGHT et al., 1995).

Analisando os resultados, pode-se considerar que de maneira geral, a infecção por *O. heveae* não acarretou em alterações nos teores de açúcares solúveis totais e redutores em plantas de *H. brasiliensis*. Pode ser que até o período de infecção analisado, 196

horas, não tenha sido suficiente para detectar tal alteração neste parâmetro relacionado ao estresse oxidativo.

Tabela 7. Comparação das médias (*) de açúcares solúveis totais de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Tempo (h)	Clone	Sadias	Inoculadas	Média
0	RRIM600	9,435	9,329	9,382 a
	GT1	8,105	8,218	8,161 b
	PR255	8,163	6,797	7,480 b
	Média	8,568 A	8,114 A	
48	RRIM600	9,079	9,223	9,151 a
	GT1	7,249	9,010	8,130 a
	PR255	6,521	7,323	6,922 b
	Média	7,616 B	8,519 A	
96	RRIM600	9,174	9,463	9,318 a
	GT1	8,061	8,453	8,257 b
	PR255	8,390	8,527	8,458 b
	Média	8,541 A	8,814 A	
144	RRIM600	9,135	9,717	9,426 a
	GT1	8,175	8,416	8,295 b
	PR255	8,604	8,730	8,667 b
	Média	8,638 A	8,954 A	
192	RRIM600	9,252	8,849	9,050 a
	GT1	8,181	8,305	8,243 a
	PR255	8,308	9,138	8,723 a
	Média	8,580 A	8,764 A	

(*) Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

CV = 9,88%

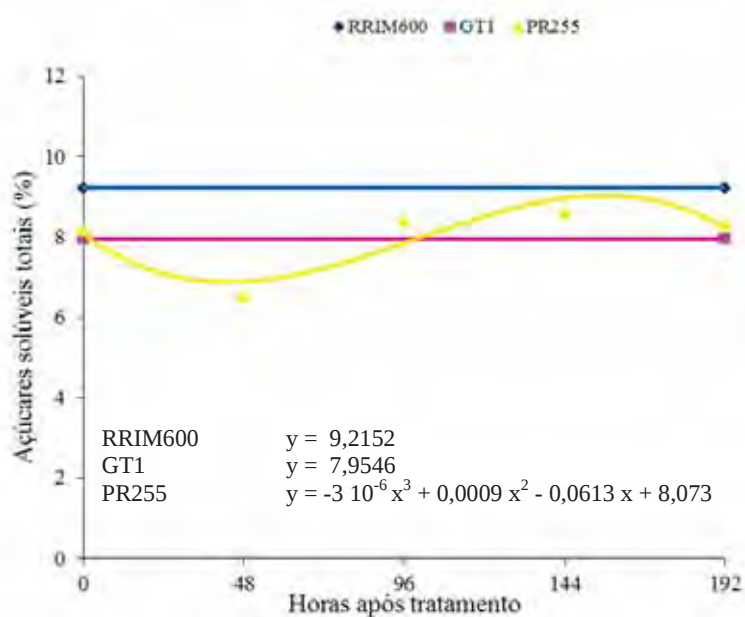


Figura 28. Teores de açúcares solúveis totais em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

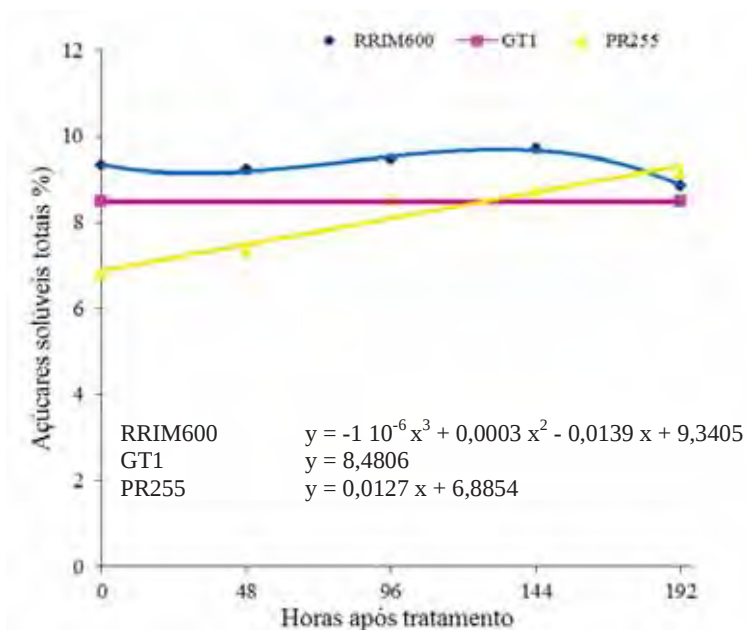


Figura 29. Teores de açúcares solúveis totais em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

Tabela 8. Comparação das médias (*) de açúcares solúveis redutores de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Horas (h)	Clone	Sadias	Inoculadas	Média
0	RRIM600	7,720	8,309	8,014 a
	GT1	5,800	7,399	6,600 b
	PR255	5,731	5,429	5,580 c
	Média	6,417 B	7,046 A	
48	RRIM600	8,273	6,414	7,345 a
	GT1	5,039	6,123	5,581 a
	PR255	5,746	7,235	6,490 a
	Média	6,353 A	6,542 A	
96	RRIM600	5,630 Ba	8,894 Aa	7,262
	GT1	7,031 Aa	7,849 Aa	7,440
	PR255	6,388 Aa	7,927 Aa	7,157
	Média	6,350	8,223	
144	RRIM600	8,320 Aa	7,037 Aa	7,678
	GT1	6,673 Aa	6,071 Aa	6,372
	PR255	6,088 Aa	8,187 Aa	7,138
	Média	7,027	7,098	
192	RRIM600	8,436 Aa	8,398 Aa	8,417
	GT1	6,909 Aa	5,909 Ab	7,581
	PR255	6,092 Aa	9,070 Aa	6,409
	Média	7,146	7,792	

