



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

VITOR DE LAIA NASCIMENTO

**RESPOSTA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM
ABACAXIZEIRO APÓS INJÚRIA FOLIAR**

**VITÓRIA - ES
2013**

VITOR DE LAIA NASCIMENTO

**RESPOSTA DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM
ABACAXIZEIRO APÓS INJÚRIA FOLIAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Machado Bueno Fernandes.

Co-orientador: Prof. Dr. José Aires Ventura.

VITÓRIA - ES
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

N244r Nascimento, Vitor de Laia, 1988-
Respostas das enzimas antioxidantes em abacaxizeiro após
injúria foliar / Vitor de Laia Nascimento. – 2013.
60 f. : il.

Orientadora: Patricia Machado Bueno Fernandes.
Coorientador: José Aires Ventura.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e
Naturais.

1. Abacaxi - Doenças e pragas. 2. Stress oxidativo. 3.
Enzimas. I. Fernandes, Patricia Machado Bueno. II. Ventura,
José Aires, 1954-. III. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

ASSINATURAS DA BANCA

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Patricia M. B. Fernandes pela oportunidade, desde o início da graduação, e o incentivo à pesquisa, auxiliando na minha formação pessoal e intelectual.

Ao Dr. José Aires Ventura pela co-orientação e apoio científico, com suas importantes sugestões ao trabalho.

Ao Prof. Dr. A. Alberto R. Fernandes pelos auxílios na área de exatas além das questões relativas à pós-graduação.

Aos membros da banca que aceitaram contribuir com meu trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado 2011.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio, novos e antigos, pelo apoio e ótimo ambiente de trabalho.

À FAPES pela bolsa concedida no decorrer do mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal pelo conhecimento passado.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Ricardo Celestino por atuar tão prestativamente sempre ajudando quando possível.

À minha namorada Sâmia Alpoim, especial companheira que esteve do meu lado durante boa parte desta etapa, sempre me apoiando e incentivando.

À minha querida família, Hudson, Sônia e Glaucia, por todo amor e suporte, paciência e compreensão, em todas etapas da minha vida.

A todos, os meus mais sinceros agradecimentos. Muito obrigado.

RESUMO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*) é uma das frutíferas tropicais mais produzidas no mundo. O Brasil destaca-se mundialmente na produção desta fruta e o Espírito Santo vem mostrando potencial nacional de produtividade. Doenças e pragas constituem fatores restritivos para o alcance de uma produtividade ideal em qualquer cultura agrícola. O abacaxizeiro é uma planta que pode ser afetada por várias doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, destacando-se em importância econômica a fusariose. As respostas de hipersensibilidade são os primeiros eventos que ocorrem nas células das plantas em resposta aos estresses bióticos e abióticos. Há síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroxila ($OH^\cdot$) e superóxido ($O_2^\cdot$) que podem produzir danos oxidativos nos seres vivos como forma de proteção. As plantas possuem um sistema de defesa bem desenvolvido contra as EROs, constituído por uma complexa gama de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que protegem as células dos danos oxidativos. O processo de infecção de diversos fungos, como o causador da fusariose do abacaxizeiro, é dependente de injúria nos tecidos da planta. O aumento da expressão e atividade das enzimas antioxidantes está correlacionado com a defesa de plantas à fitopatógenos e pragas. O objetivo foi caracterizar a resposta diferencial entre duas cvs de abacaxizeiro, Vitória (resistente à fusariose) e Pérola (susceptível à fusariose), ao estresse oxidativo gerado pela injúria foliar. Para isso foi determinada a concentração de proteínas solúveis totais das duas cvs, Vitória e Pérola, com e sem injúria foliar, quantificado e comparado à atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1), peroxidase do ascorbato (APX – EC 1.11.1.11) e catalase (CAT – EC 1.11.1.6) após o tratamento de injúria foliar em diferentes tempos e caracterizado os perfis das proteínas solúveis totais e das isoenzimas de SOD e CAT em SDS-PAGE nos tempos em que houver melhor resposta. Como primeiro resultado, temos que não há diferença das proteínas solúveis totais entre as cultivares e os tratamentos nos tempos analisados. Também foi demonstrado que as enzimas antioxidantes da cv Vitória apresentam significativa diferença de atividade em relação às da Pérola. A SOD da cv. Vitória apresentou pico de resposta aos 15 minutos após a injúria. A APX apresentou resposta diferencial, para Vitória, aos 30 e 45 minutos após injúria foliar. Já a CAT da cv. Vitória apresentou um pico de resposta diferencial aos 45 minutos. As análises em SDS-PAGE com padrões de SOD e CAT, aos 15, 30 e 45 minutos após a injúria foliar demonstraram que não há diferença quantitativa entre as enzimas analisadas. Na cv Vitória há correlação entre a atividade de enzimas antioxidantes e a resposta à injúria foliar. Porém a atividade não está diretamente relacionada à concentração das enzimas. Por não haver grande diferença na expressão protéica sugere-se que reguladores e cofatores dessas enzimas apresentem fundamental importância nestes mecanismos.

Palavras-chave: *Ananas comosus* var. *comosus*; enzimologia; estresse oxidativo; estresse mecânico; injúria foliar.

ABSTRACT

The pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) is a tropical fruit of the most produced in the world. The Brazil stands out worldwide in the production of this fruit and the Espírito Santo state are showing potential national productivity. Diseases are limiting factors for the achievement of an optimum productivity in any crop. The pineapple is a plant that can be affected by various diseases caused by fungi, bacteria and viruses, especially in economic importance fusariosis. The hypersensitivity responses are the first events that occur in the cells of plants in response to biotic and abiotic stresses. There synthesis of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl ($OH^\cdot$) and superoxide ($O_2^\cdot$) that can produce oxidative damage in living beings as a form of protection. The plants have a well-developed defense system against ROS comprising a complex array of enzymatic and non-enzymatic antioxidants that protect cells from oxidative damage. The infection process of *Fusarium* pineapple is dependent on mechanical stress, foliar wound. The literature demonstrates that the cultivar (cv) Vitória, resistant to fusarium wilt has accelerated healing compared to a susceptible cv, Peróla. Increased expression and activity of antioxidant enzymes is correlated with plant defense to pathogens and pests. The objective was to characterize the differential response between two cultivars of pineapple, Vitória and Peróla, to the oxidative stress generated by foliar wound. For it was determined the concentration of total soluble protein of the two cvs, Vitória and Peróla, with and without foliar wound, quantified and compared the activity of superoxide dismutase (SOD - EC 1.15.1.1), ascorbate peroxidase (APX - EC 1.11.1.11) and catalase (CAT - EC 1.11.1.6) after treatment of foliar wound at different times and characterized the profiles of total soluble proteins and isozymes of SOD and CAT in SDS-PAGE at the times in which there is better response. Initially we have no difference of total soluble proteins between cvs and treatments for the times analyzed. It was also demonstrated that the antioxidant enzymes cv Vitória exhibit significant difference in activity compared to the Pérola. Vitória's SOD showed a peak response at 15 minutes after injury. APX showed differential response to Vitória at 30 and 45 minutes after foliar wound. Already 'Vitória' CAT peaked differential response at 45 minutes. The analysis on SDS-PAGE with patterns of SOD and CAT, at 15, 30 and 45 minutes after foliar wound showed no difference between the enzymes quantitatively analyzed. Cultivar 'Vitória' presents correlation between the activity of antioxidant enzymes and response to foliar wound. However the activity was not directly related to the enzymes concentration. Since there is no difference in protein expression we suggest that enzymes regulators and cofactors are important in these mechanisms.

Keywords: *Ananas comosus* var. *comosus*, enzymology, oxidative stress, mechanical stress, foliar wound.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APX - peroxidase do ascorbato
BSA - albumina de soro bovino
CAM - Metabolismo do Ácido das Crassuláceas
CAT - catalase
Cu/Zn-SOD - superóxido dismutase com cobre/zinco
DHA - deidroascorbato
DIC - delineamento inteiramente casualizado
DTT- Ditionitrito
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
Fe-SOD - superóxido dismutase com ferro
HR - Resposta de Hipersensibilidade
kDa - Kilodaltons
MDA - monodeidroascorbato
MDAR - monodeidroascorbato redutase
Mn-SOD - superóxido dismutase com manganês
NBT - azul de nitrotetrazólio, *nitroblue tetrazolium*
 O_2^- - radical superóxido
PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida
PEP - Fosfoenolpiruvato
PMSF - Fenilmetilsulfonil fluoreto
POX's - peroxidases
PSI - Fotossistema I
PSII - Fotossistema II
PVP - Polivinil pirrolidona
SDS - Dodecilsulfato de sódio
SOD - superóxido dismutase
TRIS - Tris (hidroximetil)aminometano

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Municípios produtores de abacaxi no estado do Espírito Santo.....	15
FIGURA 2. Abacaxizeiro cultivar Vitória.....	17
FIGURA 3. Reação das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX.....	20
FIGURA 4. Frutos de abacaxi das cultivares Vitória (A) e Pérola (B).....	28
FIGURA 5. Quantificação de proteínas de folhas de abacaxizeiro.....	35
FIGURA 6. Atividade enzimática de SOD.....	37
FIGURA 7. Atividade enzimática de APX.....	39
FIGURA 8. Atividade enzimática de CAT.....	41
FIGURA 9. Atividade enzimática na cultivar Vitória.....	42
FIGURA 10. Perfil de proteínas totais em SDS-PAGE aos 15 minutos (repetições).....	44
FIGURA 11. Perfil de proteínas totais em SDS-PAGE aos 30 minutos (repetições).....	46
FIGURA 12. Perfil de proteínas totais em SDS-PAGE aos 45 minutos (repetições).....	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 O ABACAXIZEIRO.....	12
1.2 IMPORTÂNCIA DO ABACAXI DA FRUTICULTURA DO ESPÍRITO SANTO..	14
1.3 CULTIVARES DE ABACAXIZEIRO.....	16
1.3.1 A CULTIVAR VITÓRIA.....	18
1.4 ESTRESSE POR INJÚRIA FOLIAR.....	18
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	19
1.5.1 GERAÇÃO DE EROs A NÍVEL SUB-CELULAR	21
1.5.2 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....	22
1.5.2.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	23
1.5.2.2 PEROXIDASES (POX) E PEROXIDASE DO ASCORBATO (APX).....	24
1.5.2.3 CATALASE (CAT).....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	28
3.2 PROSPECÇÃO DO TEMPO DE RESPOSTA A INJURIA FOLIAR.....	29
3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	29
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	30

3.5 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	30
3.6 ATIVIDADE DA PEROXIDASE DO ASCORBATO (APX).....	31
3.7 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT).....	31
3.8 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA ELETROFORESE	32
3.9 SDS-PAGE E PERFIL ISOENZIMÁTICO DE SOD E CAT.....	32
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS.....	34
4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	35
4.2.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	36
4.2.2 PEROXIDASE DO ASCORBATO (APX).....	38
4.2.3 CATALASE (CAT).....	39
4.3 PERFIL ELETROFORÉTICO.....	42
5 CONCLUSÕES.....	50
6 REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ABACAXIZEIRO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é uma das frutíferas tropicais mais produzidas no mundo, sendo seu fruto simbólico de regiões tropicais e subtropicais, com grande valor comercial em forma fresca ou processada (AQUIJE et al., 2010).

O abacaxi cultivado é uma monocotiledônea perene da família Bromeliaceae. As folhas são lanceoladas e apresentam-se dispostas em espiral, formando uma densa roseta. A região basal das folhas, ou porção acrofilada, é expandida e circunda o caule, cobrindo-o lateralmente (KRAUSS, 1948). Este fruto é extensivamente cultivado em áreas tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios. Originário da América do Sul, onde apresenta grande variabilidade genética dentro da espécie (LOISON-CABOT, 1992; FERREIRA et al., 1992).

As folhas do abacaxizeiro são padronizadas e podem ser divididas de acordo com o desenvolvimento e forma geral. As folhas mais velhas (A, B, C e D) são completamente desenvolvidas e apresentam forma lanceolada, enquanto a base é consideravelmente expandida. As folhas jovens (E e F) apresentam-se localizadas centralmente na roseta (PY et al., 1984).

As folhas D apresentam-se como a mais jovem entre as folhas adultas e as mais ativas fisiologicamente entre todas as folhas, sendo as folhas de maior crescimento. Geralmente as folhas D formam um ângulo de 45° entre o nível do solo e um eixo imaginário que passa pelo centro da planta (PY; TISSEAU, 1969).

