ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE E NO PERFIL ELETROFORÉTICO DA ENZIMA
PEROXIDASE EM MESOCOTILOS E FOLHAS DE MILHO (*Zea mays* L.) EM
RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Helminthosporium maydis* Nisik. &
Miy., RAÇA 0, *Helminthosporium carbonum* Ullstrup, RAÇA 1 E À
INJÚRIA MECÂNICA.

MARCOS FERNANDO DE GODOY LUSSO

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof.Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia, área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1989

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

L972a Lusso, Marcos Fernando de Godoy
Alterações na atividade e no perfil eletroforético da enzima
peroxidase em mesocotilos e folhas de milho (Zea mays L.) em res-
posta a inoculação com Helminthosporium maydis Nisik. & Miy., ra-
ça 0, Helminthosporium carbonum Ullstrup, raça 1 e a injúria me-
cânica. Piracicaba, 1989.
109p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Eletroforese aplicada 2. Fungo fitopatogênico - Inoculação
3. Milho - Folha - Atividade enzimica 4. Milho - Mesocótilo -
Atividade enzimica 5. Milho - Resistência a doença 6. Peroxidase
em milho I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pira-
cicaba.

CDD 633.15

ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE E NO PERFIL ELETROFORÉTICO DA ENZIMA
PEROXIDASE EM MESOCÓTILOS E FOLHAS DE MILHO (*Zea mays* L.) EM
RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Helminthosporium maydis* Nisik. &
Miy., RAÇA 0, *Helminthosporium carbonum* Ullstrup, RAÇA 1 E À
INJÚRIA MECÂNICA.

MARCOS FERNANDO DE GODOY LUSSO

Aprovado em: 21/03/90

Comissão julgadora:

Prof.Dr.Sêrgio Florentino Pascholati

ESALQ/USP

Dra.Walkyria Bueno de Camargo Moraes

Inst.Biol./S.P

Prof.Dr.Ivan Paulo Bedendo

ESALQ/USP

Prof.Dr.Sêrgio Florentino Pascholati
Orientador

À minha esposa LENA e
à minha filha CAMILA,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos

Ao Prof. Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI, docente da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pela orientação, sugestões, apoio e incentivo dispensados a realização deste trabalho.

À Dra. WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES, Chefe da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, pela oportunidade dada para o desenvolvimento deste trabalho e, pela revisão dos originais.

A ANA MARIA LOPEZ, colega da Pós-graduação, pela revisão dos originais.

À Sra. LENA SAMPAIO GOES LUSSO, Arquiteta da CINASA - Construtora e Imobiliária LTDA, pela confecção dos gráficos e pela colaboração nos serviços de informática.

A CAPES e ao "Gesellschaft fuer Technische Zusammenarbeit", GmbH (GTZ), pelo auxílio financeiro prestado.

Ao MARCELO e CELSO pelo auxílio prestado como funcionários da Seção de Bioquímica Fitopatológica.

A DAGMAR, DENISE, ELZA, SANDRA e SYLVIA pelo companheirismo durante os anos de curso.

Aos demais colegas e funcionários da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico e a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Características das peroxidases	05
2.1.1. Estrutura química	08
2.1.2. Reações catalíticas	08
2.1.3. Inibição das peroxidases	09
2.2. Peroxidases, fenóis e lignina	10
2.3. Detecção das peroxidases	12
2.3.1. Métodos qualitativos	12
2.3.2. Métodos quantitativos	13
2.3.3. Testes histoquímicos	14
2.4. Isoperoxidases	15
2.5. Efeitos do estresse e do fermento sobre as peroxidases	17
2.6. Peroxidases e doenças de plantas	19
2.7. Peroxidases nas interações do milho com fungos	23

3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Hospedeiro	27
3.2. Fungos	28
3.3. Obtenção das suspensões de esporos e ino- culação	29
3.4. Observações microscópicas	29
3.5. Extração e determinação da atividade da peroxidase	30
3.6. Influência de diferentes substratos na atividade da peroxidase <i>in vitro</i>	31
3.7. Atividade da peroxidase em extratos obti- dos de mesocôtilos	32
3.7.1. Mesocôtilos inoculados	32
3.7.2. Mesocôtilos feridos	33
3.8. Atividade da peroxidase em extratos obti- dos de folhas	34
3.8.1. Folhas inoculadas	34
3.8.2. Folhas feridas	34
3.9. Eletroforese, em gel de poliacrilamida, de extratos de folhas inoculadas ou feridas .	35
3.10. Substratos para a coloração de peroxidase em gel de poliacrilamida	37

4. RESULTADOS	38
4.1. Curva de tempo do desenvolvimento dos fungos e da formação de papilas no hospedeiro	38
4.2. Influência de diferentes substratos na atividade da peroxidase <i>in vitro</i>	39
4.3. Atividade da peroxidase em extratos obti- dos de mesocôtilos	40
4.3.1. Mesocôtilos inoculados	40
4.3.2. Mesocôtilos feridos	41
4.4. Atividade da peroxidase em extratos obti- dos de folhas	42
4.4.1. Folhas inoculadas	42
4.4.2. Folhas feridas	43
4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida	44
4.6. Substratos para a coloração de peroxidase em gel de poliacrilamida	45
5. DISCUSSÃO	46
5.1. Atividade da peroxidase em extratos obti- dos de mesocôtilos ou folhas inoculadas ..	48
5.2. Atividade da peroxidase em extratos obti- dos de mesocôtilos ou folhas feridas	53
5.3. Isoperoxidases em folhas inoculadas ou fe- ridas	55
5.4. Considerações finais	58

6. CONCLUSÃO	60
APÊNDICE 1	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE FIGURAS

FIGURA No		Página
1	Desenvolvimento do <i>H.carbonum</i> (interação de resistência) e <i>H.maydis</i> (interação de suscetibilidade) em mesocôtilos do híbrido AG-303	62
2	Influência de diferentes substratos na atividade das peroxidases em extratos de folhas de milho	63
3	Atividade das peroxidases em extratos obtidos de mesocôtilos de milho durante diferentes tempos após a inoculação .	64
4	Atividade das peroxidases em extratos obtidos de mesocôtilos de milho inoculado com diferentes concentrações de esporos de <i>H.carbonum</i> (interação de resistência), <i>H.maydis</i> (interação de suscetibilidade) ou aspergidos com água estéril (controle).....	65

5	Atividade das peroxidases em extratos obtidos de mesocôtilos de milho durante diferentes tempos após o ferimento ..	66
6	Atividade das peroxidases em extratos obtidos de mesocôtilos de milho 48 h após o ferimento.....	67
7	Atividade das peroxidases em extratos obtidos de folhas de milho durante diferentes tempos após a inoculação	68
8	Atividade das peroxidases em extratos obtidos de folhas de milho durante diferentes tempos após o ferimento	69
9	Eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de folhas obtidos em diferentes tempos após os tratamentos	70

10	Diagrama da eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de folhas obtidos em diferentes tempos após os tratamentos	71
11	Densitometria das amostras de 0 h do gel mostrado na Figura 9	72
12	Densitometria das amostras de 12 h do gel mostrado na Figura 9	73
13	Densitometria das amostras de 24 h do gel mostrado na Figura 9	74
14	Densitometria das amostras de 48 h do gel mostrado na Figura 9	75

LISTA DE TABELAS

TABELA No		Página
1	Substratos testados para a coloração de bandas de peroxidase de folhas de milho sadio	76

ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE E NO PERFIL ELETROFORÉTICO DA ENZIMA PEROXIDASE EM MESOCÓTILOS E FOLHAS DE MILHO (*Zea mays* L.) EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Helminthosporium maydis* Nisik. & Miy., RAÇA 0, *Helminthosporium carbonum* Ullstrup, RAÇA 1 E À INJÚRIA MECÂNICA.

Autor: MARCOS FERNANDO DE GODOY LUSSO

Orientador: Prof.Dr. SERGIO FLORENTINO PASCHOLATI

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar o papel da enzima peroxidase nas respostas de plantas de milho ao ferimento com carborundo e à inoculação com *Helminthosporium carbonum*, raça 1 (interação de resistência) ou *Helminthosporium maydis*, raça 0 (interação de suscetibilidade). Os estudos realizados basearam-se na atividade da enzima *in vitro* e nas alterações do perfil isoenzimático de extratos obtidos de plantas feridas ou inoculadas.

A análise dos extratos obtidos dos tecidos submetidos aos diferentes tratamentos, mostrou a ocorrência de aumento na atividade da peroxidase em resposta à inoculação com *H. maydis* ou a ferimento. Esse aumento ocorreu tanto em extratos obtidos de folhas quanto de

mesocôtilos. No material inoculado com *H. maydis*, a máxima atividade enzimática ocorreu ao redor de 48 h após a inoculação, e permaneceu em nível elevado até o final do experimento. No material ferido com carborundo, observou-se no mesocôtilo, um máximo de atividade ao redor de 48 h enquanto que na folha, esse máximo ocorreu ao redor de 24 h após a injúria. Tanto nos extratos obtidos de folhas quanto nos de mesocôtilos, observou-se queda na atividade da enzima no final dos experimentos. Por sua vez, o material inoculado com *H. carbonum* apresentou atividade enzimática menor em relação a *H. maydis* e próxima aos valores encontrados para os tecidos controle não inoculados.

Em relação ao perfil isoenzimático, observou-se nos extratos obtidos de tecidos feridos ou inoculados, o aparecimento de duas e o desaparecimento de três isoperoxidasas no material extraído 12 h após os tratamentos. Esses mesmos resultados também foram observados em extratos obtidos 24 e 48 h.

Finalmente, os resultados sugerem que as alterações da peroxidase, tanto em relação ao aumento da atividade quanto ao perfil isoenzimático, mostram-se comuns ao ferimento causado por um agente abrasivo bem como a infecção por fungos.

CHANGES IN ACTIVITY AND ELECTROPHORETIC PATTERN OF PEROXIDASE IN MAIZE (*Zea mays* L.) MESOCOTYLS AND LEAVES AFTER INOCULATION WITH *Helminthosporium maydis* Nisik. & Miy., RACE 0, *Helminthosporium carbonum* Ullstrup, RACE 1 AND MECHANICAL INJURY.

Author: MARCOS FERNANDO DE GODOY LUSSO

Adviser: Prof.Dr. SERGIO FLORENTINO PASCHOLATI

SUMMARY

The present work was developed to study the role of the peroxidase enzyme on maize plants after wounding by abrasion with carborundum or inoculation with the fungi *Helminthosporium carbonum*, race 1 (resistant interaction) or *Helminthosporium maydis*, race 0 (susceptible interaction). The study was carried out based upon the measurement of enzyme activity *in vitro* as well as on the isoenzymatic patterns in extracts obtained from wounded or inoculated tissues.

Results showed an increase in peroxidase activity after inoculation with *H. maydis* or wounding. This increase occurred in extracts obtained either from leaves or mesocotyls. In maize tissues inoculated with *H. maydis*, the highest level of enzyme activity was observed 48 h after

inoculation, this level of activity remained up to the end of the experiment. In tissues wounded with carborundum, the highest enzyme activity was observed to occur 48 h in mesocotyls and 24 h in leaves after wounding. In these tissues, enzyme activity decreased at the end of the experiment. On another hand, mesocotyls and leaves inoculated with *H. carbonum* (resistant interaction) exhibited an enzyme activity smaller than that observed in tissues inoculated with *H. maydis*, and the level of activity was close to the values observed for uninoculated tissues.

Regarding the isoenzymatic studies carried out on polyacrilamide gel electrophoresis, in extracts obtained from wounded or inoculated leaves 12 h after the treatments, two new isoenzymes were observed. At the same time, it was observed the disappearance of three other isoenzymes in the same material. The same results were observed in leaf extracts obtained 24 and 48 h after wounding or inoculation.