(*) Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

CV = 18,22%

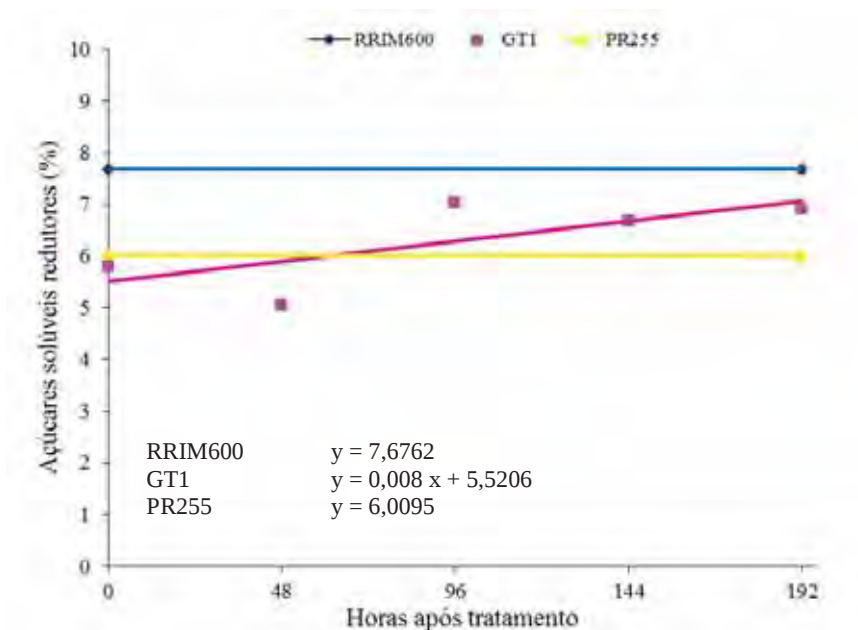


Figura 30. Teores de açúcares solúveis redutores em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

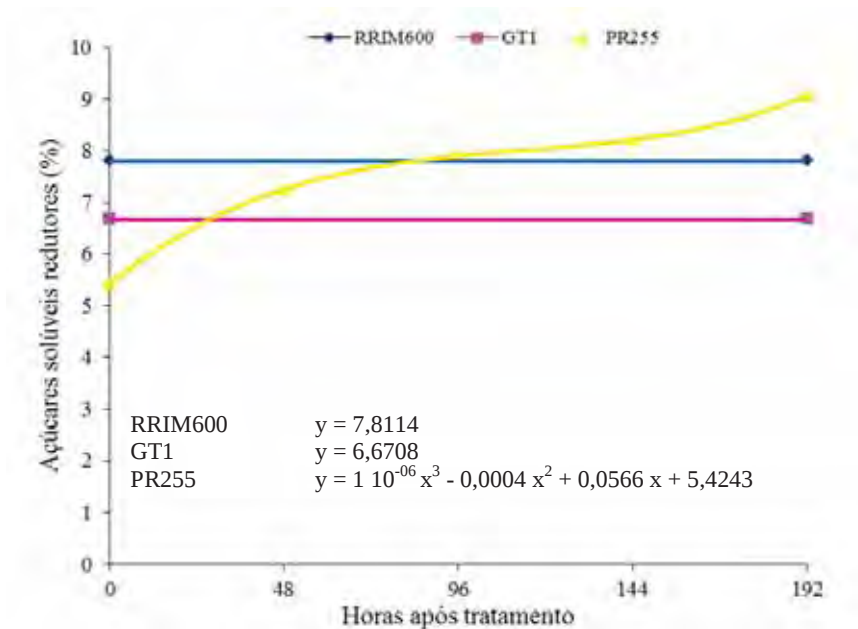


Figura 31. Teores de açúcares solúveis redutores em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

A grande produção de peróxido de hidrogênio, juntamente com outros tipos de EROs, como o ânion superóxido e radical hidroxila, que caracteriza a explosão oxidativa é um dos primeiros eventos que ocorrem nas plantas sob condições de estresse (DIONISIO-SESE; TOBITA, 1998). 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 do mesmo estresse ou de um outro diferente (NEILL et al., 2002).

Em interações planta-patógeno como mecanismo de defesa à penetração na parede celular por vários fungos ocorre a produção de peróxido de hidrogênio (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 e fortalecer a parede celular. 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).

A partir da determinação de H_2O_2 , foi estudada nesta pesquisa a função desta ERO em *H. brasiliensis* em resposta à infecção por *O. heveae*. Na Tabela 1 pode-se observar que para H_2O_2 houve interação significativa entre clones de seringueira e infecção às 0, 48, 96 e 192 h após inoculação. Foi observado alteração significativa na produção deste indicador de estresse oxidativo a partir das 48 h.

A Tabela 9 e as Figuras 32 e 33 apresentam dados que mostram a diminuição dos teores de H_2O_2 em plantas de seringueira do clone GT1 a partir das 96 e 144 h de infecção, do clone RRIM600 às 48, 96 e 144 h e do clone PR255 às 144h.

De acordo com a literatura, a produção de H_2O_2 pode desempenhar importante papel a uma variedade de estresses bióticos e abióticos (MITKA et al., 2004).

Estímulos ambientais como estresse hídrico (YANG; POOVAICH, 2002), radiação ultravioleta e ataque de patógenos pode induzir mudanças nos níveis de H_2O_2 e levar a uma diversidade de respostas fisiológicas em plantas (YANG; POOVAICH, 2002).

Chen et al. (2008) relataram maior acúmulo de H_2O_2 na cultivar de soja Nannong 493 – 1 comparada a cultivar Hefeng, após inoculação de *Phytophthora sojae*. Maior acúmulo de H_2O_2 foi observado em feijão 24 horas após a inoculação com *Bipolaris sorokiniana* e sua acumulação permaneceu semanas em torno dos locais da infecção (PLAZEK et al., 2009).

Embora, a maioria destas pesquisas relata aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio, como função de situações estressantes, os resultados indicam que em plantas de seringueira sob ação de oídio ocorreu diminuição dos teores desta ERO e esta resposta foi diferente entre os clones, sendo portanto, discordantes da literatura citada.