Quando completamente desenvolvida, a folha do abacaxizeiro consiste em uma lâmina com uma parte clorofilada, sua porção principal, e uma base

acolorofilada expandida. As diferenças nas porções externas da folha também são notadas internamente, em que as regiões desiguais superficialmente também são caracterizadas pelas diferenças nas estruturas internas. As diferenças internas entre as duas regiões da folha – clorofilada e acolorofilada – são descritas como quantitativas, em relação ao volume dos diferentes tecidos, não estando sempre presentes e sem importância para a sistemática da planta. Outros autores afirmam que as diferenças estruturais entre as porções apical e basal da folha do abacaxizeiro apresentam importância fisiológica: a porção basal apresentaria função de raiz, enquanto a porção apical teria funções essenciais de folha (KRAUSS, 1948).

O abacaxizeiro normalmente apresenta fisiologia C3 e em condições estressantes apresenta a fisiologia CAM (Metabolismo do ácido das crassuláceas), o que permite à espécie uma maior resistência a períodos secos, provocada pela adaptação na fixação de carbono fotossintetizado. As plantas com metabolismo CAM possuem células com habilidade de fixar o carbono no escuro, havendo uma separação temporal entre a via C4 e o ciclo de Calvin. Assim, o CO₂ é fixado à noite, quando os estômatos estão abertos. Nesse período o amido do cloroplasto é quebrado em fosfoenolpiruvato (PEP) até redução em malato, que é bombeado para o vacúolo e estocado como ácido málico. Durante o dia, o ácido málico é recuperado, produzindo CO₂ (que entra no ciclo de Calvin e então é fixado pela Rubisco) e piruvato (que é convertido em amido e outros açúcares). Assim os estômatos permanecem fechados durante o dia, o que previne a perda de água e de CO₂ (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O Brasil destacou-se, em 2009 e 2010, como maior produtor de abacaxi no mundo, porém em 2011 a sua produção foi ultrapassada pela Tailândia (FAO, 2013).

1.2 A IMPORTÂNCIA DO ABACAXI NA FRUTICULTURA DO ESPÍRITO SANTO

Para 82% dos municípios capixabas o agronegócio é a principal atividade econômica e o crescimento do setor no estado está atingindo destaque nacional em diversas culturas agrícolas que demandam mão-de-obra e geram rendas em pequenas áreas (ESPÍRITO SANTO, 2005).

No Espírito Santo, a área cultivada com abacaxizeiro ultrapassa quatro mil hectares, concentrando-se principalmente nos municípios da Região Sul, sendo uma planta de cultivo tradicional na região litorânea nos municípios de Marataízes, Itapemirim, Presidente Kennedy e Atílio Vivaqua (Figura 1) (INCAPER, 2007). Entretanto a partir de 2004, a produção também se expandiu para o norte do estado, nos municípios de Pinheiros, Boa Esperança Conceição da Barra, Nova Venécia, São Mateus e Linhares. De acordo com um levantamento do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), a cultura apresentou um crescimento de 45% nos últimos seis anos, aumentando a produção de aproximadamente 20.000 para 35.000 t. Por outro lado, a abacaxicultura também enfrenta sérios problemas, especialmente de origem fitossanitária, que limitam a sua inserção no mercado internacional. Existem exigências específicas da parte dos países importadores de frutas frescas, que devem ser atendidas. Rigorosas restrições são feitas para a entrada frutas portadoras de organismos exóticos, que possam representar um risco para a agricultura do país importador (INCAPER, 2007; MATOS, 2000).

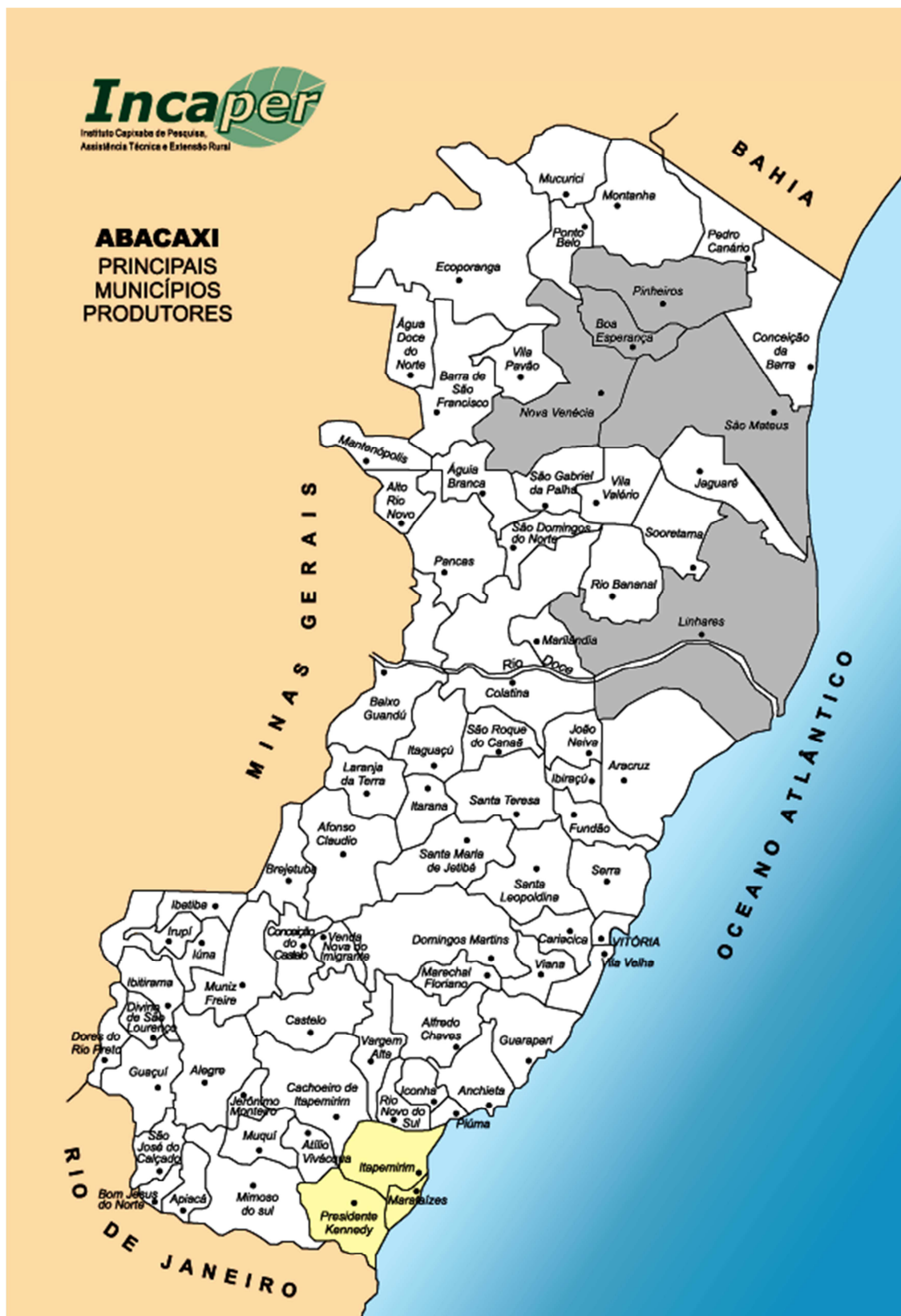


FIGURA 1. Municípios produtores de abacaxi no estado do Espírito Santo (INCAPER, 2007).

1.3 CULTIVARES DE ABACAXIZEIRO

A escolha correta de cultivares para determinados ambientes e sistemas de produção é de fundamental importância para a obtenção de uma boa produtividade. Contudo, isso *per se* não é suficiente para o sucesso da exploração. É necessário, também, que a cultivar tenha características que atendam às exigências de comerciantes e consumidores (FREIRE FILHO et al., 2000). Doenças e pragas constituem fatores restritivos para o alcance de uma produção ideal em qualquer cultura agrícola. O abacaxizeiro é uma planta que pode ser afetada por várias doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, além de anomalias de origem não parasitária. Muitos problemas fitopatológicos têm surgido destacando-se as doenças fúngicas como a fusariose, a podridão-negra-das-mudas, doenças viróticas como a murcha do abacaxizeiro e pragas como a cochonilha e a broca do fruto. Muitas dessas doenças são limitantes à produção da cultura, impedindo assim a obtenção de altos rendimentos. A maioria dos patógenos é disseminada para as lavouras pelas mudas infectadas, sendo a qualidade e fitossanidade destas, fundamental para a prevenção ou redução das perdas, além de evitar a disseminação do patógeno para áreas ainda não afetadas (VENTURA; ZAMBOLIM, 2002).

Apesar de ser extensivamente plantada, a cultivar Pérola apresenta alta susceptibilidade à fusariose, considerada a doença de maior importância econômica para a cultura no país (SANTOS et al.; 2002). A cultivar Pérola caracteriza-se por apresentar plantas eretas, com folhas longas providas de espinhos e pedúnculos longos. Produz numerosas mudas do tipo filhote e poucos do tipo rebentão. O fruto é cônico com casca amarelada, polpa branca, pouco ácida, suculenta, saborosa, peso médio entre 1 e 1,5 kg e apresenta coroa grande (NASCENTE, 2005). A cultivar tem amplo predomínio na produção brasileira, constituindo aproximadamente 80% da produção nacional. O mercado interno prefere a cultivar Pérola por seu sabor mais doce e menos ácido (REINHARDT et al., 2000).

A utilização de cultivares resistentes tem sido apontada como o mais eficiente e econômico método de controle de doenças, principalmente para culturas como o abacaxi, plantado normalmente por agricultores de baixa renda e de reduzido conhecimento tecnológico (VENTURA, 1994).

Com o objetivo principal de identificar fontes de resistência e obter híbridos resistentes à fusariose, além de mais produtivos e com qualidade de frutos para o mercado. Híbridos provenientes da Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical foram introduzidos nas Fazendas Experimentais do Incaper, onde se realizou por mais de dez anos uma Seleção Recorrente Clonal que originou a cultivar Vitória (Figura 2), lançada em 2006 (VENTURA et al., 2009).



FIGURA 2. Frutos de abacaxi da cultivar Vitória, produzidos na Fazenda Experimental de Sooretama -ES (VENTURA et al., 2009).

1.3.1 A CULTIVAR VITÓRIA

A cultivar Vitória apresenta características agronômicas semelhantes ou superiores em relação à cultivar Pérola, por exemplo. Essas plantas têm como vantagem a ausência de espinhos nas folhas, o que facilita os tratos culturais, sendo as recomendações técnicas de cultivo as mesmas atualmente usadas pelos produtores para a Pérola. Possui o mesmo porte da Pérola e plantas vigorosas. Apresenta bom perfilhamento, bom desenvolvimento e crescimento, produz frutos quando maduros de excelente qualidade de mercado (VENTURA et al., 2009).

Por ser resistente à fusariose, essa cultivar dispensa a utilização de fungicidas para o controle da doença, possibilitando a redução nos custos de produção por hectare, referente à aquisição de fungicidas e de aplicação, além de reduzir também os riscos de impacto ambiental e aumentar a produtividade comparativamente em, no mínimo, 30% (VENTURA et al., 2009). Conclui-se que a cultivar Vitória vem suprir a grande lacuna deixada pela ausência de uma cultivar resistente à fusariose, constituindo-se em uma alternativa economicamente viável para os produtores de abacaxi.

1.4 ESTRESSE POR INJÚRIA FOLIAR

Apesar da maior parte das plantações serem grandemente afetadas por estresses por ferida, ou por injúria, estudos sobre o tema são pouco frequentes, principalmente na sua correlação com o metabolismo de H_2O_2 . As células na superfície da ferida, geralmente respondem extensivamente com processos de lignificação e suberização. É bem sabido que o reforço de estruturas da parede celular, bem como as reações de defesa contra agentes patogênicos são altamente dependentes das enzimas geradoras de H_2O_2 . No processo de cicatrização de feridas de tecidos de plantas o H_2O_2 é considerado

como um fator-chave na regeneração da parede celular (TAMMINGA, 1993; BRADLEY et al., 1992; DEUNFF et al., 2004).