Finally, the results suggest that the peroxidase changes observed in mesocotyls and leaves, based upon enzyme activity and on isoenzyme patterns, are common responses of maize tissues to wounding made by abrasion and to fungi infection.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.), juntamente com o arroz e o trigo, representam as três culturas de cereais mais importantes em todo o mundo (SHURTLEFF, 1980). Com uma produção anual aproximada de 25 milhões de toneladas, o Brasil constitui um dos principais produtores de milho (I.E.A., 1988), embora com baixos índices médios de produtividade (1898 kg/ha) (I.E.A., 1988). Essa baixa produtividade é decorrente de vários problemas, entre os quais as doenças causadas por fungos, bactérias e vírus e o estresse fisiológico pelos quais as plantas de milho passam no campo. Os fungos, por sua vez, são os responsáveis pela maioria das doenças infecciosas no milho (SHURTLEFF, 1980).

A natureza tem como regra a resistência de plantas à doenças, entretanto, em algumas poucas exceções, os microrganismos são capazes de invadir e colonizar as células do hospedeiro. Segundo MISAGHI (1982), o resultado da disputa entre planta e microrganismo depende principalmente da eficácia dos mecanismos de defesa das plantas. Diversos estudos sobre mecanismos de resistência

mostram que as plantas se defendem de agentes infecciosos, tanto de forma ativa como de forma passiva, e que a defesa ativa envolve a mobilização de um grande número de estratégias defensivas de uma forma altamente coordenada (MISAGHI, 1982). No caso específico do milho, embora existam estudos sobre a bioquímica da interação entre essa gramínea e fungos, os quais apontam para o metabolismo de fenóis como fator importante na resistência (ANTHENILL, 1978; COUTURE et alii, 1983; HAMMERSCHMIDT & NICHOLSON, 1977; KOSUGE, 1969 e WERDER, 1982), o assunto carece de maiores contribuições.

A defesa ativa das plantas contra fitopatógenos pode envolver alterações metabólicas, as quais podem ser correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves no metabolismo primário e secundário (DORN, 1974 e FRIC, 1976). A enzima peroxidase, a qual está presente nos tecidos das plantas, é conhecida por participar em vários processos fisiológicos de grande importância, incluindo a oxidação de compostos fenólicos e a biossíntese do hormônio vegetal etileno (MISAGHI, 1982). A hipótese de que as peroxidases estão envolvidas nas respostas das plantas às doenças, baseia-se em trabalhos que relatam alterações na atividade da enzima em interações de resistência ou suscetibilidade em diferentes sistemas hospedeiro-patógeno (COFFEY & CASSIDY, 1984; CZECH-KOZLOWSKA & KRZYWANSKI, 1984; ESPELIE & KOLATTUKUDY, 1985;

GRAND & ROSSIGNOL, 1983; HAMMERSCHMIDT et alii, 1982; NADOLNY & SEQUEIRA, 1980; STAHMANN & DEMOREST, 1973 e VANCE et alii, 1976).

Diante do exposto, procurando contribuir para a elucidação dos mecanismos de resistência e suscetibilidade em milho contra fungos, o presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de:

1. Determinar o perfil de atividade da enzima peroxidase durante a expressão da resistência ou suscetibilidade em milho contra os fungos *Helminthosporium carbonum* e *Helminthosporium maydis*, respectivamente;

2. Determinar o perfil isoenzimático da peroxidase durante a expressão da resistência ou da suscetibilidade em milho contra os patógenos acima;

3. Determinar os perfis de atividade e isoenzimático da peroxidase em milho em resposta à injúria mecânica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Apesar das peroxidases terem sido estudadas desde o início da enzimologia, este nome foi usado pela primeira vez em 1898 (GASPAR et alii, 1982). As peroxidases (doador: H_2O_2 Oxiredutase: E.C. 1.11.1.7) são enzimas cuja função primária é a de oxidar moléculas a custa do peróxido de hidrogênio (GASPAR et alii, 1982). As peroxidases têm sido relatadas em uma grande variedade de plantas, e aparentam ser componentes normais de suas células (MAEHLY, 1955). Apesar das peroxidases serem encontradas em mais de 80 espécies vegetais, considera-se que a seiva da figueira (*Ficus carica* L.) e a raiz de rábano (*Rapportia lapathifolia* Gilib.) são as mais ricas fontes da enzima (SAUNDERS et alii, 1964).

As peroxidases atuam em várias vias metabólicas nos tecidos vegetais (GASPAR et alii, 1982; GREPPIN et alii, 1986 e SAUNDERS et alii, 1964). Diversos

autores reportam que as peroxidases estão envolvidas na biossíntese da lignina (HARKIN & OBST, 1973 e WHITMORE, 1978), produção de etileno (ABELES, 1973 e BOYER & DE JAEGER, 1986), crescimento vegetativo (LAVEE & AVIDAN, 1986), polinização (BREDEMEIJER, 1986), florescimento (GREPPIN, 1986) e germinação de sementes (LEWAK, 1986). Por esse motivo, essas enzimas têm atraído a atenção de químicos, bioquímicos e fisiologistas há muitos anos. O interesse pelas peroxidases é evidenciado pelo grande número de artigos publicados, onde são discutidas as propriedades bioquímicas dessas enzimas, bem como suas funções nas plantas, animais e microrganismos (GASPAR et alii, 1982; GREPPIN et alii, 1986 e SAUNDERS et alii, 1964).

2.1. Características das peroxidases

As peroxidases têm sido purificadas e examinadas a partir de diferentes tecidos vegetais (SCIANCELEPORE et alii, 1985). Essas enzimas não têm se mostrado significativamente diferentes com relação ao peso molecular (GASPAR et alii, 1982). As peroxidases de rábano, as mais intensamente estudadas, possuem um peso molecular aproximado de 40.000 a 45.000 daltons (KLAPPER & HACKETT, 1965). Por sua vez, o peso molecular das peroxidases em videira (*Vitis vinifera*), varia de 40.000 a 41.000

(SCIANCELEPORE et alii, 1985), enquanto que em aspargos (*Asparagus officinalis* L.) varia de 33.000 a 48.000 (WANG & LUH, 1983). Em contraste, DECEDUE et alii (1984) reportaram que isoenzimas da peroxidase de batata (*Solanum tuberosum* L.) apresentam um peso molecular variando entre 48.000 e 105.000 daltons.

O pH ótimo para a avaliação da atividade enzimática *in vitro*, varia entre 5,5 e 7,5 de acordo com o substrato e o tecido vegetal utilizados. DANGE & REDDY (1984) relataram como pH ótimo valores entre 6,5 e 7,0 para as peroxidases extraídas de plântulas de arroz (*Oryza sativa* L.), quando foi utilizado o pirogalol como substrato. Por outro lado, SCIANCELEPORE et alii (1985) mostraram que quando foi utilizado o guaiacol como substrato para as peroxidases extraídas de videira, obteve-se 5,5 como pH ótimo. Em milho, GRISON & PILET (1985a) determinaram que 5,5 foi o pH ótimo para a enzima quando siringaldazina foi utilizada como substrato.

Os valores de K_m para as peroxidases variam de acordo com o substrato utilizado (GRISON & PILET, 1985b). Em milho, quando foi utilizada siringaldazina como substrato, foi obtido um valor de K_m igual a $6,2 \times 10^{-6} M$ (GRISON & PILET, 1985a); porém, quando guaiacol foi utilizado como substrato, o K_m encontrado foi de $5,2 \times 10^{-4} M$ (GRISON, 1984).

Poucos trabalhos apresentam resultados sobre a temperatura mais adequada para a avaliação da atividade das peroxidases *in vitro*. Por exemplo, SCIANCALEPORE (1985), observou que para as peroxidases extraídas de videira, a temperatura ótima para a avaliação da atividade situava-se ao redor de 40°C.

A localização das peroxidases nas plantas varia com a idade, espécie e grau de diferenciação, sendo a distribuição subcelular diferente para cada tecido (GASPAR et alii, 1982). As peroxidases estão localizadas principalmente na parede celular e nos vacúolos das células de plantas superiores (CATESSON et alii, 1986; MADER et alii, 1975; MATILE, 1984 e PARISH, 1975). Além disso, tem sido mostrado histoquimicamente que as peroxidases são também encontradas no retículo endoplasmático, complexo de Golgi e nas vesículas, tanto de células de plantas como de animais (GASPAR et alii, 1982). No caso da soja (*Glycine max* (L.) Menill), já foi demonstrado, em culturas de células em suspensão, a presença de peroxidases no espaço extracelular (GRIFFING & FOWKE, 1985). Com relação a ocorrência de peroxidases nos tecidos, em raízes de ervilha (*Pisum sativum* L.), por exemplo, a enzima ocorre principalmente na coifa, epiderme, córtex, endoderme e floema (HALL & SEXTON, 1972). Em hipocótilo de feijão (*Phaseolus sp*), essas enzimas são encontradas no floema, xilema em maturação, epiderme, hipoderme, endoderme e em

algumas células do parênquima. No mesmo órgão, por exemplo a raiz, a localização subcelular das peroxidases difere de tecido para tecido e, no mesmo tecido, de célula para célula (GASPAR et alii, 1982).

2.1.1. Estrutura química

O grupo prostético das peroxidases de rábano, rabanete japonês (*Raphanus sativus* var. *radicula*), citocromo C e cloroperoxidase é a ferroprotoporfirina IX. As peroxidases são glicoproteínas, as quais apresentam diferentes quantidades de resíduos de carboidratos (SHANNON et alii, 1966). Por exemplo, as peroxidases solúveis de batata possuem maior quantidade de carboidratos do que as peroxidases ligadas a parede celular (KAHN et alii, 1981). De acordo com WELINDER (1979), a peroxidase C da raiz de rábano consiste de uma hemina como grupo prostético, 2 átomos de Ca^{2+} , e 308 resíduos de aminoácidos, incluindo 4 pontes dissulfeto. O cálcio contribui para a estabilidade estrutural e térmica das peroxidases de rábano (HASCHKE & FRIEDHOFF, 1978).

2.1.2. Reações catalíticas

As peroxidases de rábano podem reagir com ROOH e com HOOH , mas não com ROOR (R = grupos alquila ou

acila). As peroxidases reagem reversivelmente com numerosas substâncias tais como, cianeto, sulfeto e fluoreto, formando compostos que podem ser detectados espectrofotometricamente (SAUNDERS et alii, 1964). A enzima pode também ser reduzida por redutores fortes tais como hidrosulfitos e semiquinonas (SAUNDERS et alii, 1964).

As peroxidases de plantas geralmente formam com peróxido três tipos de compostos denominados de I, II e III, os quais possuem espectros de absorção característicos (GASPAR et alii, 1982). Os compostos I e II são formados somente na presença de baixas concentrações de peróxido. O composto I é formado primeiro sendo então transformado em composto II através da redução por um doador de elétrons. Os compostos I e II são considerados como intermediários na reação que irá regenerar as peroxidases originais. O composto III tem sido identificado como um produto formado na presença de H_2O_2 em excesso (GASPAR et alii, 1982).

2.1.3. Inibição das peroxidases

Moléculas de peroxidase podem ser inativadas pela ação de ácidos e bases fortes, sendo essa a principal razão para a perda da atividade da enzima em soluções de pH muito alto ou muito baixo (SAUNDERS et alii, 1964).

A inativação das peroxidases também ocorre através da adição de substâncias que se liguem a posição 6

do átomo de ferro no grupo prostético. Esse é o caso da inativação das peroxidases pelo excesso de peróxido de hidrogênio (formação do composto III, enzimaticamente inativo), e por cianeto, sulfeto e fluoreto (SAUNDERS et alii, 1964). Outros ions, como por exemplo o nitrato, sulfato, cloreto e ferrocianeto, também exibem atividade inibitória, embora menor, sobre as peroxidases (SAUNDERS et alii, 1964).

Alguns trabalhos, citados por SAUNDERS et alii (1964), reportam a inibição das peroxidases por álcoois, açúcares e certos corantes orgânicos. Sabe-se, por exemplo, que o metanol causa grande inibição das peroxidases de leucócitos, mas exerce pouco ou nenhum efeito sobre as peroxidases de plantas.