Tabela 9. Comparação das médias (*) de peróxido de hidrogênio de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Horas (h)	Clone	Sadias	Inoculadas	Média
0	RRIM600	57,663 Ba	74,862 Aa	66,263
	GT1	43,388 Aa	32,022 Ab	41,734
	PR255	48,028 Aa	35,440 Ab	37,705
	Média	49,693	47,442	
48	RRIM600	59,430 Aa	29,261 Ba	44,346
	GT1	39,568 Ab	32,358 Aa	35,964
	PR255	35,593 Ab	23,796 Aa	29,695
	Média	44,684	28,472	
96	RRIM600	52,559 Aa	20,113 Ba	36,336
	GT1	49,421 Aa	31,471 Ba	40,446
	PR255	20,223 Ab	24,398 Aa	22,311
	Média	40,730	25,328	
144	RRIM600	39,657	25,295	32,476 a
	GT1	36,395	24,475	30,435 a
	PR255	39,742	20,022	29,883 a
	Média	38,598 A	23,264 B	
192	RRIM600	37,816 Aab	40,444 Aa	39,130
	GT1	40,252 Aa	17,671 Ab	28,962
	PR255	28,458 Ab	35,442 Aab	31,951
	Média	35,509	31,186	

(*) Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

CV = 41,26%

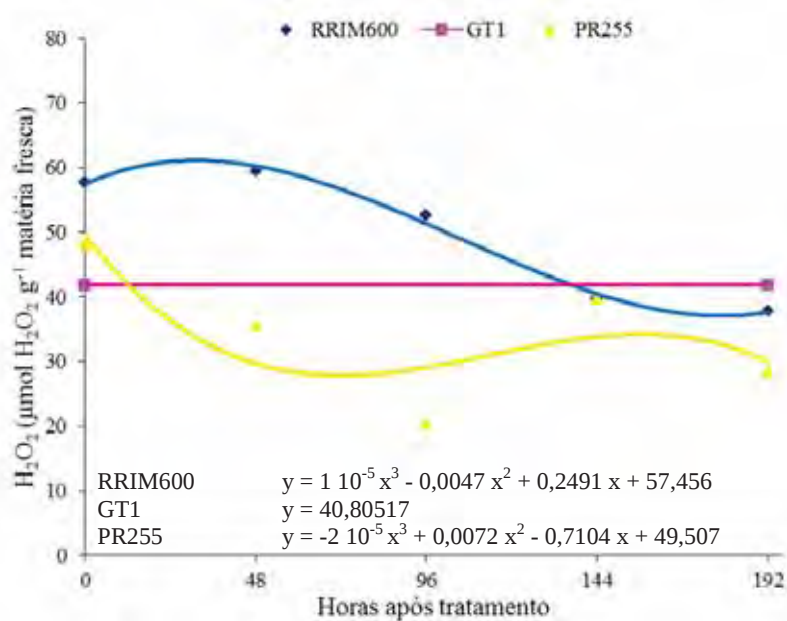


Figura 32. Teores de peróxido de hidrogênio em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

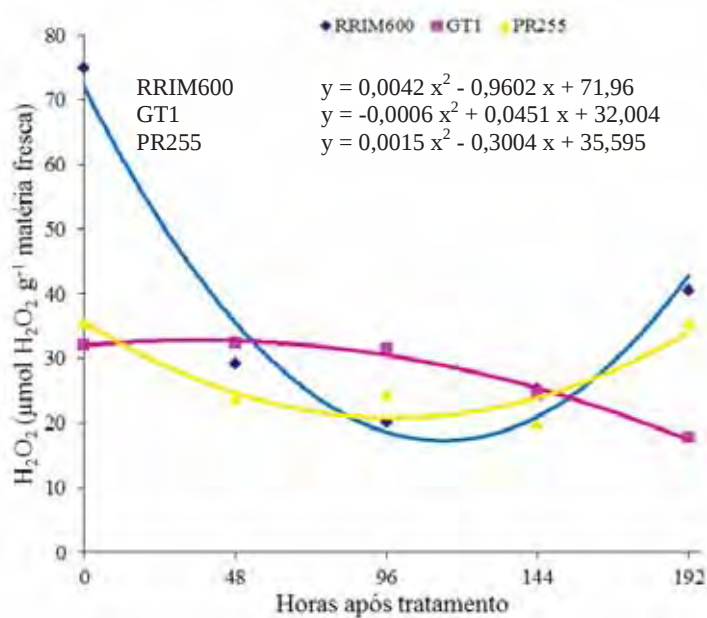


Figura 33. Teores de peróxido de hidrogênio em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

De acordo com a literatura consultada existe uma relação positiva entre atividade de enzimas antioxidantes com a resistência de plantas a patógenos.

Segundo Allen et al. (1997) a hipótese de que enzimas antioxidantes são críticas na prevenção do estresse oxidativo em plantas é baseado em varias linhas de evidências. A atividade de uma ou mais enzimas é geralmente incrementada em plantas expostas a condições adversas, 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 Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione S-Transferase (GST) e Peroxidase (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)

Através da análise estatística apresentada na Tabela 10 foi detectada interação significativa entre clones e infecção, com respeito às atividades das enzimas antioxidantes, principalmente no período entre 96 e 144 horas de infecção. Pode ser verificado que os três clones de seringueira apresentaram diferenças significativas na atividade das enzimas antioxidantes analisadas.

Tabela 10. Análise fatorial (*) de GST, SOD e POD em plantas de *H. brasiliensis*, clones RRIM600, GT1 e PR255, sadias ou inoculadas com *O. heveae*. Valores p = probabilidade de um valor > F

		Tempo (h)				
		0	48	96	144	192
GST	Clone	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Tratamento	0,3603	0,1612	0,0306	<0,0001	0,0007
	Clone x Tratamento	0,2593	0,3382	0,0210	<0,0001	0,0006
SOD	Clone	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Tratamento	0,2134	0,2407	<0,0001	0,0012	<0,0001
	Clone x Tratamento	0,1291	0,4011	0,0005	0,0263	<0,0001
POD	Clone	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Tratamento	0,7172	<0,0001	<0,0001	0,0299	0,0993
	Clone x Tratamento	0,5604	<0,0001	<0,0001	0,0154	0,1052

(*)Valores significativos a $\alpha = 5\%$ destacados pela cor azul.