Além disso, uma alta concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é produzida em resposta ao estresse por injúria (ANGELINI et al., 1990; BRADLEY et al., 1992; OLSON; VARNER, 1993). Alguns trabalhos com diversos patossistemas correlacionam o aumento da expressão das enzimas antioxidantes com a defesa de plantas a fitopatógenos e pragas (KUMAR et al., 2011; MESSIAS, 2008; HE et al., 2011).

O processo de infecção por fungos, como por exemplo o causador da fusariose do abacaxizeiro é dependente de feridas (estresse por injúria foliar) nas plantas ou de aberturas naturais como flores. Foi demonstrado que a cultivar Vitória apresenta cicatrização acelerada em relação a um cultivar susceptível Pérola (AQUIJE et al., 2010). Sendo de fundamental importância compreender a relação entre o metabolismo antioxidante e a resposta ao estresse por injúria nos cultivares de abacaxizeiro.

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E ENZIMAS ANTIOXIDANTES

O estresse ambiental representa o fator limitante mais importante para a produtividade vegetal e o rendimento de cultivos. Muitos dos processos deletérios sofridos pelas plantas submetidas a condições adversas são mediados por EROs, geradas em diferentes compartimentos celulares como consequência tanto do funcionamento defeituoso de vias metabólicas como processos fisiológicos normais. Existem diversas situações ambientais capazes de produzir estresse oxidativo, portanto a produção das EROs pode ser considerada como uma característica universal do estresse. Os fatores ambientais capazes de produzir estresse oxidativo, podem se classificar em abióticos: alta irradiância, seca, hiperoxia, hipoxia, abnóxia, deficiência mineral, baixas e altas temperaturas; bióticos: infecção bacteriana, fúngica ou viral; e

xenobióticos: herbicidas, fungicidas, contaminantes atmosféricos (SO_2 , NO , NO_2 , ozônio) e metais pesados (CARRILLO; VALLE, 2005).

As plantas submetidas a condições estressantes podem reagir a elicitores, compostos que, quando introduzidos num organismo vivo sinalizam a ativação ou a síntese de outros compostos, manifestando reações oxidativas durante as quais EROs são geradas, tais como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH). O estresse oxidativo implica em um conjunto de eventos prejudiciais à planta, onde as EROs desencadeiam reações a partir de radicais livres que, de maneira indiscriminada, atingem qualquer tipo de macromolécula alterando a funcionalidade das mesmas. O aumento na atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos pode ser uma resposta adaptativa das células ao aumento das EROs (MARTINEZ-CAYUELA, 1998; SCANDALIOS, 1993; MITTLER, 2002).

Para aliviar os danos causados pelos radicais livres e EROs, as plantas apresentam uma série de mecanismos de defesa, os quais incluem a síntese de compostos antioxidantes não-enzimáticos, como alfa-tocoferol e carotenóides, e enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APX), dentre outras (Figura 3) (ANDERSON; PRASAD, 1995; NOCTOR; FOYER, 1998).

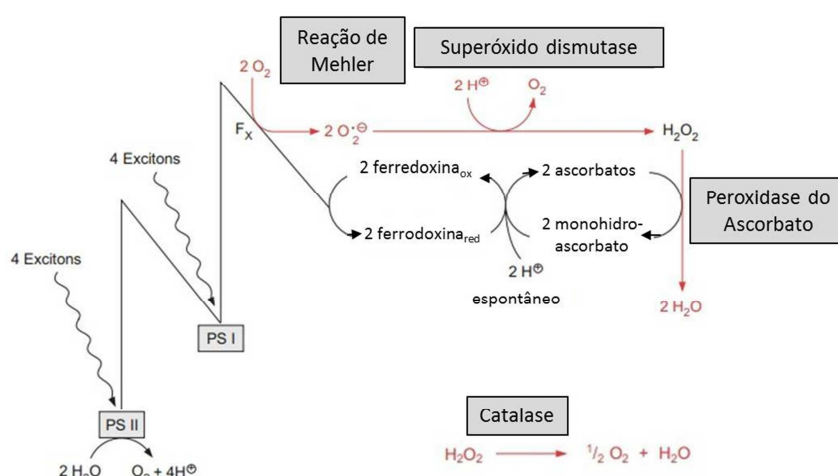


FIGURA 3. Reação das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX (HELDT, 2005).

1.5.1 GERAÇÃO DE EROs A NÍVEL SUB-CELULAR

Cada organela ou compartimento tem o potencial para ser alvo de danos oxidativos assim como de mecanismos para a eliminação de excesso de EROs. Organelas com alta atividade metabólica oxidante e alta taxa de fluxo de elétrons, tais como cloroplastos e mitocôndrias, são a maior fonte de EROs em plantas (SCANDALIOS, 2005; MITTLER et al., 2004).

Em cloroplastos existem quatro sítios metabólicos onde podem ser geradas as EROs: (1) no fotossistema I (PSI), onde pode ocorrer a redução monovalente do oxigênio pela reação de Mehler (Figura 3) quando o NADPH não é consumido no ciclo de Calvin e, portanto diminui a disponibilidade de NADP^+ , criando um ambiente redutor favorável para formação de EROs; (2) as clorofilas fotoativadas, que podem produzir O_2^- quando existe limitação da transferência de elétrons ao NADP^+ , nestas condições, a energia fotoquímica não pode ser dissipada através do sistema de transporte de elétrons e é transformada em fluorescência ou transferida a moléculas aceptoras que finalmente serão ativadas; (3) o sítio ativo do fotossistema II (PSII), que catalisa a transferência de quatro elétrons a partir da água em quatro eventos independentes de transferência de um elétron. A cooxidação de outras substâncias como álcoois, leva à redução incompleta do oxigênio e neste caso, o tipo de EROs formada será determinado pela competição entre o oxigênio e as outras substâncias cooxidadas; (4) a atividade oxigenase da Rubisco, que não gera diretamente EROs em cloroplastos, mas é ponto de início da fotorrespiração onde a adição de oxigênio ao carbono 2 da ribulose fosfato forma fosfoglicolato e fosfoglicerato. O subsequente metabolismo do glioxilato no peroxissomo é gerador de H_2O_2 (MCKERSIE, 1996; ARORA et al., 2002; LEDFORD & NIYOGI, 2005).

Na mitocôndria a maior parte do oxigênio é consumida pela citocromo oxidase e envolve uma transferência sequencial de quatro elétrons com

formação de água. O sobrecarregamento da cadeia de transporte de elétrons é a principal fonte de O_2^- em condições específicas de estresse. A mitocôndria de plantas tem um sítio adicional de redução como oxidase alternativa distinta da citocromo oxidase pela sua resistência a cianeto. No entanto, nenhum destes sítios produz quantidades significantes de EROs quando comparados com o cloroplasto (MITTLER et al., 2004, MCKERSIE, 1996).

Peroxisomos e glioxissomos são organelas de membrana simples que compartimentalizam enzimas envolvidas na beta oxidação de ácidos graxos e no ciclo do glioxilato, incluindo glicolato oxidase, catalase e várias outras peroxidases. Glicolato oxidase produz H_2O_2 em uma transferência de dois elétrons ao oxigênio. Xantina oxidase, ureato oxidase e NADH oxidase geram superóxido como consequência da oxidação dos seus respectivos substratos (MCKERSIE, 1996).

1.5.2 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Os antioxidantes não enzimáticos não oferecem proteção direta contra os radicais O_2^- ou H_2O_2 . Estes compostos primários são as maiores fontes de compostos oxidantes que são todos iniciadores de reações em cadeia. Enzimas antioxidantes específicas por sua vez têm capacidade de drenar estas espécies. A vantagem de usar enzimas implica no fato de existir uma ampla variedade de mecanismos de regulação que permitem se adaptar às necessidades celulares. Várias destas enzimas podem ser induzidas, inibidas ou ativadas por efetores endógenos (CHAUDIÈRE, 1994; CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999; HARRIS, 1992; GRATÃO et al., 2005).

A degradação de O_2^- é catalisada pela SOD, o H_2O_2 por sua vez é degradado pela CAT e peroxidases (POXs). CAT e SOD são dismutases e não requerem cofatores enzimáticos tanto que também não estão associadas a consumo energético. As peroxidases são redutases que necessitam de algum cofator doador de elétron como ascorbato ou glutatona. Estes cofatores podem

ser regenerados posteriormente por NADPH produzido em outras vias metabólicas. As principais vias de drenagem enzimática das EROs em plantas incluem SOD que é achada na reação de Mehler nos cloroplastos e em todos os compartimentos celulares; APX no ciclo ascorbato-glutationa nos cloroplastos, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissomos; e CAT nos peroxissomos (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999; MITTLER, 2002).

1.5.2.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

O radical superóxido (O_2^-) pode ser produzido em qualquer local onde esteja presente uma cadeia de transporte de elétrons e como as membranas fosfolípídicas são impermeáveis ao O_2^- é muito importante que a SOD esteja no local onde é formado (ALSCHER et al., 2002).

As SODs são um grupo de metaloproteínas multiméricas que têm sido classificadas em três grupos de acordo com o componente metálico presente em seu sítio ativo: (1) cobre/zinco (Cu/Zn-SOD); (2) manganês (Mn-SOD); ou (3) ferro (Fe-SOD), sendo as Cu/Zn-SODs consideradas as mais abundantes em vegetais. As Cu/Zn-SODs e algumas Mn-SODs e Fe-SODs de procariontes são diméricas, enquanto que as Mn-SODs das mitocôndrias e de algumas bactérias termófilas são tetraméricas. (SCANDALIOS, 1993; MALLICK; MOHN, 2000).

De maneira geral, as Cu/Zn-SODs são encontradas no citosol e no estroma dos cloroplastos. As Mn-SODs e Fe-SODs têm sido encontradas geralmente na matriz mitocondrial de células eucarióticas e em células procarióticas. A Fe-SOD foi observada em algumas famílias de plantas e está associada principalmente aos cloroplastos (HAYAKAWA et al., 1994; SEHMER; DIZENGREMEL, 1998; MALLICK; MOHN, 2000).

1.5.2.2. PEROXIDASES (POX) E PEROXIDASE DO ASCORBATO (APX)

As peroxidases (POXs) estão presentes em todos os compartimentos celulares e catalisam a transferência de elétrons ao H_2O_2 usando diferentes substratos reduzidos como doadores. As POXs de plantas aumentam em resposta a vários estresses bióticos e abióticos, participam no catabolismo de auxinas e em processos de síntese de parede celular como a oxidação de fenóis, suberização e lignificação em plantas hospedeiras durante a reação de defesa contra patógenos. O aumento de POXs tem sido correlacionado com mecanismos de resistência em um grande número de interações plantas-microorganismos (SYROS et al., 2004; MOHAMMADI & KAZEMI, 2002).

A atividade de POX é aumentada frequentemente em resposta a hormônios relacionados com estresse, tais como ácido abscísico e etileno. Paraquat, um herbicida gerador de estresse oxidativo, induz também este tipo de enzimas (KWAK et al., 1996). Caminhos metabólicos demonstrados anteriormente incluem peroxidases de funções específicas na desintoxicação de EROs e dentre as peroxidases mais importantes está a APX.

A APX é uma enzima presente em quase todos os compartimentos celulares, faz parte de duas vias metabólicas que agem na desintoxicação de H_2O_2 , a reação de Mehler e o ciclo da ascorbato-glutationa. O ciclo da ascorbato-glutationa é encontrado em quase todos os compartimentos celulares. O ascorbato reduz o H_2O_2 à água pela APX e o produto monodeidroascorbato (MDA) formado, volta a se reduzir a ascorbato por três vias: a primeira é por causa da dismutação espontânea que sofre o MDA que produz ascorbato e deidroascorbato (DHA); na segunda via, o MDA é reduzido enzimaticamente pela monodeidroascorbato redutase (MDAR); numa terceira via, o DHA formado da primeira via é reduzido a ascorbato pela deidroascorbato redutase, que utiliza glutatona como agente redutor (RIZHSKY et al., 2003; MITTLER, 2002).

Na reação de Mehler também tem participação da APX, porém em uma via diferente que está localizada no cloroplasto e atua como parte do metabolismo da fase fotoquímica da fotossíntese (Figura 3). O O_2^- formado pela transferência de um elétron do PSI para o O_2 , é dismutado em H_2O_2 e O_2 pela SOD e seguidamente o H_2O_2 é eliminado pela APX. O ciclo água-água utiliza elétrons da ferredoxina para regenerar ascorbato, portanto não tem consumo de NADPH nesta via metabólica (MITTLER, 2002).