2.2. Peroxidases, fenóis e lignina

As peroxidases catalizam as reações de uma grande variedade de compostos de plantas superiores (BARZ & HOESEL, 1979). Entre esses compostos estão os fenóis, cuja oxidação pelas peroxidases é conhecida desde 1900. Por exemplo, a oxidação da vanilina produz dehidrovanilina, a do pirogalol produz purpurogalina, e a do catecol produz *o*-benzoquinona (SAUNDERS et alii, 1964). No caso do guaiacol, a ação das peroxidases leva à formação do tetraguaiacol (MAEHLY & CHANCE, 1954). De acordo com FRY (1984), os

fenóis acoplados oxidativamente são formados a partir de fenóis simples pela ação das peroxidases.

As vias metabólicas envolvidas na síntese de compostos fenólicos, estão muito bem estudadas. As vias do ácido shiquímico e cinâmico (fenilpropanóides) constituem a sequência comum que gera os diferentes grupos de polifenóis e lignina (GRISEBACH, 1981).

No caso da biossíntese de lignina, a polimerização oxidativa dos álcoois hidroxicinâmicos, é catalizada pelas peroxidases (GASPAR et alii, 1982). A função das peroxidases é remover átomos de hidrogênio dos grupos álcoois, combinando-os com peróxido de hidrogênio para formar moléculas de água (SALISBURY & ROSS, 1978).

A lignina, um polímero complexo formado principalmente de unidades de fenilpropanóides (FREUNDENBERG, 1965), é um material de grande resistência que ocorre juntamente com celulose e outros polissacarídeos, na parede celular das plantas superiores (SALISBURY & ROSS, 1978). A lignina tem como função principal enrigecer os tecidos das plantas superiores (GROSS, 1979). Além dessa função, vários pesquisadores também acreditam que a lignina desempenha um importante papel na resistência de plantas a patógenos (RIDE, 1978; RIDE & PEARCE, 1979; VANCE & SHERWOOD, 1976a e VANCE et alii, 1980). Por exemplo, RIDE em 1978, destacou algumas maneiras pelas quais a lignificação pode impedir o

desenvolvimento de fungos nos tecidos do hospedeiro: 1. a lignina pode tornar as paredes resistentes à penetração mecânica; 2. a lignificação da parede celular no ponto de penetração, pode torná-la resistente à dissolução por enzimas fúngicas; 3. a lignificação das paredes pode restringir a difusão de enzimas e toxinas do fungo para a planta e, de água e nutrientes da planta para o fungo; 4. alguns precursores da lignina, de origem fenólica, de baixo peso molecular e radicais livres produzidos durante a polimerização, podem desestruturar as membranas do fungo, enzimas e toxinas; 5. as extremidades das hifas podem tornar-se lignificadas e perder a plasticidade necessária para o crescimento.

2.3. Detecção das peroxidases

2.3.1. Métodos qualitativos

SAUNDERS et alii (1964) observaram que diferentes substratos, como guaiacol, 1-naftol e hidroquinona, podem ser usados na detecção qualitativa das peroxidases. MAEHLI & CHANCE (1954) reportaram que a resina da árvore de guaiaco (*Guajacum officinale* L.) é a substância mais antiga utilizada em testes para a determinação da atividade de peroxidases e oxidases. Recentemente, outros compostos, incluindo eugenol (um

precursor da lignina), tirosina, benzidina, siringaldazina, amina aromática, ácidos benzóicos, fenóis, ácidos cinâmicos e cumarinas vem sendo usados na detecção das peroxidases (GOLDBERG et alii, 1983; GRISON & PILET, 1985a e LIU, 1975).

Compostos fenólicos (guaiacol, catecol, pirogalol e fluoroglucinol, amina aromática, benzidina, *O*-dianizidina, *O*-toluidina, *O*-fenilenodiamina) foram usados por KLISURKA & DENCHEVA (1980) no estudo da especificidade de substratos para isoenzimas das peroxidases por doadores de hidrogênio. KAHN & ANDRAWIS (1985) reportaram que tropolene (2,4,6-cicloheptatrieno-1-um) funcionava como substrato das peroxidases de rábano quando na presença de peróxido de hidrogênio, mas não na sua ausência.

2.3.2. Métodos quantitativos

De acordo com MAEHLI & CHANCE (1954), um dos métodos mais adequados para a avaliação quantitativa da atividade das peroxidases envolve a oxidação do guaiacol. O guaiacol foi obtido pela primeira vez através de destilação da resina de guaiaco. A oxidação do guaiacol pela ação das peroxidases na presença de H_2O_2 forma o tetraguaiacol. As soluções de tetraguaiacol apresentam coloração castanho, a qual começa a desaparecer pouco tempo após a sua formação. A concentração dessa solução pode ser determinada

espectrofotometricamente, se as leituras forem efetuadas em poucos minutos.

Pirogalol é outro composto muito utilizado na avaliação das peroxidases. A oxidação do pirogalol pela enzima origina a purpurogalina, um composto de coloração laranja. Essa reação, entretanto, é menos consistente do que a do guaiacol (MAEHLY & CHANCE, 1954). A oxidação da benzidina para benzidina azul também tem sido usada na avaliação da enzima (MAEHLY & CHANCE, 1954).

2.3.3. Testes histoquímicos

Diferentes testes histoquímicos têm sido utilizados para a visualização das peroxidases *in situ*. Guaiacol tem sido usado como reagente de coloração (COFFEY

& CASSIDY, 1984), assim como benzidina (THORPE & HALL, 1984) e pirogalol (VANCE et alii, 1976). Entretanto, até 1970, nenhum método permitia a discriminação entre a atividade das oxidases e das peroxidases (MAEHLI & CHANCE, 1954). O teste histoquímico da siringaldazina para peroxidases foi descrito por HARKIN & OBST em 1973. Este teste permitiu demonstrar a participação exclusiva das peroxidases no processo de lignificação.

A identificação citoquímica das peroxidases foi conduzida na parede celular e no citoplasma em degeneração de folhas de trigo (*Triticum aestivum* L.) infectadas com *Botrytis cinerea* Pers., onde se utilizou 3,3-diaminobenzidina como substrato (THORPE & HALL, 1984). Esse mesmo substrato foi usado para se demonstrar a presença das peroxidases na epiderme de raízes de trigo (SMITH & O'BRIEN, 1979), em raízes e hipocótilos de plântulas de milho (SCHALL et alii, 1980) e em folhas de feijão infectadas por *Uromyces appendiculatus* (Pers.ex.Pers.) Unger (= *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint. var. *typica* Arth.) (MUELLER & BECKMAN, 1978). Em capim-amarelo (*Phalaris arundinacea* L.) as peroxidases foram identificadas através do uso do pirogalol (VANCE et alii, 1976).

2.4. Isoperoxidases

Eletroforese, cromatografia de troca iônica e focalização isoelétrica conduzidas com amostras de extratos de diferentes plantas, separam dois grupos de isoperoxidasas: as básicas e as ácidas. Entretanto, o número de isoenzimas depende principalmente da técnica de separação utilizada (GASPAR et alii, 1982). Por exemplo, SHANNON et alii (1966) encontraram 7 isoenzimas da peroxidase em extratos de raízes de rábano. Entretanto, através de focalização isoelétrica, HOYLE (1977), reportou a ocorrência de 42 isoenzimas em preparação comercial da enzima extraída de rábano.

Em milho, através da eletroforese em gel de poliacrilamida, HAMILL & BREWBAKER (1969) observaram 24 isoenzimas em extratos obtidos de 250 variedades. Por sua vez, GRISON & PILET (1985b) relataram 11 isoperoxidasas na fração citoplasmática extraída de raízes de milho.

DENNA & ALEXANDER (1975) extraíram peroxidases de 351 variedades de abóbora (*Cucurbita pepo* L.). Através de eletroforese em gel de poliacrilamida separaram 14 diferentes bandas de isoperoxidasas, as quais incluíam isoenzimas anódicas e catódicas. No primeiro número de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), STAFFORD & BRAVINDER-BREE (1972) separaram 5 formas de peroxidases, sendo 3 anódicas e 2 catódicas. Outros trabalhos reportam a presença de isoperoxidasas em plantas como o trigo (SAINI et alii, 1985), fumo (*Nicotiana tabacum* L.) (VAN LOOM,

1971), citros (*Citrus sp*) (TORRECILAS et alii, 1985) e arroz (DANGE & REDDY, 1984).

As isoperoxidasas estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos nas plantas (MADER et alii, 1977). Entre esses processos estão incluídos a vitrificação em cultura de tecidos (KEVERS & GASPAR, 1985), senescência foliar (HAZELL & MURRAY, 1982), abscisão foliar, dominância da gema apical, tolerância ao frio, dormência de gema, desenvolvimento e amadurecimento de frutos, germinação de sementes, expressão sexual, tuberização, expressão de resistência contra patógenos, etc (GASPAR et alii, 1982).

2.5. Efeitos do estresse e de ferimento sobre as peroxidases

Vários autores observaram aumentos na atividade das peroxidases de plantas em resposta ao estresse e a ferimento (BIRECKA et alii, 1973; BIRECKA et alii, 1975; BORCHERT, 1978; KAHL, 1978; KALIR et alii, 1984; RIDGE & OSBORNE, 1970; STERMER & HAMMERSCHMIDT, 1984 e VARSHNEY & VARSHNEY, 1985). Esses aumentos podem ser correlacionados com a produção de etileno, visto que tanto o estresse como o ferimento estimulam a produção do hormônio (ABELES, 1973; HOGSETT et alii, 1981; KONZE & KWIATKOWSKI, 1981; SALTVEIT & DILLEY, 1978 e YU & YANG,

1980), e este altera a atividade da enzima em diversos tecidos (BIRECKA et alii, 1976; BIRECKA & MILLER, 1974; GAHAGAN et alii, 1968; RIDGE & OSBORNE, 1970). Os aumentos na atividade podem ser explicados com base na ativação das peroxidases encontradas em forma latente nos tecidos vegetais (DRUART et alii, 1982 e LEGRAND et alii, 1976) e/ou no aparecimento de novas formas da enzima (BIRECKA et alii, 1973; BORCHERT, 1978; BOYER et alii, 1979 e FLEURIET, 1982), produzidas pela síntese *de novo* (GREPPIN et alii, 1986). Essas alterações na atividade da enzima tornam-se perceptíveis 24 horas após o ferimento e permanecem em níveis elevados por alguns dias (BIRECKA & GARRAWAY, 1978; BORCHERT, 1979; FLEURIET & DELOIRE, 1982; QUESSADA, 1984 e URITANI & OBA, 1978). STERMER & HAMMERSCHMIDT (1984) observaram um aumento na atividade das peroxidases após a exposição de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) a altas temperaturas. Esse aumento na atividade da enzima, ocorreu 24 horas após o tratamento, atingindo um máximo em 48 horas e diminuindo após esse período. CHANG et alii (1984) observaram o aparecimento de 3 novas isoperoxidases em extratos obtidos de folhas de inhame (*Alocasia indica* Schott.) cultivadas em 50% de água do mar, quando comparados com extratos de plantas saudáveis. Em milho, BIRECKA et alii (1975) observaram aumento na atividade das peroxidases solúveis em extratos obtidos de folhas feridas mecanicamente. Esse aumento foi observado 16 horas após o

ferimento. Análises eletroforéticas não mostraram diferenças nas isoenzimas do material ferido em relação ao controle.

2.6. Peroxidasas e doenças de plantas

As peroxidases têm sido envolvidas tanto nos processos de resistência de plantas a patógenos, como também nos de suscetibilidade (FARKAS & KIRALY, 1958; GASPAR et alii, 1982; GREPPIN et alii, 1986; SEQUEIRA, 1963; STAHMANN, 1967; TOMIYAMA, 1963 e WOOD, 1967). Esse envolvimento pode ocorrer tanto através de mudanças na atividade da enzima como também, através de mudanças nas isoperoxidasas (FRIC, 1976; GASPAR et alii, 1982 e VAN LOON, 1986). Por exemplo, plantas de painço (*Setaria italica* L.) inoculadas com *Sclerospora graminicola* (Sacc.) Schr. apresentaram aumento na atividade das peroxidases em interações de suscetibilidade, enquanto que, nas interações de resistência a atividade da enzima não diferiu das plantas do tratamento controle (ARORA et alii, 1986). Por outro lado, MAGRO et alii (1983), relataram que bulbos de cebola (*Allium cepa* L.) resistentes à *Botrytis allii* Munn apresentaram maior atividade da enzima que os bulbos suscetíveis.