As maiores atividades da GST, SOD e POD (Tabelas 11 a 13 e Figuras 34 a 39) foram detectadas no clone RRIM600, tanto nas plantas sadias quanto nas inoculadas por *O. heveae*, comparado aos demais clones. Neste clone também foi observado elevação na ativação enzimática destas enzimas nas plantas infectadas. Nos outros clones as respostas podem ocorrer tardiamente.

Em comparação ao clone de seringueira RRIM600, os resultados do presente trabalho são concordantes com os relatos de Greenberg et al. (1997), que descreveram ativação da GST em plantas como resposta da reação de hipersensibilidade sob ataque de patógenos.

Em trigo infectado por *Puccinia recondita* houve inibição da atividade da GST e catalase na cultivar susceptível e aumento na resistente (IVANOV et al., 2005).

Tabela 11. Comparação das médias (*) da atividade da GST de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Horas (h)	Clone	Sadias	Infectadas	Média
0	RRIM600	0,123	0,132	0,127 a
	GT1	0,015	0,013	0,014 b
	PR255	0,012	0,012	0,012 b
	Média	0,050 A	0,052 A	
48	RRIM600	0,113	0,128	0,120 a
	GT1	0,012	0,011	0,012 b
	PR255	0,011	0,016	0,013 b
	Média	0,045 A	0,052 A	
96	RRIM600	0,119 Ba	0,150 Aa	0,135
	GT1	0,014 Ab	0,013 Ab	0,013
	PR255	0,013 Ab	0,015 Ab	0,014
	Média	0,048	0,059	
144	RRIM600	0,113 Ba	0,146 Aa	0,130
	GT1	0,013 Ab	0,012 Ab	0,013
	PR255	0,010 Ab	0,013 Ab	0,012
	Média	0,045	0,057	
192	RRIM600	0,108 Aa	0,158 Ba	0,133
	GT1	0,012 Ab	0,016 Ab	0,014
	PR255	0,008 Ab	0,012 Ab	0,010
	Média	0,043	0,062	

(*) Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

CV = 28,14%

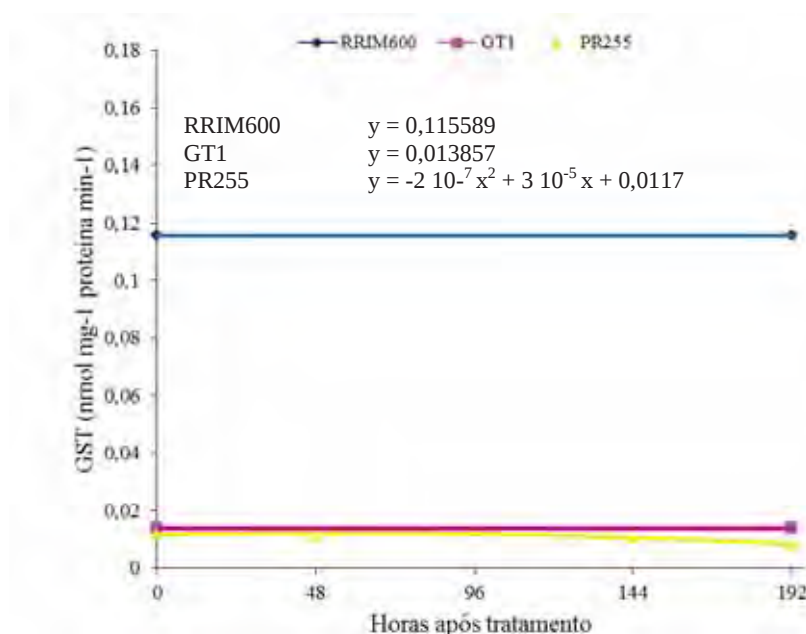


Figura 34. Atividade da GST em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

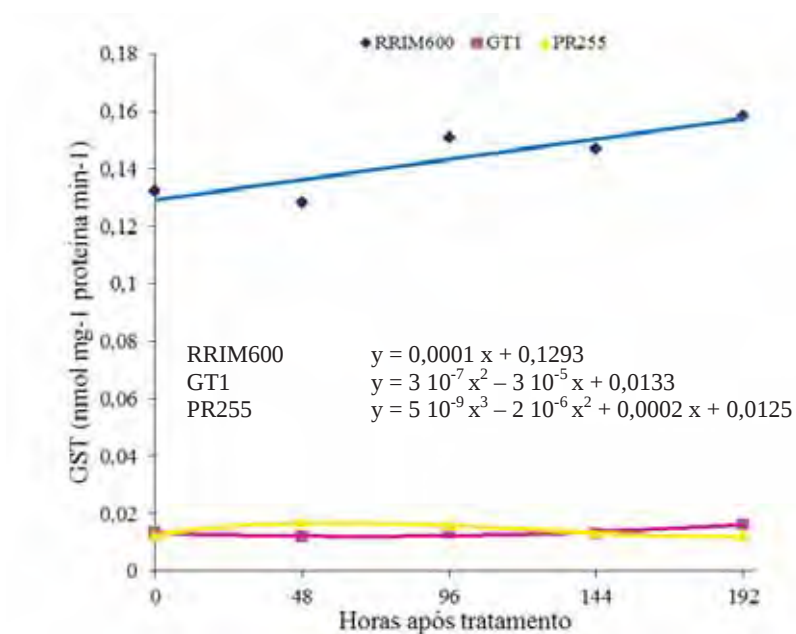


Figura 35. Atividade da GST em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

Tabela 12. Comparação das médias (*) de superóxido dismutase de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Horas após tratamento	Clone	Sadias	Inoculadas	Média
0	RRIM600	1,050	0,954	1,002 a
	GT1	0,085	0,117	0,101 b
	PR255	0,069	0,037	0,053 b
	Média	0,401 A	0,369 A	
48	RRIM600	0,804	1,014	0,909 a
	GT1	0,115	0,128	0,122 b
	PR255	0,066	0,084	0,075 b
	Média	0,328 A	0,409 A	
96	RRIM600	0,929 Ba	1,469 Aa	1,199
	GT1	0,098 Ab	0,202 Ab	0,150
	PR255	0,069 Ab	0,132 Ab	0,101
	Média	0,366	0,601	
144	RRIM600	0,788 Ba	1,311 Aa	1,049
	GT1	0,095 Ab	0,227 Ab	0,161
	PR255	0,363 Ab	0,113 Ab	0,075
	Média	0,306	0,551	
192	RRIM600	0,978 Ba	1,421 Aa	1,200
	GT1	0,055 Ab	0,135 Ab	0,095
	PR255	0,063 Ab	0,046 Ab	0,055
	Média	0,365	0,534	