1.5.2.3 CATALASE (CAT)

A CAT é uma enzima que elimina H_2O_2 através de uma dismutação bivalente em que H_2O_2 é transformado em O_2 e H_2O . Alternativamente, as calatases em condições de baixa concentração de H_2O_2 podem usar outros doadores de elétrons como metanol, etanol, formaldeído, ácido fórmico, ascorbato e fenóis. Dados cinéticos sugerem que a CAT mitocondrial é mais eficiente como peroxidase, enquanto a CAT do peroxissomo é mais eficiente como dismutase (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

Esta é uma enzima tetramérica que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. Nas plantas existem pelo menos três tipos de CATs distintas, que diferem em termos de localização e regulação biossintética: (1) aquelas presentes em sistemas fotossintéticos e que têm funções de eliminação de H_2O_2 durante a fotorrespiração; (2) produzidas pelo tecido vascular que tem papel na lignificação; e (3) abundantes em sementes e plantas novas e sua atividade é relacionada com a remoção do excesso de H_2O_2 produzido pela degradação de ácidos graxos no ciclo do glioxilato nos glioxisômos (SCANDALIOS et al., 1997; VAN BREUSEGEM et al., 2001).

As evidências sugerem que a CAT utiliza um mecanismo de dois estágios tanto nas reações peroxidativas como nas catalíticas. No primeiro estágio o ferro do grupo heme da CAT interage com o H_2O_2 para formar um peróxido de ferro rico em oxigênio. Este composto intermediário é denominado

componente I. A baixas concentrações de H_2O_2 ($<10^{-6}$ M), o componente I pode ser reduzido por uma variedade de doadores de hidrogênio (por exemplo, etanol ou ácido ascórbico). Com elevadas concentrações de H_2O_2 , o componente I reage com uma segunda molécula de H_2O_2 para produzir água e uma molécula de oxigênio (SCANDALIOS, 1994).

Tendo em vista que os estresses oxidativo e mecânico estão relacionados aos estresses bióticos (fitopatógenos e pragas) que causam danos a diversas culturas agrícolas acredita-se que haja expressão diferencial de enzimas que atuam no estresse oxidativo em plantas de abacaxizeiro que apresentam potencial de infecção à fusariose (plantas com injúria – estresse mecânico). Por esta razão o estudo do metabolismo de defesa do abacaxizeiro é de fundamental interesse para o agronegócio, e para a ciência básica, sendo estas metodologias um potencial para a detecção, com possíveis marcadores bioquímicos, na seleção de novas cultivares com resistência à doença, acelerando assim a pesquisa e desenvolvimento desta área.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a resposta diferencial ao estresse oxidativo gerado pela injúria foliar entre duas cultivares de abacaxizeiro, Vitória, resistente, e Pérola, susceptível à fusariose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração de proteínas solúveis totais das duas cultivares, Vitória e Pérola, com e sem injúria foliar;
- Quantificar e comparar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1), catalase (CAT – EC 1.11.1.6) e peroxidase do ascorbato (APX – EC 1.11.1.11) após o tratamento de injúria foliar em diferentes tempos;
- Caracterizar os perfis das proteínas solúveis totais e das isoenzimas de SOD e CAT em SDS-PAGE nos tempos em que houver melhor resposta.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL VEGETAL

As plantas de abacaxizeiro das cultivares Vitória e Pérola (Figura 4) foram obtidas na Fazenda Experimental de Sooretama, do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper), localizada no município de Sooretama, no Estado do Espírito Santo. As mudas foram cultivadas em vasos contendo uma mistura de terra orgânica e areia (2:1, v/v), irrigadas 3 vez por semana e cultivadas para aclimação em casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Vitória.

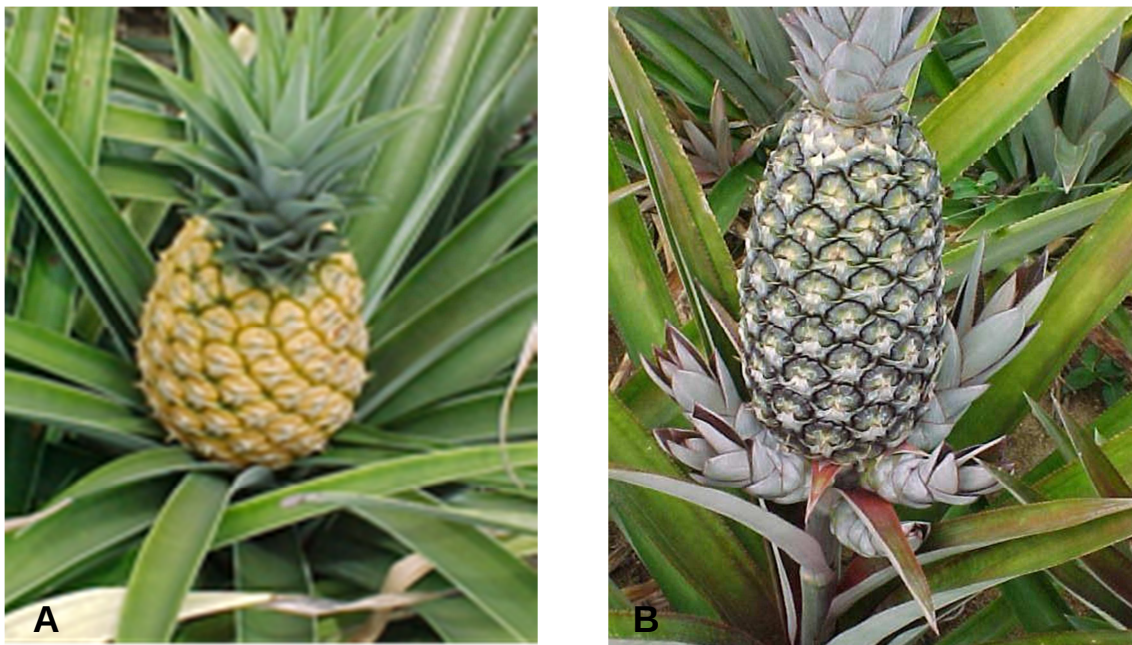


FIGURA 4. Frutos de abacaxi das cultivares Vitória (A) e Pérola (B), produzidos na Fazenda Experimental de Sooretama-ES (Fonte: VENTURA et al., 2009).

3.2 PROSPECÇÃO DO TEMPO DE RESPOSTA DAS ENZIMAS À INJÚRIA FOLIAR

Para todos os testes realizados durante este estudo foram utilizadas a porção basal, caracteristicamente aclorofilada, das folhas D do abacaxizeiro, originárias de plantas entre 4 e 6 meses de idade, sendo estas folhas as mais jovens entre as folhas adultas e as mais ativas fisiologicamente entre todas as folhas. As análises foram realizadas em triplicatas com três repetições.

Os experimentos foram realizados *in vitro*, em seções foliares com cerca de 10 cm, contando-se a partir da parte basal aclorofilada. As folhas foram limpas, sanitizadas com hipoclorito de sódio 1,5% e colocadas dentro de placas de Petri esterilizadas por autoclavagem. Para o tratamento de injúria foram realizados ferimentos com 15 agulhas entomológicas, esterilizadas, unidas a cerca de 3 cm a partir da base foliar.

As folhas tratadas foram colocadas dentro de caixas Gerbox de acrílico (11 x 11 x 3,5 cm) com fundo coberto por papel filtro umificado com 5mL de água destilada esterilizada. As avaliações foram realizadas após os tempos (min): 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O extrato vegetal foi obtido a partir da trituração, em almofariz com pistilo, de 200 mg de folhas frescas de abacaxizeiro em N₂ líquido e em presença de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0 contendo 1 mM de EDTA, 1 mM de PMSF e 1% de PVP, na proporção de 1:5 (tecido:tampão). O homogenato foi centrifugado a 15000xg, a 4°C por 15 min (COSTA et al., 2005; AMAKO et al.,

1994). O sobrenadante coletado foi estocado em freezer -80°C até o momento em que os ensaios enzimáticos foram realizados.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para quantificação de proteínas foi utilizado o método de Bradford, em que as mesmas são determinadas a partir da ligação de aminoácidos com *coomassie brilliant blue G-250* e os métodos foram calibrados utilizando uma curva padrão feita com albumina de soro bovino (BSA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm em espectrofotômetro e o resultado expresso em μg proteínas mg^{-1} de massa foliar (MF) (BRADFORD, 1976).

3.5 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1) foi determinada tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio (NBT -nitrobluetetrazolium) por radicais superóxido. Para isto foi utilizado nas determinações o tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), metionina, NBT, riboflavina e EDTA em tubos de ensaio de vidro de 5 mL. Estes foram expostos a forte incidência luminosa dentro de uma câmara de fotorredução, com luz fluorescente de 25 Watts, por 10 minutos a 10 centímetros da fonte luminosa. No ensaio, uma unidade enzimática (U) da atividade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% da inibição da razão de redução de NBT. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm e a atividade da SOD foi expressa em Unidade SOD mg^{-1} proteína (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977; GUPTA et al., 1993).

3.6 ATIVIDADE DA PEROXIDASE DO ASCORBATO (APX)

A incubação para estudo da atividade enzimática da peroxidase do ascorbato (APX – EC 1.11.1.11) deu-se através de uma reação com água destilada, tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e ácido ascórbico 10 mM em tubo de ensaios, à temperatura de 28 °C. Adicionou-se H₂O₂ e o extrato enzimático, e a leitura foi realizada por 5 min, com registro a cada 10 segundos em espectrofotômetro à 290 nm a temperatura ambiente. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do ascorbato (2,8 mmol L⁻¹ cm⁻¹) e o resultado expresso em µmol ascorbato min⁻¹mg⁻¹ proteína, (NAKANO; ASADA, 1981).

3.7 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade de catalase (CAT – EC 1.11.1.6) foi determinada após a reação do extrato bruto com peróxido de hidrogênio na presença de solução de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e água destilada. A temperatura foi mantida constante a 28 °C, por imersão das amostras em banho-maria. A absorbância foi monitorada por 5 min, em intervalos de 10 segundos, em espectrofotômetro (240 nm) à temperatura ambiente. A atividade da CAT foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de H₂O₂ (36 mmol L⁻¹ cm⁻¹) e expressa em µmol H₂O₂ min⁻¹mg⁻¹ proteína (HAVIR; MCHALE, 1989; ANDERSON et al., 1995; FERREIRA et al., 2002).

3.8 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS PARA ELETROFORESE

O extrato vegetal foi obtido a partir da trituração de 200 mg de folhas frescas em N₂ líquido e em presença de tampão Tris HCl 10 mM, pH 7,5 contendo 250 mM de sacarose, 10 mM de EDTA, 1 mM de PMSF, 1 mM DTT, 1 % Triton X-100 e 1% de PVP na proporção de 1:5 (tecido:tampão). O homogenato ficou por 2 horas em agitação à temperatura de 4°C, para a diluição de proteínas no meio líquido. Após, esse material foi centrifugado a 15000xg, a 4°C por 15 min. O sobrenadante coletado foi estocado em freezer -80°C até as análises eletroforéticas (SHEN et al., 2003).

3.9 SDS-PAGE E PERFIL ISOENZIMÁTICO DE SOD E CAT

Os materiais protéicos obtidos anteriormente foram submetidos à eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) utilizando-se o sistema mini-gel vertical (7 x 10 cm). O gel de separação foi efetuado com 12% de acrilamida bis-acrilamida. O tamanho do gel foi de dez centímetros, com espessura de um milímetro. A corrida foi realizada em voltagem constante de 100 v. Os géis foram corados com *coomassie brilliant blue G-250*, sendo que a quantidade de proteínas aplicadas em cada poço foi de 40 µg. Os marcadores de peso molecular foram: fosforilase b 97 kDa, albumina 66 kDa, ovalbumina 45 kDa, anidrase carbônica 30 kDa, inibidor de tripsina 20 kDa, α-lactalbumina 14 kDa (Amersham Biosciences, Suécia) (LAEMMLI, 1970). Para a identificação dos perfis isoenzimáticos de SOD e CAT utilizou-se padrões de SOD e CAT de fígado bovino. Os géis foram escaneados com LabScan software e analisados com ImageMaster 2D Platinum software (Amersham Biosciences, Suécia).