As peroxidases têm sido estudadas nas interações das plantas com vírus (ABU-JAWDAH & KUMMERT,

1983; SIMONS & ROSS, 1970; VEGETTI et alii, 1985 e WOOD, 1971), bactérias (LOVREKOVICH et alii, 1968), fungos (COFFEY & CASSIDY, 1984; CZECH-KOZLOWSKA & KRZYWANSKI, 1984; EBERMANN & LICKL, 1985; HAMMERSCHMIDT et alii, 1982; MELLON & LEE, 1985; MENDGEN, 1975; MAGRO et alii, 1983; MARAITE, 1973; REUVENI & BOTHMA, 1985; SAKO & STAHMANN, 1972; SEEVERS et alii, 1971; YAMAMOTO et alii, 1978 e ZINKERNAGEL, 1986) ou nematôides (BAJAJ et alii, 1985). A enzima tem sido estudada principalmente nas interações entre plantas e fungos, provavelmente por serem os fungos os principais causadores de doenças nas plantas.

O papel das isoperoxidasas na lignificação de raízes de rabanetes (*Raphanus sativus* L.) infectadas com o fungo *Erysiphe polygoni* D.C., foi estudada por OHGUCHI et alii (1974). A atividade da enzima no extrato aumentou em resposta à infecção e atingiu um máximo 9 dias após a inoculação. Após esses 9 dias, a atividade das isoenzimas aniônicas e neutras diminuiu enquanto que a das catiônicas aumentou. A formação de produtos polimerizados pela desidrogenação dos alcoois *p*-hidroxicinâmicos (precursores da lignina) na presença das isoperoxidasas foi também demonstrado (OHGUCHI & ASADA, 1975).

Estudos citoquímicos envolvendo a atividade das peroxidases durante a penetração e infecção de folhas de feijão por *Uromyces phaseoli*, evidenciaram a presença da enzima na região de contato entre a hifa de penetração e a

célula hospedeira, sugerindo uma reação de defesa do hospedeiro (MENDGEN, 1975).

Discos de folhas de alpiste (*Phalaris canariensis* L.) inoculados com vários fungos, patogênicos ou não, reagiram com a formação de papilas. A formação de papilas foi inibida pelo tratamento com ciclohexamida, sugerindo o envolvimento da síntese de proteínas na resposta (VANCE & SHERWOOD, 1976b). O conteúdo de lignina e as atividades de enzimas envolvidas na lignificação foram avaliados nos discos de folhas inoculados com *Helminthosporium avenae*. Um alto conteúdo de lignina e uma alta atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, tirosina amônia-liase, ligase dos ácidos hidroxicinâmicos e peroxidase foram encontrados nos tecidos, 18 horas após a inoculação. A atividade das peroxidases aumentou em duas vezes, sugerindo que esse aumento foi devido à tentativa de penetração do fungo e não apenas ao ferimento (VANCE & SHERWOOD, 1976b). Peroxidases foram detectadas histoquimicamente nas regiões onde o fungo tentou penetrar o tecido hospedeiro. O aparecimento de 3 isoperoxidasas catiônicas sugeriram o envolvimento dessas isoenzimas na resposta da planta. Uma das isoenzimas não foi detectada em material tratado com ciclohexamida ou no tecido não inoculado. Concluiu-se que essas isoperoxidasas poderiam estar envolvidas na biossíntese de lignina nos pontos de penetração do patógeno (UENG & DALY, 1985). Resultados

similares foram obtidos quando se inocularam discos de folha de alpiste com *Botrytis cinerea* (VANCE & SHERWOOD, 1977). Com base nos resultados acima, os autores sugeriram que o alpiste possui um mecanismo de proteção localizado, o qual pode ser induzido e está relacionado com a lignificação da parede celular do hospedeiro (VANCE & SHERWOOD, 1977).

Em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), observou-se aumento na atividade das peroxidases 72 horas após a inoculação com *Phytophthora infestans* (Mont.) de By. Esse aumento coincidiu com uma alteração de 46% a mais na taxa respiratória em relação ao material não inoculado. Entretanto, 76 horas após a inoculação observou-se um aumento ainda maior na atividade da enzima, porém com uma taxa respiratória de 21%. Os autores concluíram que a elevação da atividade enzimática estaria relacionada com o metabolismo degenerativo e com a desorganização do tecido infectado (BRENNEMAN & BLACK, 1979).

As peroxidases também têm sido estudadas no fenômeno da indução de resistência em pepino (ARORA & BAJAJ, 1985; KUĆ, 1982 e STERMER & HAMMERSCHMIDT, 1984). HAMMERSCHMIDT et alii (1982) observaram que inoculando-se a primeira folha verdadeira de pepino com *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell & Halst., ocorria um aumento na atividade das peroxidases na segunda folha, a qual apresentava uma maior proteção quando inoculada uma semana

depois com o mesmo patôgeno. Aumentos na atividade da enzima não foram correlacionados com a indução de resistência à bactéria *Pseudomonas tabaci* (Wolf & Foster) Stevens em fumo, mas foram associados com o fermento produzido durante a inoculação (NADOLNY & SEQUEIRA, 1980).

2.7. Peroxidasas nas interações do milho com fungos

O papel das peroxidases nas doenças do milho têm sido estudado com diferentes patógenos fúngicos. Os híbridos de milho, Pr1 resistente à *H.carbonum* raças 1 e 2, e Pr resistente à raça 2 e suscetível à raça 1 foram usados por JENNINGS et alii (1969) no estudo das atividades das peroxidases e polifenoloxidasas durante o processo de infecção. O híbrido Pr1 apresentou maior atividade das peroxidases após a inoculação, quando comparado com material não inoculado. No híbrido Pr a atividade das peroxidases foi maior nas folhas inoculadas com a raça 2 do fungo (interação de resistência) quando comparado com o controle, enquanto que folhas infectadas com a raça 1 (interação de suscetibilidade) apresentaram um aumento de 3 vezes com relação ao controle. Nenhuma nova isoperoxidase foi encontrada em resposta à inoculação. Visto que as alterações na atividade das peroxidases não foram observadas durante os estágios iniciais da infecção, os autores sugeriram que essas alterações poderiam ser devidas

aos processos degenerativos iniciados nos tecidos pela infecção. Além disso, a atividade das peroxidases parecia estar associada principalmente com a resposta de suscetibilidade dos híbridos do que com a de resistência ao fungo.

Com relação às isoperoxidasas, a inoculação de folhas de milho suscetível com *H. carbonum*, raças 1 ou 2, evidenciaram a presença de 8 isoenzimas anódicas e 7 catódicas (HOFFMAN & ZSCHEILE, 1974). Os extratos das folhas foram obtidos 36 e 110 horas após a inoculação e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida. Os géis que continham extrato de tecido inoculado, apresentaram bandas coradas mais intensamente, refletindo aumentos na atividade das peroxidases. O aumento verificado em uma banda específica da enzima foi correlacionado com a suscetibilidade do hospedeiro ao fungo ou à toxina do fungo (HOFFMAN & ZSCHEILE, 1974).

A atividade das peroxidases também foi avaliada em híbridos de milho contendo citoplasma macho fértil ou macho estéril, após a inoculação com *H. maydis*, raça T (MACRI et alii, 1974). A atividade da enzima foi maior no material inoculado do que no controle não inoculado, coincidindo com o aparecimento de pontos cloróticos nas folhas. Essa diferença em relação ao controle aumentou até 60 horas após a inoculação. Nas 30 horas seguintes, a atividade continuou a aumentar nas

plantas resistentes (citoplasma macho fértil) e diminuiu nas suscetíveis (citoplasma macho estéril), ficando eventualmente igual ao nível de atividade nos tecidos controle. Esse aumento na atividade das peroxidases nas interações de resistência ou suscetibilidade foi associado com alterações na integridade celular em decorrência da infecção. Nenhuma explicação foi fornecida para o aumento contínuo na atividade da enzima no tecido resistente. Resultados semelhantes foram obtidos por BIRECKA et alii (1975) e BIRECKA & GARRAWAY (1978). Nenhuma diferença na atividade das peroxidases foi observada nas primeiras 22 horas após a inoculação das folhas de 2 híbridos de milho (macho fértil e macho estéril) com *H. maydis*, raça 0 ou T. No segundo dia após a inoculação, com o aumento gradativo dos sintomas nas folhas, foi observado um aumento na atividade da enzima. Análises eletroforéticas de folhas sadias, feridas mecanicamente ou inoculadas com a raça T revelaram a presença das mesmas 6 isoperoxidasas anódicas e 4 catódicas na fração solúvel e, 4 catódicas e 2 anódicas na fração contendo as isoperoxidasas ligadas ionicamente à parede celular. Nenhuma nova isoenzima foi detectada. Em vista dos resultados, os autores sugeriram que as mudanças na atividade das peroxidases podiam ser associadas com a resposta não específica dos tecidos ao ferimento.

CADENA-GOMES & NICHOLSON (1987) trabalhando com mesocótilos de linhagens de milho (B73Ht e B73Htrhm) e

com os fungos *H. maydis* e *Colletotrichum graminicola*, observaram, através de testes histoquímicos, respostas positivas para a presença das peroxidases tanto nas papilas formadas em resposta à inoculação como também na parede celular das células próximas aos pontos de penetração dos fungos. Um aumento na atividade da peroxidase solúvel foi observado 36 horas após a inoculação, tanto na interação de resistência como na de suscetibilidade. Por outro lado, não foram observadas diferenças na atividade das peroxidases ligadas ionicamente ou covalentemente à parede celular do hospedeiro. Análises eletroforéticas mostraram a presença de 8 isoperoxidasas anódicas nos extratos obtidos de material controle não inoculado. No caso de extratos de material inoculado, o aparecimento de 2 novas isoperoxidasas foi evidenciado 24 horas após a inoculação, tanto na interação de resistência como na de suscetibilidade. A partir desses resultados, os autores sugeriram que as novas isoenzimas estariam associadas com a formação de papila, e que as mesmas fariam parte de uma resposta de defesa não específica do milho à infecção fúngica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Hospedeiro

Foram utilizadas sementes de milho (*Zea mays* L.) do híbrido duplo AG-303 fornecido pela Sementes Agroceres S/A (Jacarezinho, Pr). Esse híbrido apresenta-se suscetível ao *H. maydis*, raça 0 e resistente ao *H. carbonum*, raça 1 (PASCHOLATI et alii, 1985).

Mesocótilos estiolados de milho foram produzidos segundo a técnica descrita por HEIM et alii (1983). Sementes do híbrido foram embebidas em água destilada, sob aeração. Após 6 h, as sementes foram colocadas para germinar entre camadas de papel de germinação umedecidos e incubadas no escuro à 28°C. O material foi mantido nessas condições até o mesocótilo atingir um tamanho aproximado de 40 mm (+/- 5 dias após a semeadura em papel).

Plântulas de milho foram obtidas através do plantio de oito sementes em sacos plásticos de 900 cm³ de capacidade, contendo mistura de terra e areia na proporção de 3:1. Após o plantio, os sacos plásticos foram mantidos em casa-de-vegetação, sob condições de luz e temperatura

ambiente. Após a germinação, foi efetuado um desbaste deixando-se de 4 a 5 plantas/saco plástico. Dez dias após o plantio, foi efetuada adubação utilizando-se o adubo em pó Ouro Verde (Takenaka S.A. Indústria e Comércio - SP). Duas gramas do adubo foram diluídas em 1 litro de água. Cinquenta ml da solução foram colocados em cada saco plástico. As plântulas de milho foram utilizadas no estágio de 4 ou 5 folhas, normalmente 21 dias após o plantio.

3.2. Fungos

Os isolados de *Helminthosporium carbonum* Ullstrup, raça 1 e *Helminthosporium maydis* Nisik. e Miy., raça 0 utilizados no presente trabalho, foram obtidos junto a micoteca da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo.