(*) Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

CV = 46,57%

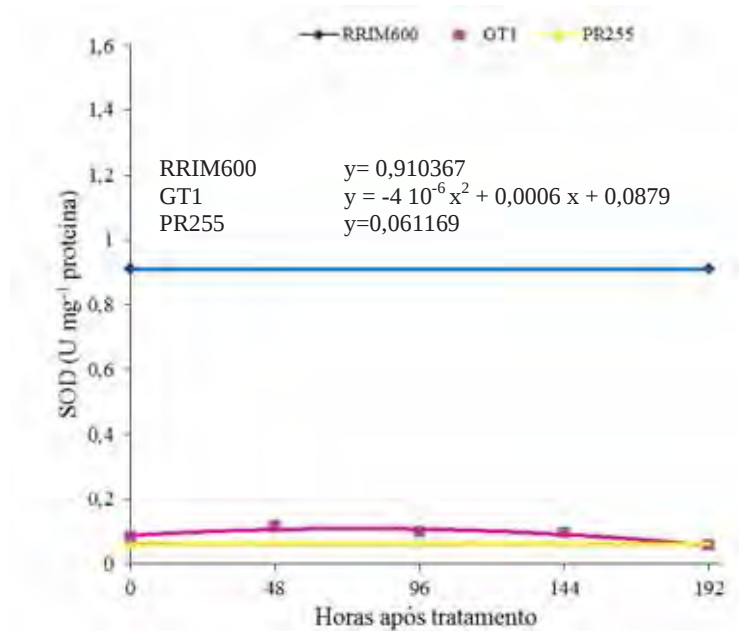


Figura 36. Atividade da SOD em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

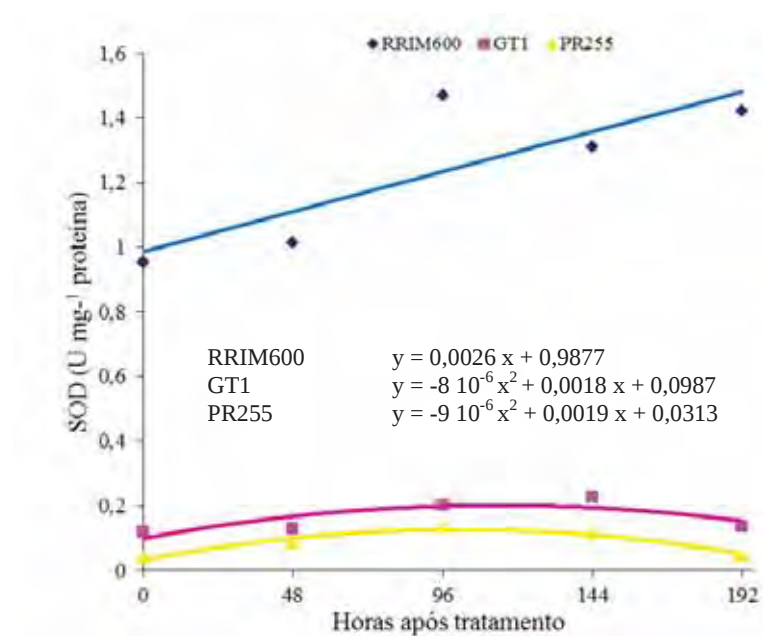


Figura 37. Atividade da SOD em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

Diversos trabalhos relatam alteração da atividade da SOD sob diferentes estresses abióticos, como salinidade (TSENG et al., 2007), metais pesados (LEE et al., 2007) e seca (WANG et al., 2005). Também os estresses bióticos podem ser desencadeadores de incremento da atividade da SOD, como observado em plantas sob situações de infecção fúngica, tais como, 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., 2005).

Sahoo et al. (2007) observaram maior produção de SOD em cultivares de inhame resistentes (Duradim e Jhankri e DP-25) do que em cultivares susceptíveis (N-118) a *P. colocasiae*.

A POD tem sido associada a uma variedade de processos relacionados à defesa em plantas, como reações de hipersensibilidade, lignificação, suberização (SILVA et al., 2007), formação de papilas (BROW et al., 1998) e de fitoalexinas (KRISTENSEN et al., 1999). Expressão local pelo zoósporo *Phytophthora palmivora* em *H. brasiliensis* induziu a produção desta enzima (DUTSADEE & NUNTA, 2008). Di Piero & Pascholati (2004) observaram em plantas de pepino, picos de atividade de POD aos 9 e 12 dias após infecção por *Lentinula edodes* e *Colletotrichum lagenarium* (Pass.), respectivamente.

BOUDJEKO et al. (2005) observaram, 2 dias após a inoculação de *Pythium myriotylum*, aumento de 41% e 13% da atividade da POD nas cultivares resistentes de *Xanthosoma sagittifolium* e nas susceptíveis, respectivamente. Li & Li (1998) estudaram a atividade da POD em folhas de cultivares de pepino (*Cucumis sativus* L.) infectadas com *Cladosporium cucumerinum* Ell. & 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.