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) e 3 repetições. Foi usado o software Prisma 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) com utilização de média e desvio padrão para as barras e o cálculo dos erros. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados por testes de média com nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (SILVA; AZEVEDO, 2009). Cada tratamento foi constituído por duas folhas e repetido três vezes.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A quantificação de proteínas solúveis totais foi realizada para determinar a especificidade das atividades enzimáticas. Para tanto foi utilizado tampão fosfato de potássio, que se mostrou eficiente para a quantificação da atividade enzimática como demonstrado a seguir. A mesma quantidade de amostra foliar foi utilizada para a extração das proteínas totais. As folhas foram submetidas aos tratamentos por injúria e os tempos analisados foram 0,15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos após o tratamento. A dosagem foi realizada pelo método de Bradford (1976) e expresso em μg proteínas mg^{-1} de MF (massa foliar).

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na quantidade de proteínas solúveis entre tratamento e controle ou entre as cultivares (Figura 5). É sabido que em diversas plantas, em até 24 horas após tratamento de injúria foliar, não ocorre variação significativa na quantificação de proteínas totais expressas (DAFOE et al., 2009; SHEN et al., 2003). A diferença nas enzimas e proteínas expressas especificamente após os tratamentos propostos não são percebidas quando se quantifica as proteínas solúveis totais.

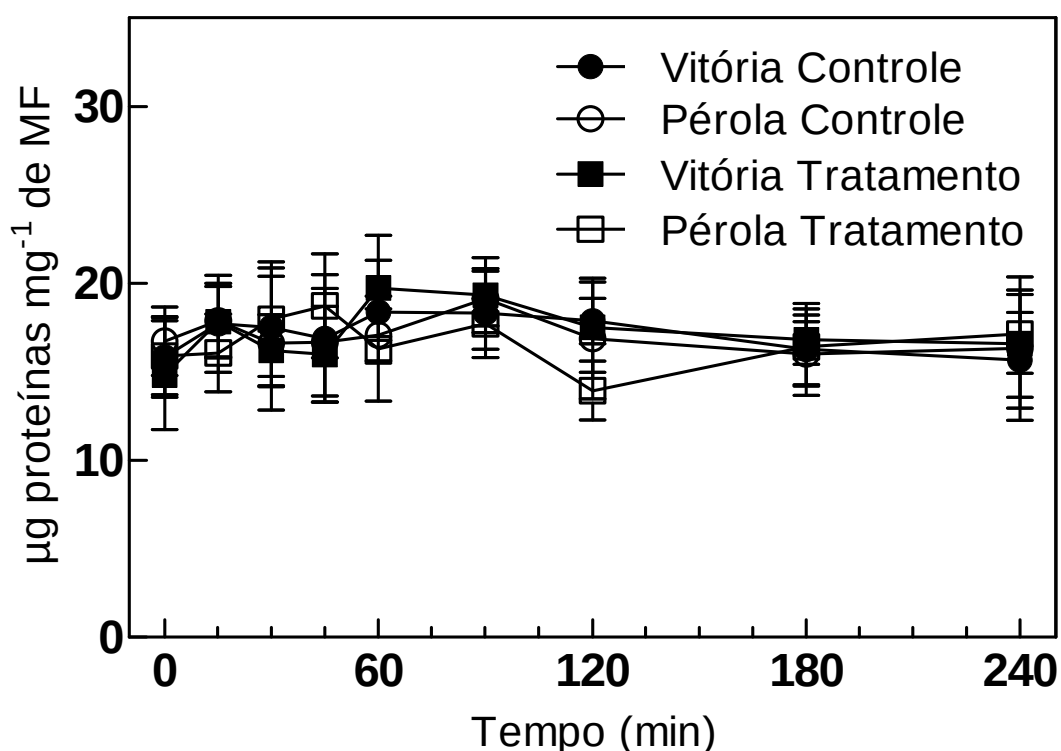


FIGURA 5. CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS APÓS INJÚRIA FOLIAR

Quantificação de proteínas de folhas de abacaxizeiro submetidas a tratamento por injúria foliar das cultivares Vitória (-■-) e Pérola (-□-) assim como seus respectivos controles não tratados (Vitória -●- e Pérola -○-) pelo método de Bradford (1976) e expresso em μg proteínas mg^{-1} de MF (massa foliar).

4.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Estudos da resposta antioxidante têm como objetivo primário propor ferramentas para a compreensão de como o ambiente afeta um dado organismo. A resposta oxidativa é tida como uma condição biológica universal em plantas submetidas a estresse. Ou seja, independente do estresse ao qual o vegetal é submetido ocorre um desequilíbrio entre a produção de EROs e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam, ou reparem os danos por elas causados. Diferentes organismos apresentam diferenças entre estas formas como respondem a esse desequilíbrio. Porém, a

diversidade de respostas é muito maior que as circunstâncias, ou mecanismos, que as produzem, tornando assim quase impossível determinar um padrão de comportamento geral sem mais estudos (MOLDES, 2006; CARRILLO; VALLE, 2005).

4.2.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade enzimática de SOD foi quantificada nas duas cultivares de abacaxizeiro, Vitória e Pérola, nos tempos de 0,15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos após o tratamento, com três repetições. Levando em conta apenas os tratamentos, já que não houve diferença entre os controles, é visível, e relevante, a diferença entre as cultivares de abacaxizeiro principalmente como resposta rápida ao estresse oxidativo, aos 15 min (Figura 6). As enzimas da cultivar Vitória apresentam maior atividade que as da Pérola em todos os tempos analisados porém aos 15 minutos é detectado um pico da atividade em relação aos outros tempos e à cultivar Pérola.

SOD é a primeira enzima de defesa contra os danos provocados pelas EROs, considerados o mecanismo central. A SOD catalisa a formação do H_2O_2 a partir de radicais O_2^- . Plantas com elevadas atividades de SOD aumentam a tolerância ao estresse oxidativo (GRATÃO et al., 2005). Como a SOD é primeira resposta ao estresse oxidativo, há uma elevada produção de H_2O_2 que por sua vez atua diretamente contra o elicitador causador deste desequilíbrio, patógeno ou praga, por exemplo, ou como sinalizadores para processos de lignificação e, conseqüentemente, recuperação da parede celular rompida (BRADLEY et al., 1992).

Este resultado demonstra que ao primeiro sinal de alteração do fluxo normal da célula, induzido neste caso pelo estresse por injúria, ocorre uma rápida resposta pelo aparato enzimático na cultivar Vitória. Levando em consideração que a cultivar Pérola não apresenta resistência à fusariose, em contraponto à Vitória, podemos inferir que existe uma relação direta entre a

resposta antioxidante da SOD e a resistência à fusariose. Além disso, pode-se relacionar ainda o fato do H_2O_2 gerado atuar como sinalização para respostas de defesa, por ser um oxidante relativamente estável e ausente de carga, o que pode facilitar a passagem através da camada bilipídica da membrana celular. Essa capacidade de difundir-se rapidamente através da membrana celular favorece a rápida eliciação da resposta vegetal (APOSTOL et al., 1989; ALVAREZ et al., 1998; STAKAWICZ et al., 1995).

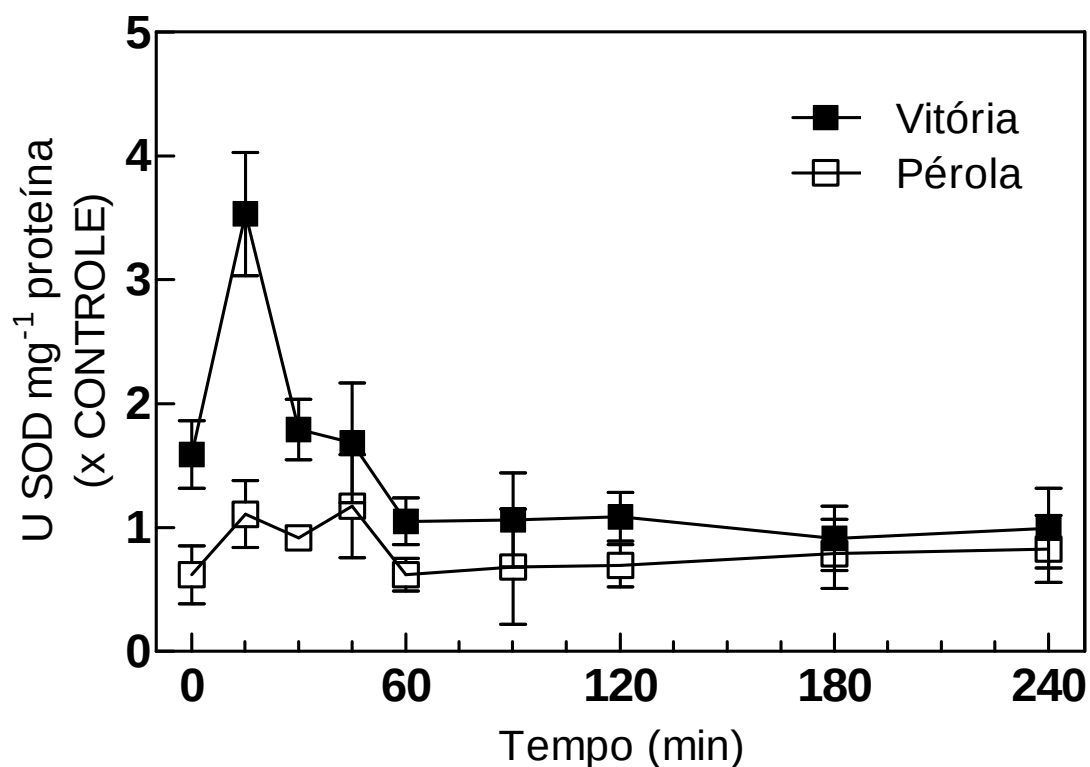


FIGURA 6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SOD

Atividade da enzima SOD nas folhas de abacaxizeiro submetidas a tratamento por injúria foliar das cultivares Vitória (-■-) e Pérola (-□-) em relação às médias dos controles e expresso em U SOD mg⁻¹ proteína

4.2.2 PEROXIDASE DO ASCORBATO (APX)

A atividade enzimática de APX mostrou relevante diferença entre as cultivares principalmente como resposta rápida ao estresse oxidativo, com o aumento de sua atividade aos 30 e 45 minutos na cultivar Vitória, porém após 60 minutos há uma queda da atividade desta enzima (Figura 7). A atividade de APX foi quantificada nas duas cultivares, Vitória e Pérola nos tempos de 0,15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos após o tratamento, amostras em triplicata. Como não houve diferença entre os controles considerou-se apenas os tratamentos, sendo expressos em relação ao controle.

A APX é uma das primeiras enzimas a ter sua atividade aumentada durante a remoção do H_2O_2 e proteção contra danos oxidativos (ASADA, 2006). Por ser predominantemente citosólica e organelar, a APX tem maior participação inicial na eliminação de H_2O_2 produzido pela SOD, logo após a primeira resposta ao estresse. Além disso, é uma enzima que atua rapidamente por apresentar alta afinidade ao H_2O_2 , e assim, numa baixa concentração deste oxidante já é ativada (NAKANO; ASADA, 1981, MANO et al., 2001; FOYER; NOCTOR, 2005)

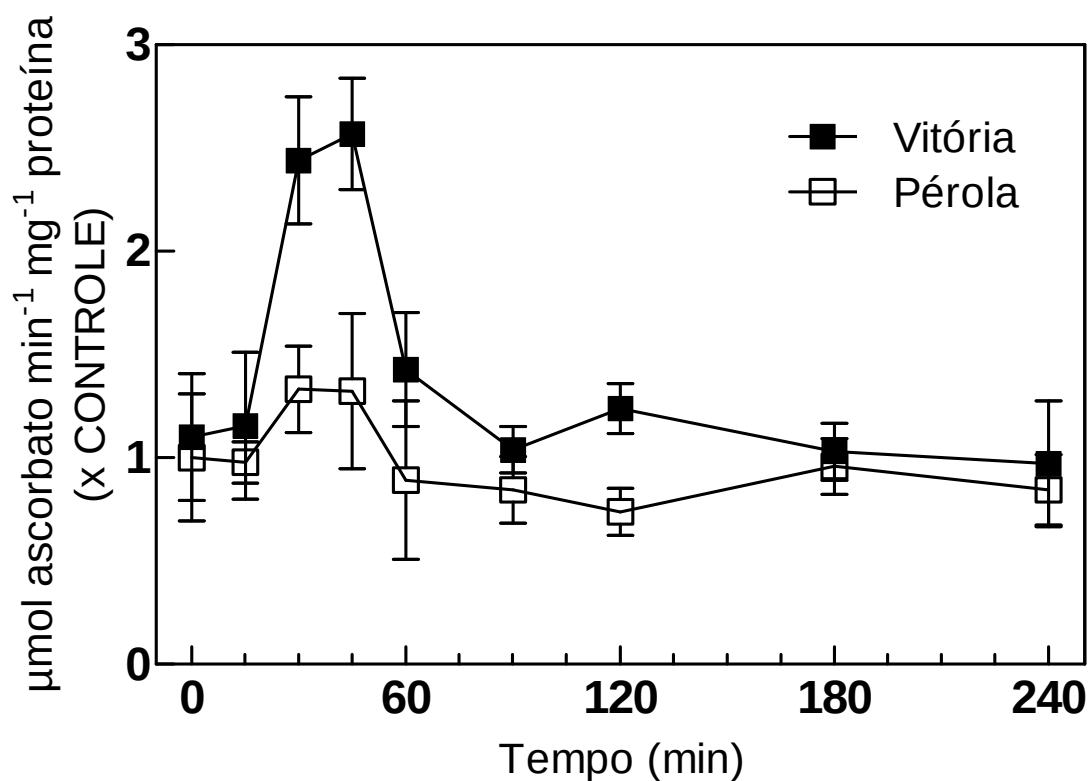


FIGURA 7. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE APX

Atividade da enzima APX nas folhas de abacaxizeiro submetidas a tratamento por injúria foliar das cultivares Vitória (-■-) e Pérola (-□-) em relação às médias dos controles e expresso em $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ proteína}$.