O cultivo dos fungos foi efetuado em placas de Petri, contendo o meio de batata-dextrose-ágar (BDA). Após a repicagem dos fungos, as placas foram mantidas em condições de temperatura ambiente (20 a 30 °C) e luminosidade constante obtida através de um conjunto de lâmpadas fluorescentes.

3.3. Obtenção das suspensões de esporos e inoculação

As inoculações foram efetuadas, utilizando-se suspensões de esporos obtidas de culturas com 12 a 15 dias de idade. Os esporos foram suspensos em água bidestilada estéril contendo Tween 20 (1 gota/100 ml de suspensão) como agente humectante (HEIM et alii, 1983). A concentração de esporos na suspensão variou de acordo com os requisitos experimentais e foi determinada com o auxílio de um hematocitômetro.

As suspensões de esporos foram aspergidas sobre o tecido hospedeiro, até a obtenção de uma cobertura uniforme do mesmo, tendo-se nitrogênio como gás propelente. Para todos os experimentos, zero hora correspondeu ao tempo em que foi efetuada a inoculação. Após a inoculação, o material foi colocado em câmara de crescimento regulada para 28 °C e fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro. A luz, fornecida através da combinação de lâmpadas fluorescentes e incandescentes, foi equivalente a 1500 lux. Durante as primeiras 24 h após a inoculação, a umidade foi mantida a aproximadamente 100%, com o auxílio de umidificadores.

3.4. Observações microscópicas

As curvas de tempo relativas à germinação dos esporos, formação de apressórios e papilas nos tecidos de milho foram obtidas pelo uso de pedaços de epiderme

retirados de mesocôtilos inoculados com *H. carbonum* (5 x 10⁵ esporos/ml) ou *H. maydis* (10⁵ esporos/ml). Amostras de epiderme foram coletadas durante um período de 0 a 96 h, sendo que nas primeiras 24 h, o intervalo entre as coletas foi de 3 h, aumentando-se, a seguir, o intervalo para 6 h e, finalmente, para 24 h. Pedacos de epiderme foram removidos dos mesocôtilos, com o auxilio de lâminas de barbear, colocados sobre lâminas de microscopia e corados com azul de lactofenol para interromper o desenvolvimento do fungo (TUIITE, 1969). Foram realizadas 3 repetições para cada tratamento, sendo que em cada repetição foram contados no mínimo 100 esporos.

3.5. Extração e determinação da atividade da peroxidase

Aproximadamente 1 g de tecido de mesocôtilo ou de folha foi homogeneizado em 15 ou 30 ml, respectivamente, de tampão fosfato 0,01 M, pH 6 com o auxilio de um homogeinizador Ultra-Turrax (10 s na velocidade máxima). O homogenato foi filtrado em gaze e, então, centrifugado a 20.000 g durante 25 min. O sobrenadante obtido foi considerado como a fração contendo as peroxidases solúveis. O sobrenadante foi coletado e armazenado a 4 °C, até o momento de se determinar a

atividade enzimática e a concentração de proteínas. Todo o processo de extração das peroxidases foi conduzido a 4 °C.

A atividade das peroxidases foi determinada à temperatura ambiente, através de método espectrofotométrico direto, como descrito por HAMMERSCHMIDT et alii (1982). A mistura da reação consistiu de 2,9 ml de uma solução contendo 250 µl de guaiacol e 306 µl de peróxido de hidrogênio em 100 ml de tampão fosfato 0,01 M (pH 6) e 0,1 ml da preparação enzimática. Nos experimentos seguintes, o extrato enzimático foi diluído 10 vezes (material de mesocôtilos) ou 5 vezes (material de folhas), antes de se determinar a atividade da enzima. A cubeta de referência consistiu de 3,0 ml da solução contendo 250 µl de guaiacol e 306 µl de peróxido de hidrogênio em 100 ml de tampão fosfato 0,01 M (pH 6). A reação foi seguida em espectrofotômetro (Pye Unicam, SPB-400) à 470 nm.

Os resultados foram expressos em unidades de absorção/min/grama de peso fresco ou unidades de absorção/min/mg de proteína. A dosagem das proteínas foi efetuada pelo método de Lowry (LOWRY et alii, 1951), tendo albumina de soro bovino como padrão.

3.6. Influência de diferentes substratos na atividade da peroxidase *in vitro*

Ensaio preliminares foram realizados com o objetivo de se verificar qual era o melhor substrato para a determinação da atividade enzimática *in vitro*. Os compostos testados foram, guaiacol, pirogalol, o-dianisidina, catecol e benzidina. A mistura para a reação consistiu de 2,9 ml de uma solução contendo 22 mM de substrato em tampão fosfato 0,01 M, pH 6 e 0,1 M de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) utilizado como doador de hidrogênio. Extrato enzimático (0,1 ml) foi adicionado para se iniciar a reação, a qual foi seguida em espectrofotômetro à 470 nm. Nesse experimento utilizaram-se extratos obtidos de folhas de plantas saudáveis.

3.7. Atividade da peroxidase em extratos obtidos de mesocôtilos

3.7.1. Mesocôtilos inoculados

A atividade da peroxidase em mesocôtilos foi estudada durante o período de 0 a 72 h após a inoculação com *H. carbonum* ou *H. maydis*, como descrito em 3.3. e 3.5. As amostras foram coletadas a intervalos de 12 h durante as 48 h iniciais. A última amostra foi coletada 72 h após a inoculação.

A influência da concentração de esporos na atividade da peroxidase nos mesocôtilos foi também

avaliada. Nesse experimento, foram utilizadas suspensões de esporos com concentrações variando de 10^2 a 10^6 esporos/ml e a atividade da peroxidase foi determinada 48 h após a inoculação. Amostras de tecidos não inoculados serviram como controle.

3.7.2. Mesocôtilos feridos

Mesocôtilos foram friccionados com uma suspensão aquosa de carborundo na concentração de 4%. Após o ferimento, o material foi colocado em câmara de crescimento regulada para 28°C e fotoperíodo de 14 h de luz. A umidade da câmara foi mantida em aproximadamente 100% durante as primeiras 24 h após o ferimento. Foram coletadas amostras durante um período de 0 a 96 h após o ferimento, com intervalos de 24 h entre cada coleta. A atividade da enzima foi determinada como descrito em 3.5.

A atividade da peroxidase nos mesocôtilos em resposta ao ferimento com diferentes concentrações de carborundo também foi estudada. Nesse experimento, foram utilizadas suspensões aquosas de carborundo nas concentrações de 0, 0,5, 1, 2 e 4%. A atividade da enzima foi avaliada 48 h após o ferimento.

3.8. Atividade da peroxidase em extratos obtidos de folhas

3.8.1. Folhas inoculadas

Plântulas de milho, no estágio de 4 ou 5 folhas, foram inoculadas com *H. carbonum* ou *H. maydis*, como descrito em 3.3. Nesse experimento, foi avaliada a atividade da enzima durante um período de 0 a 96 h após a inoculação, como descrito em 3.5. Amostras de tecido foliar (4ª folha) foram coletadas a intervalos de 24 h. Foram efetuadas 3 repetições para cada tratamento. Amostras de tecidos não inoculados serviram como controle.

3.8.2. Folhas feridas

Folhas de milho foram friccionadas com suspensão aquosa de carborundo na concentração de 4%. O material foi mantido em câmara de crescimento regulada para 28 °C e fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro. Durante as primeiras 24 h após o tratamento, a umidade foi mantida a aproximadamente 100% com o auxílio de umidificadores. Amostras de tecido da 4ª folha foram coletadas durante um período de 0 a 96 h após o ferimento, com intervalos de 24 h entre cada coleta. A atividade da enzima foi determinada como descrito em 3.5.

3.9. Eletroforese, em gel de poliacrilamida, de extratos de folhas inoculadas ou feridas

Amostras para eletroforese foram coletadas 0, 12, 24 e 48 h após a inoculação com *H. carbonum* ou *H. maydis*. Coletou-se também material ferido com carborundo 4%, como descrito acima. Folhas sadias foram utilizadas como controle.

Os extratos enzimáticos, destinados à eletroforese, foram obtidos através da homogeneização de 3 g de tecido foliar em 40 ml de tampão fosfato 0,01 M, pH 6 contendo 10% de sacarose, conforme descrito em 3.5. Após a extração, os sobrenadantes obtidos foram centrifugados durante 1 h à 60.000g, dialisados (saco de diálise com capacidade de exclusão de moléculas menores do que 10.000 daltons) durante 24 h contra tampão fosfato 0,01 M, pH 6. A seguir, o material foi concentrado para 3 ml com o auxílio de polietilenoglicol 6000.

A eletroforese anódica em gel de poliacrilamida foi conduzida, utilizando-se equipamento de eletroforese vertical (Pharmacia, EPS 500/400), em placa (15 cm de largura por 18 cm de comprimento). O gel de poliacrilamida utilizado foi de 3,5% (gel concentrador) e 15% (gel de corrida). Como tampão de corrida, utilizou-se TRIS-HCl 0,25 mM, pH 8,3 contendo glicina (192mM). Aplicou-

se nos "pocinhos" 25 μ l de cada amostra com atividade enzimática previamente padronizada em 1,5 unidades de absorbância/min/g de peso fresco, conforme descrito em 3.5. Como corante de corrida, utilizou-se o azul de bromofenol a 0,25%. Após a aplicação das amostras, a placa foi mantida sob corrente constante de 200V e 30 mA até que as amostras entrassem no gel concentrador, aumentando-se, então, a voltagem para 400V. Essas condições foram mantidas até o final da corrida. Com o objetivo de se obter uma melhor separação das isoenzimas, aplicou-se mais 20 μ l do corante de corrida quando o mesmo atingiu o final da placa e interrompeu-se a eletroforese quando esse atingiu o meio da placa. Após a eletroforese, para a visualização das bandas da peroxidase, o gel foi imerso em solução de benzidina (60mg) e H₂O₂ (1 ml) em 100 ml de tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5, à temperatura ambiente. Após 30 min, os géis foram lavados com água e colocados em solução de ácido acético 7% para a fixação da coloração. Após 15 min, os géis foram lavados em água destilada e armazenados em água destilada.

Após a coloração das bandas, os géis anódicos foram analisados em densitômetro (Desaga) para se identificar as bandas que representavam isoenzimas. Para a análise no densitômetro, utilizou-se filtro de 405 nm.

3.10. Substratos para a coloração de peroxidase em gel de poliacrilamida

Varios compostos foram testados como substratos para localização das isoperoxidasas nos géis, após a eletroforese. Os compostos utilizados foram o guaiacol, pirogalol, *O*-dianisidina, catecol e benzidina. Para a reação, os géis foram imersos por 30 min em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5, contendo o substrato específico na concentração de 3,3 mM e acrescido ou não de peróxido de hidrogênio (1 ml/100ml de tampão acetato). Após a coloração das bandas, os géis foram fixados em ácido acético 7% (15 min) e armazenados em água destilada. O extrato enzimático utilizado nesse experimento foi obtido de folha de milho sadia 25 dias após o plantio.

4. RESULTADOS

4.1. Curva de tempo do desenvolvimento dos fungos e da formação de papilas no hospedeiro

Quando mesocôtilos estiolados do híbrido AG-303 foram inoculados com *H. carbonum* e colocados na luz, estes apresentaram um acúmulo de pigmentos vermelhos, provavelmente antocianina, o qual foi mais acentuado ao redor dos pontos de penetração do patôgeno. Foi também observada uma redução significativa no acúmulo de antocianina, ficando o mesocôtilo não pigmentado ou com uma pigmentação amarelada quando estes foram inoculados com *H. maydis* e então colocados na luz.

Como pode ser observado na Figura 1 (Apêndice 1), tanto na interação de resistência (*H. carbonum*) como na interação de suscetibilidade (*H. maydis*), os esporos inoculados em mesocôtilos de milho atingiram um máximo de germinação (aproximadamente 80%) ao redor de 9 horas após a inoculação. No mesmo gráfico é possível observar que o início da formação de apressórios ocorreu, em ambas as interações, ao redor de 6 horas após a inoculação. Aproximadamente 18 horas após a inoculação, a formação

atingiu um máximo de 45 e 50%, nas interações de resistência e de suscetibilidade, respectivamente. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na germinação ou na formação de apressórios pelos fungos envolvidos nas diferentes interações.