Tabela 13. Comparação das médias (*) da atividade das peroxidases de clones de *H. brasiliensis* sadias e inoculadas com conídios de *O. heveae* as 0, 48, 96, 144 e 192 h

Horas (h)	Clone	Sadias	Infectadas	Média
0	RRIM600	493,137	469,172	481,150 a
	GT1	57,744	63,081	60,410 b
	PR255	57,781	62,590	60,180 b
	Média	202,890 A	198,280 A	
48	RRIM600	473,107 Ba	720,361 Aa	569,730
	GT1	59,929 Ab	47,798 Ab	53,860
	PR255	49,977 Ab	77,473 Ab	63,730
	Média	194,340	281,880	
96	RRIM600	331,318 Ba	567,626 Aa	449,470
	GT1	64,362 Ab	53,660 Ab	59,010
	PR255	52,881 Ab	55,590 Ab	54,240
	Média	149,520	225,626	
144	RRIM600	353,075 Ba	399,618 Aa	376,347
	GT1	51,801 Ab	47,603 Ab	49,702
	PR255	41,764 Ab	47,991 Ab	44,878
	Média	148,881	165,071	
192	RRIM600	361,211	456,840	409,090 a
	GT1	50,400	49,546	49,970 b
	PR255	45,137	51,934	48,540 b
	Média	152,250 A	186,110 A	

(*) Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas entre tratamentos e minúsculas entre clones, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

CV = 36,70%

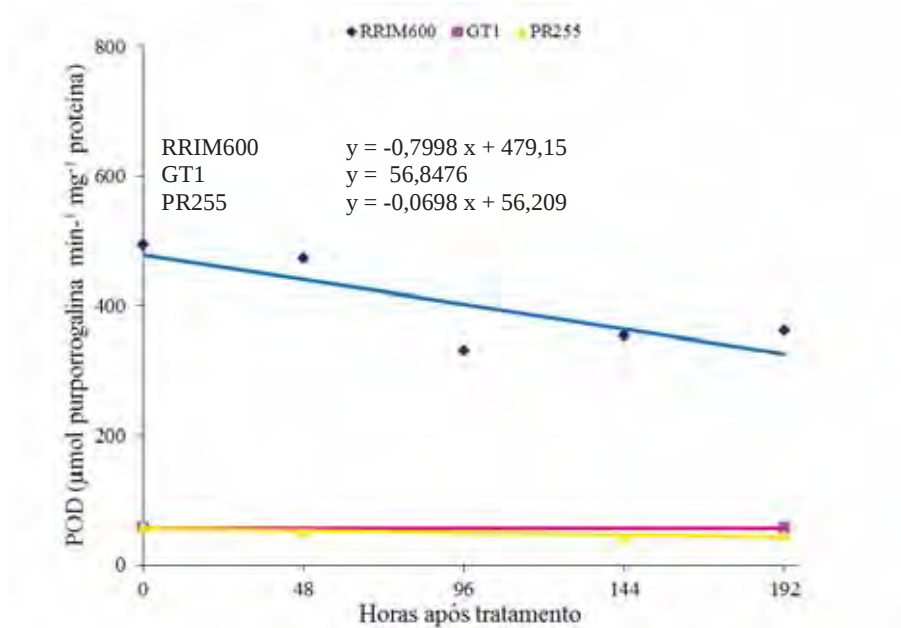


Figura 38. Atividade da POD em folhas de clones de seringueira sadias em diferentes períodos.

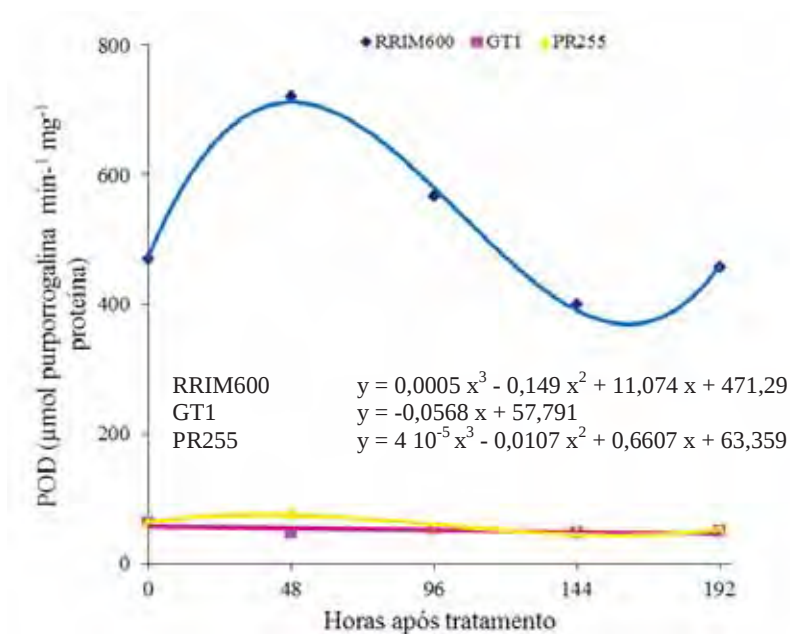


Figura 39. Atividade da POD em folhas de clones de seringueira inoculadas com conídios de *O. heveae* em diferentes períodos.

Diante dos resultados desta pesquisa pode-se considerar que até o período estudado os clones de seringueira GT1 e PR255 não apresentaram alterações na atividade das enzimas estudadas sob a interação planta-patógeno. Já o clone RRIM600 apresentou maior atividade das enzimas diante à infecção, o que evidencia a rápida ativação enzimática como mecanismo de defesa antioxidante ao estresse pelo patógeno *O. heveae*, ao comparo-lo com os demais clones.

Dentre os clones de seringueira analisados, pode ser considerado que no RRIM600, mecanismos antioxidantes, como a ação das enzimas GST, SOD e POD tenha sido eficientemente ativado e, com isso, resultado na eliminação de formado (Figuras 32 a 39).

Pesquisas da resposta antioxidante tem tido como objetivo procurar uma ferramenta para elucidar como fatores bióticos e abióticos interferem em um organismo na resposta ao estresse. A resposta oxidativa é universal em plantas submetidas a estresse por patógenos (CARRILLO; VALLE, 2005).

Dentre os parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo avaliados no presente trabalho, a determinação da atividade de GST, SOD e POD pode ser utilizada como medida de resposta diferencial de clones de seringueira frente à infecção por *O. heveae*. Estudos analisando outros parâmetros bioquímicos em plantas de *H. brasiliensis* são necessários para se verificar a existência de relações indicativas de estresse oxidativo com a resistência à infecção por *O. heveae*.

Ressalta-se que a partir da observação dos sintomas visuais de injúria pela infecção por *O. heveae*, nos clones de *H. brasiliensis* não foram detectados sinais de clorose, bem como de enrugamento dos folíolos durante o período de até 192 horas de infecção.