4.2.3 CATALASE (CAT)

A atividade enzimática de CAT foi caracterizada nos tempos de 0,15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos após o tratamento, com três repetições. Como não houve diferença entre os controles o resultado dos tratamentos para os dois cultivares foi expresso em relação ao controle. O resultado obtido mostrou relevante diferença entre as cultivares principalmente como resposta rápida ao estresse oxidativo, aos 45 min (Figura 8). As enzimas da cultivar Vitória apresentam um pico de atividade aos 45 minutos e partir dos 60 minutos apresentam atividade maior que as da cultivar Pérola.

As CAT consomem H_2O_2 , com conversão em H_2O e O_2 , nos peroxissomos. Essas enzimas possuem atuação extremamente elevada, porém baixa afinidade ao substrato (WILLEKENS et al., 1994). A produção elevada de H_2O_2 após injúria foliar induz a alta atividade e expressão de CAT (OROZCO-CARDENAS; RYAN, 1999).

As reações de CAT tornam-se mais importantes quando a concentração de H_2O_2 é mais alta, pois, em concentração normal de H_2O_2 , este é reduzido por APX e outras peroxidases. A presença e atividade de CAT, aos 45 minutos, após a atividade de SOD e APX, estão relacionadas com a quantidade de H_2O_2 formada, pois a quantidade não foi suficiente para a enzima CAT agir imediatamente, ou porque H_2O_2 foi degradado parcialmente pela APX e outras enzimas (RICE-EVANS et al. 1991). A localização e a baixa afinidade justificam o fato de esta ser a enzima que apresenta a resposta mais lenta entre as três mostradas neste estudo.

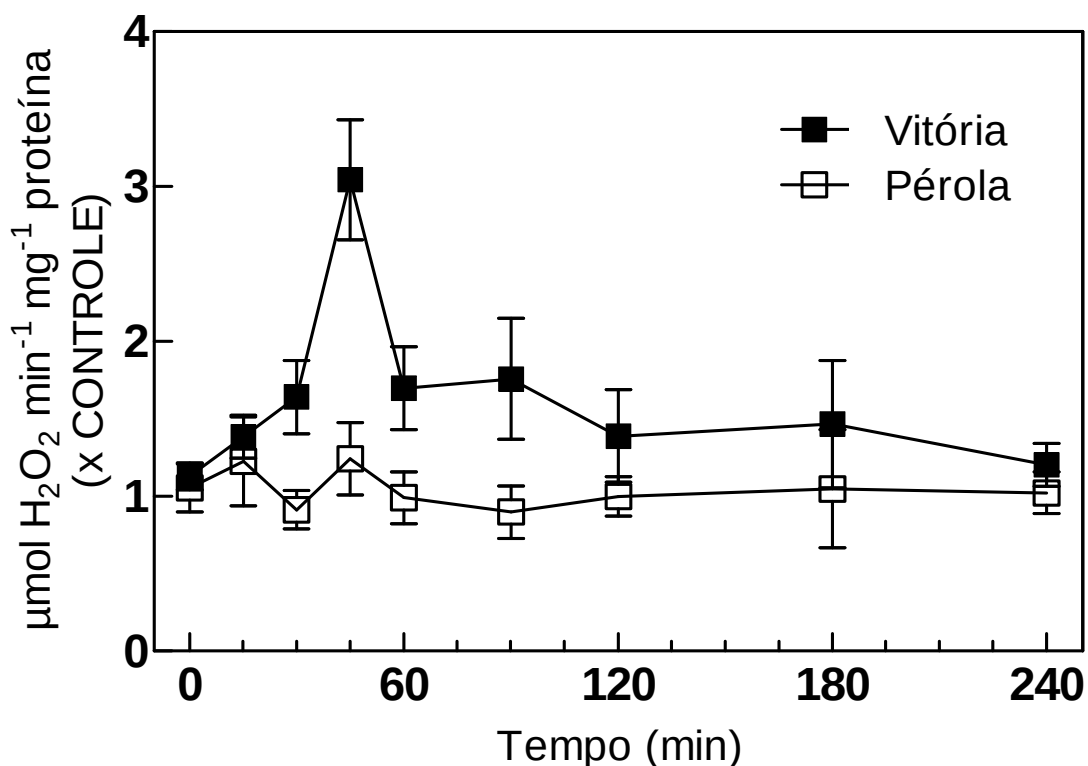


FIGURA 8. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CAT

Atividade da enzima CAT nas folhas de abacaxizeiro submetidas a tratamento por injúria foliar das cultivares Vitória (-■-) e Pérola (-□-) em relação às médias dos controles e expresso em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$.

Os dados sugerem que os aumentos em paralelo das atividades das enzimas SOD, APX e CAT, após a injúria foliar sejam em resposta de proteção às organelas cloroplasto e peroxissomos. Sendo assim, a cultivar susceptível, Pérola, se mantém sem mudanças das taxa de enzimas antioxidantes, enquanto a resistente, Vitória, caracteriza-se por alterar os parâmetros bioquímicos medidos, o que demonstra uma resposta mais intensa e rápida que produz um retorno ao equilíbrio metabólico alterado pelo estresse por injúria (Figura 9).

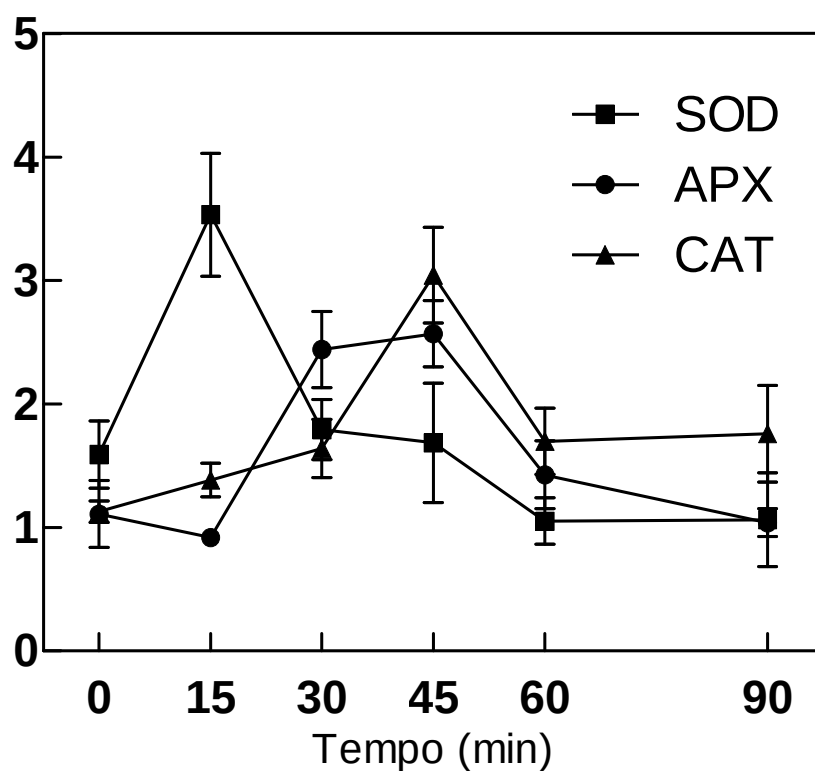


FIGURA 9. ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA CULTIVAR VITÒRIA

Atividade das enzimas SOD (-■-), APX (-●-) e CAT (-▲-) nas folhas de abacaxizeiro submetidas a tratamento por injúria foliar da cultivare Vitória em relação às médias dos controles.

4.3 PERFIL ELETROFORÉTICO

A partir das quantificações da atividade enzimática foi determinado que para as análises eletroforética os melhores tempos para inferência dos perfis proteícos foram 15, 30 e 45 minutos (Figura 9).

Aos 15 minutos temos que sutilmente é visualizada na parte inferior do gel em todos os tratamentos a expressão de proteínas (Figura 10). Esta região inferior do gel pode ser compreendida como SOD, tal qual demonstrado nos padrões. Nos géis vemos para o padrão de amostra (PA) temos 6 bandas, com tamanhos entre 14 e 97 kDa. Os padrões de SOD e CAT apresentam uma banda cada, para SOD temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 14 e 20 kDa, e para CAT temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 45 e 66 kDa. As amostras das cultivares Vitória (Vt, tratamento, e Vc, controle) e Pérola (Pt, tratamento, e Pc, controle) apresentam bandas abaixo de 20 kDa, tal qual o padrão de SOD, e não apresentam diferenças entre si.

Neste tempo, as proteínas estão numa concentração homogênea e em baixa resolução. E apesar da massa de proteínas serem a mesma em todas as amostras, não é possível a visualização da SOD, como esperado pelo resultado da atividade enzimática (Figura 6). Um ponto importante é que aos 15 minutos há pouca diferença entre as proteínas totais e as enzimas estudadas o que sugere que mesmo sendo detectada a atividade enzimática diferencial (em um experimento específico para o mesmo) não é possível diferenciar a concentração da SOD em meio às proteínas solúveis totais.

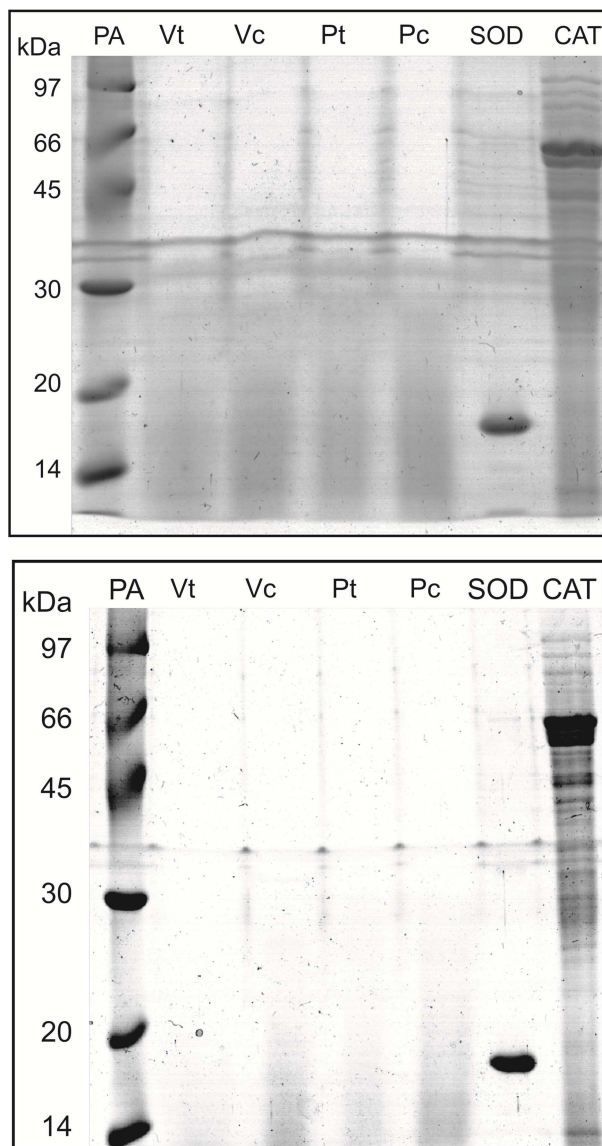


FIGURA 10. PERFIL DE PROTEÍNAS TOTAIS EM SDS-PAGE AOS 15 MINUTOS

Perfil de proteínas totais em SDS-PAGE e padrões de CAT e SOD aos 15 minutos (repetições A e B) após injúria foliar e controle. As amostras das canaletas visualizadas são de padrão de amostra (PA), Vitória tratamento (Vt) e controle (Vc), Pérola tratamento (Pt) e controle (Pc), padrão de superóxido dismutase (SOD) e padrão de catalase (CAT). Para o padrão de amostra temos 6 bandas, com tamanhos entre 14 e 97 kDa. Os padrões de SOD e CAT apresentam uma banda cada, para SOD temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 14 e 20 kDa, e para CAT temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 45 e 66 kDa. As amostras Vt, Vc, Pt e Pc apresentam bandas abaixo de 20 kDa, tal qual o padrão de SOD, e não apresentam diferenças entre si.