A formação de papilas em ambas as interações começou a ser evidenciada somente 9 horas após a inoculação. A relação máxima do número de papila por apressório foi observada entre 30 e 36 horas após a inoculação (Apêndice 1, Figura 1). A relação entre o número de papilas e o número de apressórios atingiu um máximo de 0,95 com 30 horas após a inoculação na interação de suscetibilidade e 0,91 com 36 horas após a inoculação na interação de resistência. Nenhuma diferença significativa foi observada na relação papila/apressório entre as combinações de resistência e suscetibilidade.

4.2. Influência de diferentes substratos na atividade da peroxidase *in vitro*.

Todos os substratos testados foram catalizados pela enzima peroxidase (Apêndice 1, Figura 2). Entretanto, a atividade da enzima foi mais intensa com o guaiacol como substrato, seguido pela benzidina, o-dianizidina, pirogalol e por último catecol.

4.3. Atividade da peroxidase em extratos obtidos de mesocôtilos

4.3.1. Mesocôtilos inoculados

A atividade da peroxidase em mesocôtilos de milho foi semelhante na interação de resistência e no tratamento controle em todos os intervalos de tempo após a inoculação (Apêndice 1, Figura 3A), subindo de ± 20 em 0 h até ± 60 em 72 h. Porém, na interação de suscetibilidade, ocorreu um aumento na atividade da enzima no intervalo de tempo entre 24 e 48 horas, sendo que no intervalo entre 36 e 72 horas esse aumento mostrou-se estatisticamente significativo (ao nível de 5%) em relação ao material inoculado com *H. carbonum* ou aspergido com água estéril. Entre 48 e 72 horas a atividade permaneceu constante na interação de suscetibilidade (Apêndice 1, Figura 3A). Os resultados se repetiram quando os dados foram expressos como atividade específica (Apêndice 1, Figura 3B).

Observou-se um aumento na atividade da peroxidase em função da concentração de esporos de *H. maydis* inoculados sobre os mesocôtilos (Apêndice 1, Figura 4). Esse aumento foi significativamente diferente do controle (ao nível de 5%), em todas as concentrações de esporos utilizadas. No material inoculado com *H. carbonum*, a atividade enzimática foi maior que no controle. Entretanto,

somente nos mesocôtilos inoculados com 103, 105 e 106 esporos/ml é que a atividade diferiu significativamente do controle ao nível de 5% (Apêndice 1, Figura 4A). Quando os resultados foram expressos com base na atividade específica, observou-se diferença significativa, ao nível de 5%, em todas as concentrações de *H. maydis* testadas. Por sua vez, no material inoculado com *H. carbonum*, somente as concentrações 102, 103 e 106 é que diferiram significativamente do controle ao nível de 5% (Apêndice 1, Figura 4B).

4.3.2. Mesocôtilos feridos

Em mesocôtilos feridos mecanicamente com carborundo, observou-se um aumento na atividade da peroxidase no intervalo de tempo entre 0 e 48 h após o ferimento. Entre 48 e 72 h a atividade enzimática permaneceu estável e, entre 72 e 96 h a atividade diminuiu, chegando próxima ao nível do controle (Apêndice 1, Figura 5A). Somente 72 h após o ferimento é que a atividade diferiu significativamente do controle (ao nível de 5%). Quando os resultados foram expressos como atividade específica, observou-se um aumento na atividade entre 0 e 48 h após o ferimento, ocorrendo, então, um decrescimo com valor próximo ao nível do controle (Apêndice 1, Figura 5B). No experimento em que se utilizou diferentes concentrações de carborundo observou-se um aumento na atividade enzimática em função da

concentração do agente abrasivo, atingindo um patamar em 2% e 4%. Nas concentrações 1, 2 e 4%, a atividade enzimática foi significativamente diferente do controle ao nível de 5% (Apêndice 1, Figura 6A). Quando os resultados foram expressos como atividade específica, não se obteve diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 5% (Apêndice 1, Figura 6B).

4.4. Atividade da peroxidase em extratos obtidos de folhas

4.4.1. Folhas inoculadas

Quando folhas do híbrido AG-303 foram inoculadas com *H.carbonum*, observou-se o aparecimento de pequenos pontos cloróticos, cerca de 24 h após a inoculação. Experimentos onde folhas do híbrido AG-303 foram inoculadas com o fungo *H.wydis*, observou-se o aparecimento de lesões encharcadas cerca de 12 h após a inoculação, as quais evoluíram para lesões necróticas, alongadas e delimitadas pelas nervuras das folhas. As lesões eram de coloração palha no centro e marrom escuro nas bordas.

A atividade da peroxidase em folhas de milho foi semelhante na interação de resistência e no controle em todos os intervalos de tempo após os tratamentos (Apêndice 1, Figura 7). Porém, na interação de suscetibilidade,

ocorreu um aumento na atividade da enzima no intervalo de tempo entre 0 e 48 h. Após esse período, a atividade enzimática permaneceu constante até o final do experimento (Apêndice 1, Figura 7A). Com exceção do tempo inicial, 0 h, em todos os outros tempos em que foram coletadas as amostras observou-se diferença significativa ao nível de 5% entre os valores encontrados para a interação de suscetibilidade e os outros dois tratamentos. Quando os resultados foram expressos como atividade específica, também foi observado um aumento na atividade enzimática na interação de suscetibilidade no intervalo de tempo entre 0 e 48 h. Entre 48 e 72 h houve uma diminuição da atividade e, após esse período a mesma permaneceu constante até o último intervalo observado (Apêndice 1, Figura 7B). Nos outros dois tratamentos, a atividade específica da peroxidase permaneceu constante durante todo o período avaliado. Com exceção dos tempos 0 e 24 h, em todas as outras amostragens observou-se diferença significativa ao nível de 5% entre a atividade da enzima presente na interação de suscetibilidade e nos outros dois tratamentos.

4.4.2. Folhas feridas

Folhas de milho feridas mecanicamente com carborundo apresentaram um aumento acentuado na atividade da peroxidase logo após o ferimento (Apêndice 1, Figura 8). Esse aumento atingiu um máximo 24 h após o tratamento. Entre

24 e 48 h a atividade permaneceu constante, entre 48 e 72 h houve um decréscimo e, após esse tempo, a atividade permaneceu constante até o último intervalo amostrado (Apêndice 1, Figura 8A). Com exceção do tempo inicial 0 h, em todos os outros tempos em que se efetuou a coleta das amostras observou-se diferença significativa ao nível de 5% entre os valores da atividade enzimática no material ferido e no controle. Os resultados se apresentaram da mesma forma quando os dados foram expressos como atividade específica (Apêndice 1, Figura 8B).

4.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Eletroforese anódica em gel de poliacrilamida das peroxidases extraídas em diferentes tempos após os tratamentos mostrou que no tempo 0 h, sob as condições experimentais do trabalho, oito isoenzimas puderam ser observadas nos diferentes tratamentos. Tais isoenzimas não diferiram do material extraído de plantas sadias (Apêndice 1, Figuras 9, 10 e 11). Entretanto, 12 h após os tratamentos, duas novas isoenzimas (isoenzimas 7 e 8) foram detectadas, havendo também o desaparecimento de três isoenzimas (isoenzimas 6, 9 e 10) tanto no material ferido como no material inoculado com *H. carbonum* ou *H. baydis* (Apêndice 1, Figuras 9, 10 e 12). No material extraído 24 e 48 h após os tratamentos, foram observadas as mesmas sete

isoenzimas presentes nos materiais tratados e as mesmas oito isoenzimas do material sadio (Apêndice 1, Figuras 9, 10, 13 e 14).

4.6. Substratos para a coloração de peroxidase em gel de poliacrilamida

A Tabela 1 (Apêndice 1) mostra que todos os substratos testados reagiram com as isoperoxidasas presentes no material extraído de folhas de milho e submetido a eletroforese, quando se utilizou H₂O₂ na reação. Entretanto, a benzidina, o guaiacol e o pirogalol mostraram uma resposta mais intensa que o catecol e a o-dianizidina. Por sua vez, quando não se utilizou H₂O₂ no experimento, a reação não foi observada.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho, mostram que as alterações ocorridas com a peroxidase em milho em resposta à inoculação com fungos ou ferimento, podem resultar de um mecanismo não específico de resposta dessa gramínea ao estresse.

Aumentos na atividade da peroxidase e alterações no seu padrão isoenzimático tem sido atribuídos à atividade oxidativa em consequência de alterações na integridade celular (MANSFIELD & HUTSON, 1980), processos degenerativos do tecido devido a infecção (BIRECKA & GARRAWAY, 1978 e WASFY et alii, 1984) e a vários tipos de estresse, entre eles o ferimento mecânico (AIST, 1977; BIRECKA et alii, 1975; HASKINS, 1955; REUVENI & PERL, 1979; STERMER & HAMMERSCHMIDT, 1984 e THORPE & HALL, 1985).

Aumentos na atividade da enzima durante o desenvolvimento de doenças também tem sido correlacionados com a expressão de resistência (ARORA & BAJAJ, 1985; ARORA & WAGLE, 1985; COFFEY & CASSIDY, 1984; HAMMERSCHMIDT et alii, 1982; REUVENI & BOTHMA, 1985; SAINI et alii, 1985; SEEVERS et alii, 1971; STERMER & HAMMERSCHMIDT, 1984; VANCE et alii,

1976 e VANCE & SHERWOOD, 1976b) ou suscetibilidade (ABBATTISTA et alii, 1982; MELLON & LEE, 1985; MENDGEN, 1975; NALDONY & SEQUEIRA, 1980 e OHGUCHI et alii, 1974). Na maioria dos trabalhos desenvolvidos, incluindo aqueles realizados com milho, aumentos na atividade da peroxidase tem sido observados somente em estágios avançados do processo infeccioso, quando um extenso processo degenerativo do tecido hospedeiro já ocorreu (BIRECKA & GARRAWAY, 1978; GARRAWAY, 1973 e JENNINGS et alii, 1969).

Por sua vez, novas isoperoxidasas tem sido relatadas em diferentes interações patôgeno-hospedeiro. Em linho (*Linum usitatissimum* L.), uma nova isoenzima foi associada com o necrosamento dos tecidos, seis dias após a inoculação com *Melampsora lini* (Ehrenb.) Lev. (COFFEY & CASSIDY, 1984). Em milho, varias isoperoxidasas tem sido encontradas em tecido sadio ou infectado (BIRECKA et alii, 1975; BIRECKA & GARRAWAY, 1978; BIRECKA & MILLER, 1974; BREWBAKER & HASEGAWA, 1975; GRISON & PILET, 1985b; GRISON & PILET, 1985c; HAMILL & BREWBAKER, 1969; HASKINS, 1955; HOFFMAN & ZSCHEILE, 1974 e JENNINGS et alii, 1969). CADENA-GOMEZ e NICHOLSON (1987) relataram a presença de oito isoperoxidasas em extratos obtidos de mesocôtilos de milho sadio, e dez isoperoxidasas em extratos obtidos 24 h após a inoculação com *H. maydis*. O aparecimento dessas duas novas isoenzimas ocorreu tanto na linhagem resistente como na linhagem suscetível.

Com relação ao estresse, CHANG et alii (1984) observaram o aparecimento de três novas isoperoxidasas em folhas de plantas de inhame cultivadas em 50% de água do mar quando comparadas com o controle. No caso do milho, BIRECKA et alii (1975) não observaram diferenças no padrão isoenzimático de extratos obtidos de folhas sadias ou feridas mecanicamente.