8. CONCLUSÕES

Para as condições em que se desenvolveu a presente pesquisa, pode ser concluído que:

- Existe diferença de resposta dos clones de *H. brasiliensis* analisados, quanto aos parâmetros indicadores de estresse oxidativo, frente à infecção por *O. heveae*;
- O fungo *O. heveae* em clones de *H. brasiliensis* não causa produção de lipoperóxidos e não altera os teores de açúcares solúveis totais e redutores. Entretanto, é constatado estresse oxidativo nas plantas, evidenciado pela degradação de clorofila total, principalmente de clorofila *a* e de carotenóides e diminuição dos teores de peróxido de hidrogênio, com ênfase para o clone RRIM600;
- Existe diferença da resposta da atividade das enzimas antioxidantes, GST, POD e SOD, nos clones de seringueira, RRIM600, GT1 e PR255, sendo as maiores atividades das enzimas características do clone RRIM600 e a infecção causa aumento da atividade.

- Dentre os clones de seringueira analisados, pode ser considerado que o RRIM600 é o mais resistente à doença, evidenciado pela diminuição de peróxido de hidrogênio, refletido pela atuação das enzimas antioxidantes na remoção desta ERO.
- Dentre os parâmetros bioquímicos analisados neste trabalho, a determinação da atividade de GST, SOD e POD pode ser utilizada como resposta diferencial de clones de seringueira frente à infecção por *O. heveae*;
- A partir da observação dos sintomas visuais de injúria pela infecção por *O. heveae*, nos clones de *H. brasiliensis* não foram detectados sinais de clorose, bem como de enrugamento dos folíolos durante o período de até 192 horas de infecção.;
- Estudos analisando outros parâmetros bioquímicos em plantas de *H. brasiliensis* são necessários para verificar a existência de relações indicativas de estresse oxidativo com a resistência à infecção por *O. heveae*.

9. REFERÊNCIAS

ABARCA, D.; MARTIM, M.; SABATER, B. Differential leaf stress responses in young and senescent plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 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. **Plant Journal**, Malden, 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**, Oxford, v. 59, p. 21-33, 2007.

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**, Berlin, 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**, Bethesda, v. 90, p. 109-116. 1989.

ARNON, D. I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 24, p. 1-15. 1949.

ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, p. 1227-1236, 2002.

AUER, C. Oídios de espécies florestais. In: STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. (Eds.). **Oídios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. p. 391-418.

BAIASAK, R. et al. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 33, p. 299-321, 1995.

BAKER, C.J.; ORLANDI, E. W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 299-321, 1995.

BARRETO, A. H. L. H. Estratégias de infecção dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum* [(Sacc. & Magnus) Briosi & Cav.)] e *Colletotrichum gloesporioides* [(Penz) Penz & Sacc.] em feijão de corda [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] e respostas bioquímicas e moleculares associadas à defesa da planta. 2005. 297 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

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

BATISTA F. A. et al. Doenças e Pragas da seringueira. **Boletim técnico** 25, Instituto Biológico, p.1-79, 2011.

BEAUCHAMP, C.; FRODOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, Orlando, 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. **Plant Journal**, Malden, v. 208, p. 337-344, 1999.

BENESI, J. F. C. **A cultura da seringueira para o Estado de São Paulo**. Campinas: CATI, 2011. 91 p. (Manual, 72).

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.

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**, Clare, v. 164, n. 1, p. 77-84, 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.

BOUDJEKO, T. et al. A.P. Peroxidase and pectin methylesterase activities in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) roots upon *Pythium myriotylum* inoculation. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 7/8, p. 409-416, 2005.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase and salt tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

BOWLES, D. J. Defense related proteins in higher plants. **Biochemistry**, Tennessee, v. 59, p. 837-907, 1990.

BROWN, I. et al. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. **Plant Journal**, Malden, v. 15, n. 3, p. 333-343, 1998.

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

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known 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.

CARRILLO, N.; VALLE, E. M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**, Córdoba, v. 2, n. 2, p. 1-12, mar. 2005.

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, 2001.

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**, Umuarama, v. 2, p. 23-31, 2005.

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.

CECHIN, I. et al. Differential responses between mature and young leaves of sunflower plants to oxidative stress caused by water deficit. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, p. 1290 - 1294, 2010.

CHEN, X. R. et al. Differences in the induction of the oxidative burst in compatible and incompatible interactions of soybean and *Phytophthora sojae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 73, p. 16-24, 2008.

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**, Lancaster, 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.

DAVLETOVA, S. et al. Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 1, p. 268-281, 2005.

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

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, p. 243-250, 2004.

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

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

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, New York, 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**, New York, 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**, California, 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 of Science**, London, v. 58, p. 165-174, 2001.

FERREIRA, L. C. **Resposta ao estresse oxidativo induzido pelo cobre em plantas de batata (*Solanum tuberosum*): aspectos bioquímicos e fisiológicos**. 2004. 96 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**, San Diego, v. 97, p. 47-54, 2010.

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

FLOWERS, T. J. et al. QTL: their place in engineering tolerance of rice to salinity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 99-106, 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. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

FOYER, C. H. et al. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. **Physiology Plant**, Waterbury, v. 100, p. 241-254, 1997.

FURTADO, E. L.; SILVEIRA, A. P. **Nova ocorrência de oídio da seringueira no Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto Biológico, 1993. 3 p. (Comunicado técnico, 3).

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, Essex, v. 143, p. 1-96, 2009.

GASPAROTTO, L.; TRINDADE, D. R.; SILVA, H. M. **Doenças da seringueira**. Manaus: Embrapa, CNPSD, 1984. 71 p. (Circular técnica).

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

GAYOSO, C. et al. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 102, p. 1-13, 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. CICLO DE PALESTRAS SOBRE A HEVEICULTURA PAULISTA, 1., 1998, Barretos. **Anais...** Barretos: Secretaria de Agricultura e Abastecimento; Associação Paulista de Produtores e Beneficiadores de Borracha, 1999. p. 115-140.

GONÇALVES, P. de 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 de S. et al. Desempenho de clones de seringueira da série IAC 300 na região do Planalto de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 2, p. 113-138, 2002.

GREENBERG J. T. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 525-545, 1997.

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

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

HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 462-468, 2001.

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

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

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY.