Já aos 30 minutos temos uma melhor visualização da expressão de proteínas da parte inferior do gel em todos os tratamentos. Esta região inferior do gel pode ser compreendida como SOD, tal qual demonstrado nos padrões, e

para Vitória tratamento (Vt) é possível detectar uma expressão diferencial de CAT (Figura 11). Para o padrão de amostra novamente temos seis bandas, com tamanhos entre 14 e 97 kDa e os padrões de SOD e CAT apresentam uma banda cada, para SOD temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 14 e 20 kDa, e para CAT temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 45 e 66 kDa. As amostras Vt, Vc, Pt e Pc apresentam bandas a partir de 30 kDa e abaixo de 20 kDa, tal qual o padrão de SOD. As amostras Vt e Vc apresentam bandas em 30 kDa, em contraste com Pt e Pc e Vt apresenta uma banda entre 45 e 66 kDa, na altura da CAT.

As proteínas solúveis totais expressas se apresentam mais heterogêneas, com uma boa visualização da SOD, porém sem diferença entre os tratamentos e as cultivares. Há uma banda relativa à CAT que se destaca entre os cultivares tratados, sendo vista apenas para Vitória, a cultivar resistente. O que demonstra o início da diferenciação entre as cultivares aos 30 min, que é vista na atividade diferencial aos 45 min na cultivar Vitória.

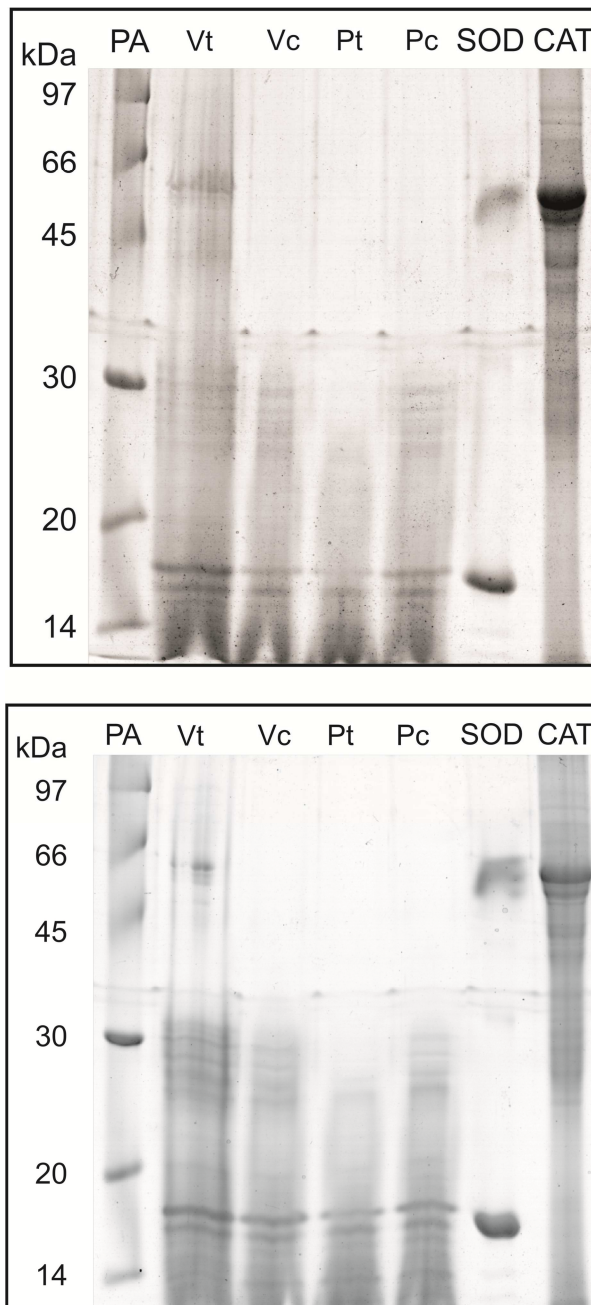


FIGURA 11. PERFIL DE PROTEÍNAS TOTAIS EM SDS-PAGE AOS 30 MINUTOS

Perfil de proteínas totais em SDS-PAGE e padrões de CAT e SOD aos 30 minutos (repetições A e B) após injúria foliar e controle. As amostras das canaletas visualizadas são de padrão de amostra (PA), Vitória tratamento (Vt) e controle (Vc), Pérola tratamento (Pt) e controle (Pc), padrão de superóxido dismutase (SOD) e padrão de catalase (CAT). Para o padrão de amostra temos 6 bandas, com tamanhos entre 14 e 97 kDa. Os padrões de SOD e CAT apresentam uma banda cada, para SOD temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 14 e 20 kDa, e para CAT temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 45 e 66 kDa. As amostras Vt, Vc, Pt e Pc apresentam bandas a partir de 30 kDa e abaixo de 20 kDa, tal qual o padrão de SOD. As amostras Vt e Vc apresentam bandas em 30 kDa, em contraste com Pt e Pc e Vt apresenta uma banda entre 45 e 66 kDa, na altura da CAT.

Aos 45 minutos temos a melhor visualização da expressão de proteínas de todo o gel em todos os tratamentos (Figura 12). É visível que as proteínas totais estão expressas de formas mais heterogênea com destaque para a expressão de CAT e SOD. Não há diferença entre as cultivares e entre os tratamentos. O que sugere que a concentração das enzimas não está diretamente ligada à atividade específica, demonstrado anteriormente.

Para o padrão de amostra temos seis bandas, com tamanhos entre 14 e 97 kDa. Os padrões de SOD e CAT apresentam uma banda cada, para SOD temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 14 e 20 kDa, e para CAT temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 45 e 66 kDa. As amostras Vt, Vc, Pt e Pc apresentam bandas entre 45 e 66 kDa, equivalente à banda do padrão de CAT e e abaixo de 20 kDa, tal qual o padrão de SOD. Não é possível detectar diferenças entre as proteínas expressas em cada amostra.

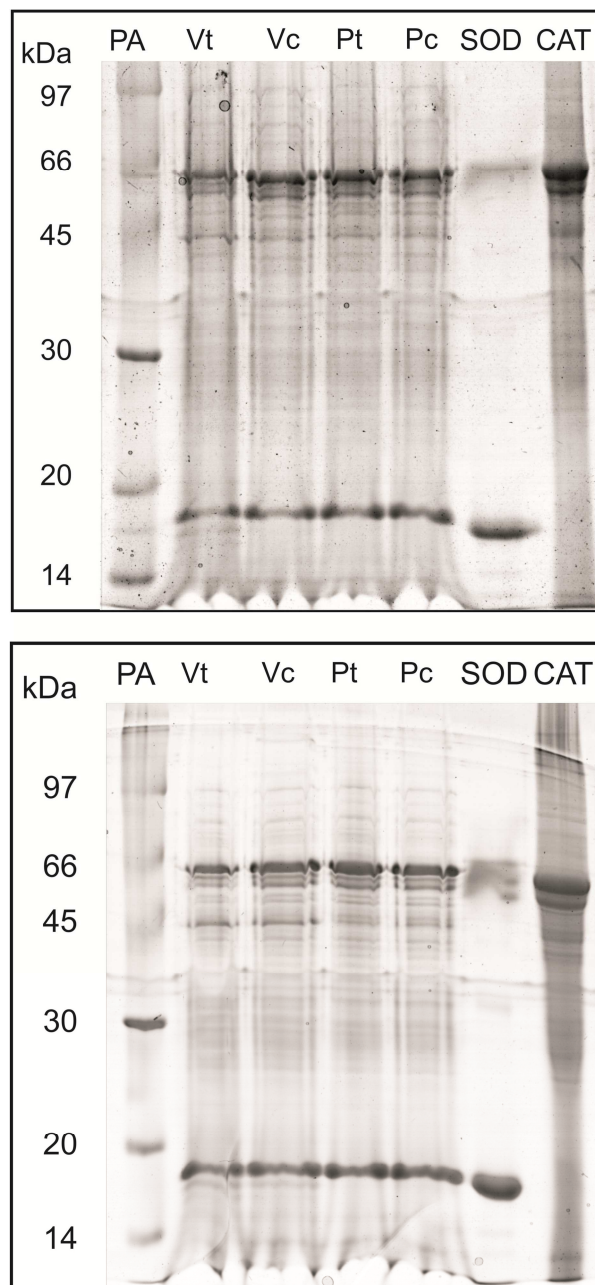


FIGURA 12. PERFIL DE PROTEÍNAS TOTAIS EM SDS-PAGE AOS 45 MINUTOS

Perfil de proteínas totais em SDS-PAGE e padrões de CAT e SOD aos 45 minutos (repetições A e B) após injúria foliar e controle. As amostras das canaletas visualizadas são de padrão de amostra (PA), Vitória tratamento (Vt) e controle (Vc), Pérola tratamento (Pt) e controle (Pc), padrão de superóxido dismutase (SOD) e padrão de catalase (CAT). Para o padrão de amostra temos 6 bandas, com tamanhos entre 14 e 97 kDa. Os padrões de SOD e CAT apresentam uma banda cada, para SOD temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 14 e 20 kDa, e para CAT temos uma banda que se localiza entre os padrões de amostra de 45 e 66 kDa. As amostras Vt, Vc, Pt e Pc apresentam bandas entre 45 e 66 kDa, equivalente à banda do padrão de CAT e e abaixo de 20 kDa, tal qual o padrão de SOD. Não é possível detectar diferenças entre as proteínas expressas em cada amostra.

O experimento foi realizado *in vitro*, ou seja, as folhas foram destacadas das plantas. Sendo assim, além do estresse causado pela injúria foliar, existe o estresse em todas as amostras, causada pelo destacamento das folhas. O resultado visualizado aos 45 minutos sugere que, todas as folhas, tratadas ou não, nas duas cultivares, não apresentam diferença quanto a concentração das enzimas frente ao tratamento ou no controle.

As enzimas antioxidantes atuam rapidamente frente à geração de EROs primários, como O_2^- e H_2O_2 , não havendo outras vias que possam ser utilizadas de maneira direta. Portanto, aminoácidos e outros compostos antioxidantes, não enzimáticos, podem aumentar os seus teores para agir frente a um dano já produzido, mas não poderiam prevenir completamente os danos oxidativos (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999). Tendo em vista que apenas a CAT da cultivar Vitória, aos 30 min, apresentou diferente expressão e para todos os outros casos não foi visível a diferença na expressão de enzimas antioxidantes entre o controle e o tratamento nas duas cultivares, indica que existe uma reação frente ao ataque oxidativo proveniente do tratamento ser *in vitro*, porém sugere-se que fatores como reguladores e sinalizadores atuem no controle dessas enzimas em resposta à injúria foliar.