5.1. Atividade da peroxidase em extratos obtidos de mesocôtilos ou folhas inoculadas

DUKE & NAYLOR (1976) demonstraram que mesocôtilos de milho, quando colocados na luz, apresentavam um acúmulo de antocianina em função do tempo. HEIM et alii (1983) demonstraram que o acúmulo de antocianina é um indicador de resistência ou suscetibilidade de cultivares de milho a um determinado patógeno. Em reações de resistência ocorre um acúmulo de antocianina e sua concentração pode eventualmente exceder a do controle não inoculado. Em contraste ao que foi observado na interação de resistência, HEIM et alii (1983) relataram que na interação de suscetibilidade ocorria uma redução significativa no acúmulo de antocianina, ficando o mesocôtilo não pigmentado ou com uma pigmentação amarelada. Os mesmos sintomas foram observados no presente trabalho, quando mesocôtilos do

híbrido AG-303 foram inoculados com *H.carbonum* (interação de resistência) ou *H.maydis* (interação de suscetibilidade).

HEIM et alii (1983) observaram que folhas de milho resistente a *H.carbonum* raça 1, quando inoculadas com esse patógeno, apresentavam pequenos pontos cloróticos considerados como uma reação típica de resistência. Segundo BALMER (1980), os sintomas típicos em folhas de milho infectadas com *H.maydis* raça 0 são representados por lesões alongadas, medindo aproximadamente 0,5 cm de largura por 1 a 2 cm de comprimento, de coloração marrom claro a marrom castanho, com lados paralelos, podendo os bordos das lesões apresentar uma coloração mais escura que a parte central. Os mesmos sintomas foram observados no presente trabalho, quando folhas do híbrido de milho AG-303 foram inoculadas com *H.carbonum* (interação de resistência) ou *H.maydis* (interação de suscetibilidade).

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que, tanto no mesocótilo (Apêndice 1, Figuras 3 e 4) como na folha (Apêndice 1, Figura 7), ocorre um aumento acentuado na atividade da enzima em resposta a inoculação com *H.maydis* (interação de suscetibilidade) quando comparado com aquela do controle não inoculado ou do material inoculado com *H.carbonum* (interação de resistência). Esse aumento também foi observado quando os dados foram expressos com base na atividade específica.

Mudanças na atividade da peroxidase em plantas inoculadas quando comparadas com plantas controle não inoculadas tem sido relatadas em várias interações patógeno-hospedeiro (ABBATTISTA et alii, 1982; ARORA & BAJAJ, 1985; ARORA & WAGLE, 1985; MELLON & LEE, 1985; MENDGEN, 1975; OHGUCHI et alii, 1974; REUVENI & BOTHMA, 1985; SEEVERS et alii, 1971 e VANCE & SHERWOOD, 1976b). Essas mudanças tem sido relacionadas tanto com a resistência quanto com a suscetibilidade. MAGRO et alii (1983) relataram que bulbos de cebola resistentes à *Botrytis allii* apresentaram maior atividade da peroxidase que os bulbos suscetíveis. ARORA et alii (1986) observaram que plantas de painço inoculadas com *S.graminicola* apresentaram aumento na atividade das peroxidases em interações de suscetibilidade, enquanto nas interações de resistência a atividade da enzima não diferiu daquela presente nas plantas do tratamento controle. CADENA-GOMEZ & NICHOLSON (1987) observaram um aumento na atividade da enzima em mesocótilos de milho inoculados com *H. maydis*. Esse aumento ocorreu tanto na interação de resistência quanto na de suscetibilidade e foi significativamente diferente do controle somente 18 h após a inoculação, período no qual os autores observaram a máxima formação de papílas.

A literatura tem citado diversos fatores como responsáveis pelo aumento da atividade da peroxidase em interações compatíveis (URITANI & OBA, 1979; VAN LOON, 1986

e WARD, 1986). Entre esses fatores poderíamos citar o envolvimento da enzima no processo de reparo do tecido danificado pelo patógeno. Este envolvimento seria através da biossíntese de lignina - polímero que pode ser utilizado no reparo de tecidos danificados (WARD, 1986) - visto que a peroxidase faz parte do último passo na oxidação dos álcoois cinâmicos que leva à formação da lignina (GROSS, 1979 e HARKIN & OBST, 1973). Outro fator envolvido no aumento da atividade da peroxidase em interações de suscetibilidade é o hormônio vegetal etileno (DALY et alii, 1970; HISLOP & STAHMANN, 1971; URITANI & OBA, 1979; VAN LOON, 1986 e WARD, 1986). A literatura apresenta diversos trabalhos onde se observa um aumento na produção do hormônio em tecido infectado (CHALUTZ et alii, 1969; DALY et alii, 1970; HISLOP & STAHMANN, 1971 e MONTALBINI & ELSTNER, 1977), aumento esse devido ao ferimento causado pelo patógeno no tecido hospedeiro (LEE et alii, 1970). Assim, alterações na atividade da enzima podem estar relacionadas com a produção de etileno, visto a peroxidase fazer parte da via metabólica responsável pela biossíntese desse hormônio (BOYER & DE JAEGER, 1986). Um terceiro fator que pode estar relacionado com alterações na atividade da peroxidase em interações compatíveis é a descompartimentalização de compostos presentes em organelas no citoplasma bem como a liberação de compostos ligados à membrana, tais como fenóis, ácidos

graxos e enzimas oxidativas, que ocorrem devido ao dano causado pelo patógeno ao tecido hospedeiro (WARD, 1986).

No caso do presente trabalho com milho, o aumento na atividade da peroxidase na interação de suscetibilidade com *H. maydis* pode ser devido aos três fatores acima citados. Embora os experimentos conduzidos não tenham abordado esses fatores, pode-se sugerir que durante essa interação ocorreria uma maior injúria do tecido hospedeiro, o que poderia levar a produção de lignina para o reparo desse dano. Essa injúria causada pelo fungo poderia, também, levar a um aumento na produção de etileno bem como a descompartimentalização e liberação de compostos, entre eles a enzima peroxidase e seus substratos.

Existem também diversos relatos na literatura que sugerem o envolvimento de diferentes fatores no aumento da atividade da peroxidase em interações incompatíveis (VAN LOON, 1986 e WARD, 1986). Dentre esses fatores, pode-se citar a inativação dos patógenos através de produtos oxidados pela peroxidase e peróxido de hidrogênio, tais como os fenóis (FRIEND, 1981). Essa inativação poderia ser atribuída a habilidade desses compostos em reagir e, portanto, inativar certas substâncias biológicas importantes tais como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (MASON & PETERSON, 1965 e STAHMANN et alii, 1977). No caso das quinonas, além de serem tóxicas aos patógenos, elas poderiam se complexar com proteínas formando uma barreira nos pontos

de infecção (LEATHAM et alii, 1980 e WARD, 1986). Além das barreiras químicas citadas acima, existem também situações em que o patógeno poderia ter seu desenvolvimento contido pelo hospedeiro através de uma barreira física (HAMMERSCHMIDT, 1984). Essa barreira poderia resultar da deposição de lignina, cuja síntese seria mediada pela peroxidase, o que impediria o avanço do patógeno nos tecidos (WARD, 1986).

Normalmente, as alterações na atividade da peroxidase nas interações de resistência ocorrem nos primeiros estágios do processo de infecção (VAN LOON, 1986 e WARD, 1986). No caso do presente trabalho não foram observados aumentos na atividade da enzima na interação de resistência do milho com *H.carbonum*, quando comparado com o tratamento controle não inoculado. A não observação de diferenças na atividade entre os extratos de plantas inoculadas com *H.carbonum* e os extratos obtidos de tecidos não inoculados, poderia ser devida à metodologia utilizada, a qual não permitiria a detecção de pequenas alterações na atividade da peroxidase.

5.2. Atividade da peroxidase em extratos obtidos de mesocótilos ou folhas feridas.

Com base no fato de que os microrganismos utilizados no presente trabalho penetram no hospedeiro

diretamente através da cutícula causando, por isso, ferimentos nos tecidos, decidiu-se verificar o comportamento da peroxidase em milho em resposta ao ferimento causado por um agente abrasivo.

Os resultados apresentados nesse trabalho mostram que, tanto nos mesocótilos (Apêndice 1, Figuras 5 e 6) quanto nas folhas (Apêndice 1, Figura 8) de plantas de milho ocorre um aumento na atividade da enzima em tecido ferido com carborundo quando comparado com o tratamento controle não ferido. Logo após esse aumento, observou-se uma queda na atividade enzimática. Esse padrão de atividade também foi observado quando os dados foram expressos com base na atividade específica.

A literatura mostra que após a injúria dos tecidos vegetais, uma variedade de atividades metabólicas tem início, as quais deverão resultar na cicatrização do ferimento (WARD, 1986). Dentre essas atividades pode-se citar a regeneração das membranas, os aumentos na respiração, a biossíntese de fenilpropanóides, as mudanças na atividade hormonal e a síntese de proteínas (KAHL, 1982).

Uma das características do tecido ferido é o aumento na atividade da peroxidase (KAHL, 1978). Porém, o papel dessa enzima nas respostas de tecidos feridos ainda não está bem claro. Acredita-se que ela esteja envolvida na oxidação do ácido indolacético (MEUDT & STECHER, 1972) e na

biossíntese de etileno (MAPSON & WARDALE, 1972), flavonóides (RATHMELL & BENDALL, 1972) e lignina (HARKIN & OBST, 1973).

Todos os processos iniciados após o ferimento levam à formação de lignina e suberina, a deposição de hidroxiprolina e a regeneração da parede celular (WARD, 1986). Em alguns casos, pode ocorrer a divisão celular e, finalmente, a restauração do tecido ao seu estado de metabolismo normal (WARD, 1986).

Com base na literatura, acredita-se que o aumento observado na atividade da peroxidase no presente trabalho reflete parte do processo metabólico que teria como finalidade a restauração do tecido danificado. Após a integridade do tecido ter sido restaurada, o metabolismo voltaria ao normal, o que pode ser sugerido pela diminuição da atividade da enzima observada nos diferentes experimentos.

5.3. Isoperoxidasas em folhas inoculadas ou feridas

Os resultados apresentados nesse trabalho (Apêndice 1, Figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14), mostram que no tempo 0 h (início do experimento) foram observadas oito isoenzimas nos diferentes extratos obtidos de folhas de milho, independente do tratamento. Entretanto, 12 h após os tratamentos, duas novas isoenzimas (isoenzimas 7 e 8) foram detectadas, havendo também o desaparecimento de três

isoenzimas (isoenzimas 6, 9 e 10), tanto no material ferido quanto no material inoculado com *H. carbonum* ou *H. maydis*. Nos materiais extraídos 24 e 48 h após os tratamentos, observou-se as mesmas sete isoenzimas dos extratos de tecidos tratados e, as mesmas oito no material controle não tratado.

A literatura apresenta diversos relatos sobre o surgimento de novas isoperoxidasas em tecidos vegetais em resposta tanto à inoculação quanto ao ferimento (CADENA-GOMEZ & NICHOLSON, 1987; VAN LOON, 1986; WARD, 1986 e ZIMMERMANN & ROSENSTOCK, 1976). De acordo com KAHL (1978), as isoenzimas teriam diferentes funções, as quais estariam relacionadas com a distribuição diferencial dessas enzimas nos tecidos.

Em tecido infectado, a maioria das alterações ocorridas com as isoperoxidasas tem sido relacionadas com alterações observadas durante a senescência natural ou artificial (VAN LOON, 1986). Esse fato já era esperado, haja visto que o dreno metabólico resultante da presença do patógeno pode causar a senescência prematura dos tecidos (VAN LOON, 1986). Ocasionalmente, novas isoperoxidasas, as quais não ocorrem durante a senescência, têm sido encontradas em tecido infectado apresentando reações necróticas (FARKAS & STAHMANN, 1966; SOLYMOSY et alii, 1967 e VAN LOON & GEELEN, 1971). No caso do milho, CADENA-GOMEZ & NICHOLSON (1987) observaram duas novas isoperoxidasas 24 h após a inoculação de mesocótilos com *H. maydis*, além de um

aumento no nível da isoenzima 8 e uma diminuição no nível da isoenzima 11. Essas alterações não foram observadas em material extraído 6 h após a inoculação, tempo em que já havia ocorrido a formação de apressórios pelo patôgeno, mas não de papilas pelo hospedeiro. Com base nesses resultados, os autores sugeriram o possível envolvimento dessas duas isoperoxidasas na formação e/ou lignificação das papilas, bem como na deposição de compostos fenólicos na parede celular nos pontos de penetração pelo fungo.