Enzyme nomenclature - EC 1.11.1.7. (Peroxidase). 2010. Disponível em:

<<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/7.html>>. Acesso em: 25 jun. 2010.

IVANOV, S. Alterations in some oxidative parameters in susceptible and resistant wheat plants infected with *Puccinia recondita* f.sp. tritici. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, n. 3, p. 275-279, 2005.

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**, New York, v. 78, p. 151-156, 1991.

JANSEN, M. A. K.; VAN DEN NOORT, R. E. Ultraviolet-b radiation induces complex alteration in stomatal behavior. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 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**, Dordrecht, v. 26, p. 1855-1866, 1994.

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. **Plant Physiology**, Rockville, v. 39, p. 721-730, 1998.

KIM, H. J. et al. Methanobactin, a copper-acquisition compound from methane- oxidizing bacteria. **Science**, London, v. 305, p. 1612-1615, 2004.

KIM, Y. H. Overexpression of sweet potato swpa4 peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco. **Plant Science**, Clare, 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**, Rockville, v. 44, p. 749-755, 1997.

KRISTENSEN, B. K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S. K. Barley coleoptiles peroxidases. Purification, molecular cloning and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 501-512, 1999.

KUŹNIAK, E.; SKŁODOWSKA, M. Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. **Plant Science**, Clare, 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**, London, v. 95, p. 466-473, 2005.

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

LEE, S. H. et al. Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 164, n. 12, p. 1626-1638, 2007.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F. Hospedeiro: alterações fisiológicas induzidas por fitopatógenos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Org.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, p. 393-416.

LEVINE, A. J.; WU, X. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. **Proceedings of the 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.

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

LIU, L.; XU, S. M.; WOO, K. C. Solar UV-B radiation on growth, photosynthesis and the xanthophylls cycle in tropical acacia and eucalyptus. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 121-135, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 2. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 2, 384 p.

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**, Bethesda, 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, 1994.

MALKIN, R.; NIYOGI, K. Photosynthesis. In: BUCHNAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Lancaster: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 568-628.

MANNERVIK, B.; GUTHENBERG, C. Glutathione transferases (human placenta). **Methods in 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**, Washington, DC, v. 47, p. 127-158, 1996.

MARTINEZ, A. A. **Borracha**: São Paulo é o maior produtor nacional. 2006. Disponível em: <<http://www.infobibos.com/artigos/borracha/index.htm>>. Acesso em: 17 maio 2011.

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**, Saint Paul, v. 11, p. 1038-1047, 1998.

MEHDY, M. C. Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 467-472. 1994.

MELLERSH, D. G. et al. H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. **Plant Journal**, Malden, v. 29, p. 257-268, 2002.

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

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, p. 15-19, 2006.

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

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

MOZAMBANI, A. E. Introdução, botânica e melhoramento da seringueira (*Hevea spp.*). In: BRINHOLI, O. (Ed.). **Cultura da seringueira (*Hevea spp.*)**. Botucatu: Fepaf, 1994. v. 1.

NEILL, 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.

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

ORTOLANI, A. A. et al. Aptidão climática para regionalização da heveicultura no Brasil. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO PARA RECOMENDAÇÃO DE CLONES DE SERINGUEIRA, 1983, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: EMBRAPA, 1983. p. 19-28,

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.

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

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 2, p. 1-51, 1994.

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

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

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

PEREIRA, A. V. et al. **Cultura da seringueira do cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2001. 59 p.

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**, Oxford, v. 42, p. 1-10, 1999.

PRASSAD, T. K. et al. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**, Rockville, 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 Plant Physiology**, Rockville, v. 53, p. 25-31, 2006.

QUEIROZ, C. G. S.; GARCIA, Q. S.; FILHO, J. P. L. Atividade fotossintética 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./abr. 2002

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, MG, v. 28, p. 123-130, 2003.

ROSSETI, V. Oídio da seringueira. **O Biológico**, São Paulo, v. 24, p. 260-267, 1958.

RUBBER STATISTICAL NEWS. 2009. Disponível em:
<http://www.rubberboard.org.inRSN/RSN_march2009.pdf>. Acesso em: 23 maio 2009.

RYTER, S. W.; TYRREL, R. M. Singlet molecular oxygen: a possible effectors 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. **Physiology Molecular and 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**, London, v. 86, p. 1007-1015, 2000.

SAHOO, S.; CHO-HONG, J. G.; SIEW-LOK, T. Development of hybrid polymer scaffolds for potencial applications in ligament and tendon tissue engineering. **Biomedical Materials**, Bristol, v. 2, p. 169-173, 2007.

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

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

SARRIA, V. 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 (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, p. 995-1014, 2005.

SCHRECK, R.; BAEUERLE, P. A. The role of oxygen radicals as second messengers, **Trends Cell Biology**, Oxford, v. 1, p. 39-42, 1991.

SCHOLES, J. D. et al. Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. **New Phytologist**, Cambridge, v. 126, p. 213-222, 1994.

SERGIEV, I.; ALEXIEVA, V.; KARANOV, E. Effect os spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. **Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences**, Sofia, v. 21, p. 121-124, 1997.

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. **Advances in Botanical Research**, London, v. 26, p. 135-192. 1997.

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

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, Viçosa, MG, v. 32, p. 189-196, 2007.

SMIRNORFF, 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**, Copenhagen, v. 85, p. 85-89, 1992.

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

STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. **Oídios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 484 p.

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

TANG, X.; ROLEE, S. A.; SCHOLLES, 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**, Bethesda, 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**, Clare, v. 153, p. 65-72, 2000.

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

TOMANKOVÁ, 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.

TRINDADE, D. R.; FURTADO, E. L. Doenças da seringueira. In: AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 1997. v. 2.

TSANG, E. W. T. et al. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. **Plant Cell**, Rockville, v. 3, p. 562-571, 1991.

TSENG, M. J.; LIU, C. H.; YIU, J. C. Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic *Chinese cabbage* plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 45, p. 822-833, 2007.

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

VIDAL, R. A.; MEIROTTO JUNIOR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2002. 152 p.

WANG, F. Z. et al. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 162, p. 465-472, 2005.

WRIGHT, D. P. et al. Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. I. Alterations in carbohydrate metabolism. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 47, p. 237-253, 1995.

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

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

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