5 CONCLUSÕES

- A cultivar resistente à fusariose (Vitória), há uma correlação entre a atividade de enzimas antioxidantes e resposta à injúria foliar, que é a porta de entrada para o patógeno. Sendo esta uma resposta rápida ou explosão oxidativa.
- A enzima SOD apresentou resposta mais rápida ao estresse de injúria foliar na cultivar resistente à fusariose, confirmando assim seu papel como enzima pioneira e, assim, foco para estudos futuros.
- A enzima APX mostrou-se como resposta fundamental para o controle do excesso de H_2O_2 gerado pela atuação da SOD.
- A enzima CAT, por ser a última a responder ao estresse submetido, confirma seu papel como enzima com baixa afinidade e com resposta mais lenta.
- O estudo da atividade de enzimas antioxidantes mostrou-se importante para a compreensão de como ocorre a resposta ao estresse de injúria foliar.
- Por não ser detectável uma diferença na expressão das enzimas estudadas pode-se afirmar que a atividade das enzimas SOD e APX não está relacionada à concentração das mesmas.
- Em CAT, aos 30 min vemos o início de uma diferenciação na expressão da enzima da cultivar Vitória.
- Sugere-se que os reguladores dessas enzimas apresentem fundamental importância nos mecanismos de resposta das enzimas antioxidantes SOD, APX e CAT.

6 REFERÊNCIAS

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, May. 2002.

ALVAREZ, M.E.; PENNELL, R.I.; MEIJER, P.J.; ISHIKAWA, A.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. **Cell**, Cambridge, v. 92, p. 1-20, 1998.

AMAKO, K.; CHEN, G.X.; ASADA, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiol.** 35(3): 497-504. 1994

ANDERSON, D; PRASAD, K; STEWART, R. Changes in isozyme Profiles of catalase, peroxidase and Glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, 109: 1247 – 1257. 1995.

ANGELINI, R.; MANES, F.; FEDERICO, R. Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. **Planta** 182, 89–96. 1990.

APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P. F.; LOW, P. S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, p. 109-116, 1989.

AQUIJE, G.M.F.V.; ZORZAL, P.B.; BUSS, D.S.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B.; FERNANDES, A.A. R. Cell wall alterations in the leaves of fusariosis-resistant and susceptible pineapple cultivars. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, n. 10, p. 1109-1117. 2010.

ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, May 2002.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiol.** 141: 391-396. 2006.

BALESTRASSE, K.B.; ZILLI, C.G.; TOMARO, M.L. Signal transduction pathways and haemoxygenase induction in soybean leaves subjected to salt stress. **Redox Report**, v. 13, n. 6, pp. 255-262. 2008.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, D.J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C.J. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. **Cell**, v. 70, 21–30. 1992.

CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. de; CUNHA, G. A. P. da. Seleção preliminar de genótipos de abacaxi resistentes à fusariose. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 13, nº 3, p. 97-102, 1991.

CARRILLO, N.; VALLE, E.M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**. Cordoba. v. 2, n. 2. Mar. 2005. Disponível em: <<http://www.safv.com.ar/Carrillo%200305.pdf>>. Acesso em: 15 Dez. 2012.

CHAUDIÈRE, J. Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in living cells. In: RICE EVANS, C.; BURDON, R.H. (Ed.). Free radical damage and its control. Amsterdam: **Elsevier Science**, chap. 2, p. 23-64. 1994.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 949-962, Sept. 1999.

COSTA, P.H.A.; NETO, A.D.A.; BEZERRA, M.A.; PRISCO, J.T.; GOMES-FILHO, E. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 17, n. 4, 353-361. 2005.

DAFOE, N.J.; ZAMANI, A.; EKRAMODDOULLAH, A.K.M.; LIPPERT, D.; BOHLMANN, J.; CONSTABEL, C.P. Analysis of the Poplar Phloem Proteome and Its Response to Leaf Wounding. **Journal of Proteome Research**, 8, 2341–2350. 2009.

DEUNFF, E.L.; DAVOINE, C.; DANTEC, C.L.; BILLARD, J.P.; HUAULT, C. Oxidative burst and expression of germin/oxo genes during wounding of ryegrass leaf blades: comparison with senescence of leaf sheaths. **The Plant Journal**, v. 38, i. 3, pp. 421–431. 2004.

ESPÍRITO SANTO (Estado). Governador (2002-2010: Hartung). **Diversificação de culturas amplia o crescimento do agronegócio no Espírito Santo**. 2005. Disponível em: <<http://www.es.gov.br/site/noticias/show.aspx?noticiald=99644996>>. Acesso em: 19 ago. 2011.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Produção mundial de abacaxis**. Rome: FAO, 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 16 jan. 2013.

FERREIRA, F.R.; GIACOMETTI, DC; BIANCHETTI, LB; CABRAL, JRS. Coleta de germoplasma de abacaxizeiros (*Ananas comosus* (L.) Merrill) e espécies afins. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 14, n. 2, p. 5-11, 1992.

FERREIRA, R.R; FORNAZIER, R.F; VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, n. 2, p. 327-342. 2002.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 17, p. 1866-1875, 2005.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; SANTOS, A.A. Cultivares de caupi para a região Meio-Norte do Brasil. **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte. 67-68. 2000.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases.I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiol**, v.59, p.309-14, 1977.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier.**Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, n. 32, p. 481-494, 2005.

GUPTA, A.S.; WEBB, R.P.; HOLADAY, A.S.; ALLEN, R.D. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 1067-1073. 1993.

HARRIS, E.D.; Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 6, n. 9, p.2675-2683, June 1992.

HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley and maize. **Plant Physiology** 91, 812–15. 1989.

HAYAKAWA, T., KANEMATSU, S., ASADA, K. Occurrence of Cu,Zn-Superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts. **Planta and Cell Physiology**, Kyoto, v. 25, n.6, p. 883-889, 1994.

HE, J.; CHEN, F., CHEN, S; LV, G.; DENG, Y.; FANG, W.; LIU, Z.; GUAN, Z.; HE, C. Chrysanthemum leaf epidermal surface morphology and antioxidant and defense enzyme activity in response to aphid infestation. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, p. 687–693. 2011.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry**. 3th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 522 p. 2005.

INCAPER – **Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural**; disponível em: <<http://www.seag.es.gov.br/pedeag/setores/fruticultura.pdf> > Acesso em 19 ago 2011.

KRAUSS, B.H. Anatomy of the vegetative organs of the Pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. II - The leaf. **Botanical Gazette**, United States, v. 110, p. 333-404, 1948.

KUMAR, N.; EBEL, R.C.; ROBERTS, P.D. H₂O₂ 'metabolism during sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) 'Hamlin' *Xanthomonas axonopodis* pv. citri interaction. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 465–472. 2011.

KWAK, S.S.; KIM, S.K.; PARK, I.H.; LIU, J.R. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. **Phytochemistry**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 565-568, Oct. 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEDFORD, H.K.; NIYOGI, K.K. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 8, p.1037-1045, Aug. 2005.

LOISON-CABOT, C. Origin, phylogeny and evolution of pineapple species. **Fruits**, France, v. 47, nº 1, p. 25-32, 1992.

MALLICK, N., MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 157, n. 2, p. 183-193, Aug. 2000.

MANO, J.; OHON, C.; DOMAE, Y.; ASADA, K. Chloroplastic ascorbate peroxidase is the primary target of methylviologen-induced photo oxidative stress in spinach leaves: its relevance to monodehydroascorbate radical detected with in vivo ESR. **Biochim. Biophys. Acta**, 1504: 275–287. 2001.

MARTINEZ-CAYUELA, M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 39, n. 1, p. 5-18, 1998.

MATOS, A.P. **Abacaxi fitossanidade**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 77 p. 2000.

MCKERSIE, B.D. Oxidative stress. **Plant Stress**. Disponível em: www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm. Acesso em: 19 Dez. 2012. 1996.

MESSIAS, U. **Atividade da superóxido dismutase, catalase, peroxidases e acúmulo de H₂O₂ associados à infecção de um Carlavirus em soja e um Potyvirus no feijoeiro**. 2008. 81 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas. 2008.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, London, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEN, F. Reactive oxygen gene network of plants. **TRENDS in Plant Science**, London, v. 9, n. 10, p. 490-498, Oct. 2004.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Clare, v. 162, n. 4, p. 491-498, Apr. 2002.

MOLDES, C.A. **Resposta de enzimas antioxidantes à aplicação do herbicida glifosato em variedades de soja transgênica e não transgênica**. 2006. 92 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880. 1981.

NASCENTE, A.S. **Cultivo do abacaxi em Rondônia**. Porto Velho. 2005.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 49: 249-279. 1998.

OLSON, P.D.; VARNER, J.E. Hydrogen peroxide and lignification. **Plant J.** 4, 887–892. 1993.

OROZCO-CARDENAS, M.; RYAN, C.A. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. **Plant Biology**, v. 96, p 6555-6557. 1999.

PY, C.; LACOEUILHE, J. J.; TEISON, C. **L’Ananassaculture, ses produits**. Paris, 562 p., 1984.

PY, C.; TISSEAU, M. A. **La piña tropical**. Barcelona: Blume, 1969.

REINHARDT, D. M.; SOUZA, F. L. DA S.; CABRAL, J. R. S. **Abacaxi - Produção: aspectos técnicos**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura; Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. 77 p. (Frutas do Brasil, 7).

RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R. Techniques in free radical research. In: BURDON, R.H., VAN KNIPPENBERG, P.H. (Ed.). **Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. London: Elsevier, v. 22, p. 1-278. 1991.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n.40, p. 38921-38925, Oct. 2003.

RODRIGUES, A.C.; DINIZ, A.C.; FACHINELLO, J.C.; da SILVA, J.B.; FARIA, J.L.C. Peroxidases e fenóis totais em tecidos de porta-enxertos de *Prunus* sp. nos períodos de crescimento vegetativo e de dormência. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.4, p.559-564, Ago. 2002.

SANTOS, B.A.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J.A.; VALE, F.X.R.. Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* sensíveis e resistentes ao benomyl, em abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza-CE, v. 27, n.1, p. 101-103, 2002.

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, n. 7, p. 995-1014, Jul. 2005.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. ***Plant Physiology***, Rockville, v.101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plants catalase. In: FOYER, C.H.; MULIUNEUX, P.M. (Ed.) ***Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants***. Boca Ratón: CRC Press, p. 275-315. 1994.

SCANDALIOS, J.G; GUAN, L.; POLIDOROS, A.N. Catalases in Plants: gene structure, properties, regulation and expression. In: SCANDALIOS, J.G. (Ed.) ***Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses***. New York: ***Cold Spring Harbor Laboratory Press***, 1997. p. 343-406. 1997.

SEHMER, L.; DIZENGREMEL, P. Contribution to subcellular localization of superoxide dismutase isoforms of spruce needles and oak leaves. ***Journal of Plant Physiology***, Jena, v. 53, n. 5, p. 545-551, Nov. 1998.

SHEN, S.; JING, Y.; KUANG, T. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. ***Proteomics***, 3, 527–535. 2003.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. **Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance**. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

STASKAWICZ, B.J., AUSUBEL, F.M., BAKER, B.J., ELLIS, J.G.; JONES, J.D.G. Molecular genetics of plant disease resistance. ***Science***, 268:661-67. 1995.

SYROS, T.; YUPSANIS, T.; ZAFIRIADIS, H.; ECONOMOU, A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in

cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, n. 1, p. 69-77, Jan. 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p. 449-484. 2004

TAMMINGA, S. 1993. Influence of feeding management on ruminant fibre digestibility. In **Forage cell wall structure and digestibility**. (Ed. H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield and J. Ralph), Madison, Wisconsin, USA, pp. 571-602.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Clare, v. 161, n. 3, p. 405-414, Aug. 2001.

VENTURA, J.A. **Fusariose do Abacaxizeiro: Caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro in vitro**. (Tese de Doutorado). Viçosa. Minas Gerais. 1994.

VENTURA, J.A.; CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P.; COSTA, H.. Vitória : new pineapple cultivar resistant to fusariose.. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 51-56, 2009

VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L. Controle das Doenças do Abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L. et al.(Eds.). **Controle de Doenças de Plantas Fruteiras** – Volume I. 1ª edição. 2002.

WILLEKENS, H.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M., INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). **FEBS Lett.** 352:79-83. 1994.

WUERGES, J; LEE, J.W.; YIM, H.S.; KANG, S.O.; CARUGO, K.D. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America**, Washington, v. 101, n. 23, p.8569-8574, June 2004.

YOSHIMURA, K., YABUTA, Y.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. ***Plant Physiol.*** 123: 223-233. 2000.