Em tecido ferido, alterações no perfil isoenzimático tem sido relacionadas com a ativação de vias metabólicas que irão contribuir para o reparo dos danos causados, permitindo que o tecido restaure suas atividades metabólicas normais (KAHL, 1978 e WARD, 1986). Em tubérculos de batata feridos mecanicamente, URITANI, (1976) observou o aparecimento de uma nova isoenzima antes da formação de lignina, sendo que essa isoenzima desaparecia após uma camada do polímero ter se formado na superfície da cutícula no local do ferimento.

Com base no que foi comentado acima, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as duas novas isoenzimas formadas em tecido de milho, após a inoculação dos fungos ou o ferimento com carborundo, parecem estar relacionadas com o processo de restauração do tecido danificado. As mesmas isoenzimas aparecem tanto na interação de resistência quanto na de suscetibilidade e também no

material ferido, sendo, portanto, uma resposta não específica do milho aos ferimentos causados pelos diferentes agentes. Por sua vez, o desaparecimento das três isoenzimas nos tecidos inoculados ou feridos, possivelmente esta relacionado com o desvio metabólico que ocorre em resposta à injúria.

5.4. Considerações finais

Diversos trabalhos mostram que a destruição do tecido da planta através de ferimento provocado por um agente abiótico ou por um microrganismo, parece ter muito em comum (WARD, 1986). Vários processos, como por exemplo a biossíntese de etileno e lignina, os quais são desencadeados após o ferimento, ocorrem em ambos os casos. Dessa maneira, parece que o objetivo final comum envolve a restauração do tecido danificado, no sentido de que este retorne a sua condição normal. No caso de tecido infectado, as respostas são mais complexas e a interpretação das mesmas se mostra complicada devido ao envolvimento de dois organismos distintos. Essas mesmas respostas fazem parte de mecanismos não específicos, os quais são gerados por uma grande variedade de agentes, incluindo o ferimento.

Com base nos resultados obtidos, um maior aprofundamento e refinamento nas pesquisas envolvendo o milho e a inoculação ou injúria mecânica poderia ser

conseguido através do estudo histoquímico da lignificação e da peroxidase *in situ* nos pontos de penetração dos microrganismos e da injúria mecânica. Outros aspectos que poderiam ser abordados, envolvem a observação da atividade das peroxidases ligadas ionicamente ou covalentemente à parede celular do hospedeiro, bem como o papel do hormônio vegetal etileno nas respostas dos tecidos de milho.

6. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos pode-se concluir que as alterações na atividade da peroxidase e no perfil isoenzimático em resposta à inoculação do milho com *Helminthosporium carbonum* e *Helminthosporium maydis* ou ao ferimento mecânico com carborundo mostram-se inespecíficas. Portanto, torna-se difícil estabelecer a importância da peroxidase no milho em resposta a essas condições de estresse.

APÊNDICE 1

Figura 1. Desenvolvimento de *Helminthosporium carbonum* (interação de resistência) e *Helminthosporium maydis* (interação de suscetibilidade) em mesocótilos do híbrido de milho Ag-303. (A) Porcentagem - 1) Germinação dos esporos; 2) Formação de apressórios. (B) Papilas formadas no hospedeiro em resposta a inoculação. Barras representam $\pm$ erro padrão.

Figura 2. Influência de diferentes substratos na atividade das peroxidases em extratos obtidos de folhas de milho. Atividade enzimática determinada através de método espectrofotométrico direto. Barras representam +/- erro padrão.

Figura 3. Atividade das peroxidases em extratos obtidos de mesocôtilos de milho durante diferentes tempos após a inoculação. Os mesocôtilos foram inoculados com *Helminthosporium carbonum* (interação de resistência), *Helminthosporium maydis* (interação de suscetibilidade) ou aspergidos com água estéril (controle). Resultados expressos em termos de atividade (A) ou atividade específica (B). Barras representam $\pm$ erro padrão.

Figura 4. Atividade das peroxidases em extratos obtidos de mesocótilos de milho inoculado com diferentes concentrações de esporos de *Helminthosporium carbonum* (interação de resistência), *Helminthosporium maydis* (interação de suscetibilidade) ou aspergidos com água estéril (controle). Material coletado 48 h após a inoculação. Barras representam $\pm$ erro padrão.

Figura 5. Atividade das peroxidases em extratos obtidos de mesocótilos de milho durante diferentes tempos após o ferimento. Os mesocótilos foram friccionados com suspensão aquosa de carborundo (4%) ou água estéril. Barras representam +/- erro padrão.

Figura 6. Atividade das peroxidases em extratos obtidos de mesocôtilos de milho 48 h após o fermento. Os mesocôtilos foram friccionados com diferentes concentrações de carborundo ou água estéril. Barras representam +/- erro padrão.

Figura 7. Atividade das peroxidases em extratos obtidos de folhas de milho durante diferentes tempos após a inoculação. As folhas foram inoculadas com *Helminthosporium carbonum* (interação de resistência), *Helminthosporium maydis* (interação de suscetibilidade) ou aspergidas com água estéril (controle). Barras representam +/- erro padrão.

Figura 8. Atividade das peroxidases em extratos obtidos de folhas de milho durante diferentes tempos após o ferimento. As folhas foram friccionadas com suspensão aquosa de carborundo (4%) ou água estéril. Barras representam $\pm$ erro padrão.

Figura 9. Eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de folhas obtidos em diferentes tempos após os tratamentos. Géis corados com benzidina e H₂O₂ para a visualização das isoenzimas da peroxidase. (A) controle, (B) ferido com carborundo, (C) *Helminthosporium carbonum* e (D) *Helminthosporium maydis*. (IG) intersecção entre os géis concentrador e de corrida; (CC) corante de corrida.

Figura 10. Diagrama da eletroforese anódica em gel de poliacrilamida de extratos de folhas obtidos em diferentes tempos após os tratamentos. Géis corados com benzidina e H₂O₂ para a visualização das isoenzimas da peroxidase. (A) controle, (B) ferido com carborundo, (C) *Helminthosporium carbonum* e (D) *Helminthosporium maydis*. (IG) intersecção entre os géis concentrador e de corrida; (CC) corante de corrida; números correspondem as bandas individuais de peroxidases.

Figura 11. Densitometria das amostras de 0 h do gel mostrado na Figura 9. Utilizou-se filtro de comprimento de onda 405 nm. (A) controle, (B) ferido com carborundo, (C) *Helminthosporium carbonum* e (D) *Helminthosporium maydis*. (IG) intersecção entre os géis concentrador e de corrida. Números correspondem as bandas individuais de peroxidase.

Figura 12. Densitometria das amostras de 12 h do gel mostrado na Figura 9. Utilizou-se filtro de comprimento de onda 405 nm. (A) controle, (B) ferido com carborundo, (C) *Helminthosporium carbonum* e (D) *Helminthosporium maydis*. (16) intersecção entre os géis concentrador e de corrida. Números correspondem as bandas individuais de peroxidase.

Figura 13. Densitometria das amostras de 24 h do gel mostrado na Figura 9. Utilizou-se filtro de comprimento de onda 405 nm. (A) controle, (B) ferido com carborundo, (C) *Helminthosporium carbonum* e (D) *Helminthosporium maydis*. (IG) intersecção entre os géis concentrador e de corrida. Números correspondem as bandas individuais de peroxidase.

Figura 14. Densitometria das amostras de 48 h do gel mostrado na Figura 9. Utilizou-se filtro de comprimento de onda 405 nm. (A) controle, (B) ferido com carborundo, (C) *Helminthosporium carbonum* e (D) *Helminthosporium maydis*. (IG) intersecção entre os géis concentrador e de corrida. Números correspondem as bandas individuais de peroxidase.

Tabela 1. Efeito de diferentes substratos na coloração de bandas de peroxidase de folhas de milho sadio. Coloração efetuada após eletroforese em gel de poliacrilamida, usando ou não peróxido de hidrogênio. Bandas apareceram (+ ou ++) ou não apareceram (-) no gel após a coloração.

Substratos	Reação	
	Presença de H ₂ O ₂	Ausência de H ₂ O ₂
Catecol	+	-
Pirogalol	++	-
Benzidina	++	-
Guaiacol	++	-
o-dianizidina	+	-

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABBATTISTA, G.I.; COGHE, M. & MATTA, A. Phenols, polyphenol oxidase and peroxidase in pepper plants infected by virulent and avirulent strains of *Verticillium*. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia 18:5-11, 1982.

ABELES, F.B. Physiology and biochemistry of ethylene production. In: ABELES, F.B., ed. *Ethylene in plant biology*, London, Academic Press, 1973. p.30-57.

ABU-JAWDAH, Y. & KUMMERT, J. Effect of aliette on AMV infection of bean leaves and on the resultant alterations in the patterns of proteins and peroxidases. Phytopath.Z., Berlin, 108: 294-303, 1983.

AIST, J.R. Mechanically induced wall appositions of plant cells can prevent penetration by a parasitic fungus. Science, New York, 197:568-71, 1977.

ANTHENILL, F.J. Effect of light on disease development and accumulation of phenols in corn (*Zea mays* L.) during infection with *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. and *Helminthosporium carbonum* Ullstrup. West Lafayette, 1978. 146p. (Doutorado-Universidade de Purdue).

ARORA, Y.K. & BAJAJ, K.L. Peroxidase and polyphenol oxidase associated with induced resistance of mung bean to *Rhizoctonia solani* Kuhn. Phytopath. Z., Berlin, 114: 325-31, 1985.

ARORA, Y.K.; MEHTA, N.; THAKYR, D.P. & WAGLE, D.S. Enzyme changes associated with host-parasite interactions between pearl millet and downy mildew fungus. J. Phytopathology, Berlin, 116: 97-105, 1986.

ARORA, Y.K. & WAGLE, D.J. Interrelationship between peroxidase, polyphenol oxidase activities and phenolic content of wheat for resistance to loose smut. Biochem. Physiol. Pflanzen., Jena, 180: 75-8, 1985.

BAJAJ, K.L.; SINGH, P. & MAHAJAN, R. Changes induced by *Meloidogyne incognita* in superoxide dismutase, peroxidase and polyphenoloxidase activity in tomato roots. Biochem. Physiol. Pflanzen., Jena, 180: 543-6, 1985.

BALMER,E. Doenças do milho. In: GALLI,F., coord. *Manual de fitopatologia*. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, 1980. v.2, p.385-97.

BARZ,W & HOESEL,W. Metabolism and degradation of phenolic compounds. In: SWAIN,T; HARBONE,J.B. & VAN SUMERE,C.F., eds. *Biochemistry of plant phenolics*, Belgica, Plenum Press, 1979, vol. XII, p.339-70.

BIRECKA,H.; BRIDER,K.A. & CATALFAMO,J.L. Comparative studies on tobacco pith and sweet potato root isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid, and ethylene effects. Plant Physiol., Lancaster, 52: 43-9, 1973.

BIRECKA,H.; CATALFAMO,J.L. & GARRAWAY,M.O. Cell wall and protoplast isoperoxidases of corn leaves in relation to cut injury and infection with *Helminthosporium maydis*. Plant Physiol., Lancaster, 55: 607-10, 1975.

BIRECKA,H.; CATALFAMO,J.L. & URBAN,P. Cell isoperoxidases in sweet potatoes plants in relation to mechanical injury and ethylene. Plant Physiol., Lancaster, 57: 74-9, 1976.

BIRECKA,H. & GARRAWAY,M.O. Corn leaf isoperoxidase reaction to mechanical injury and infection with *Helminthosporium maydis*: Effects of cycloheximide. Plant Physiol., Lancaster, 61: 561-6, 1978.

BIRECKA,H. & MILLER,A. Cell wall and protoplast isoperoxidases in relation to injury, indoleacetic acid, and ethylene effects. Plant Physiol., Lancaster, 53: 569-74, 1974.

BORCHERT,R. Time course and spatial distribution of phenylalanine ammonialiase and peroxidase activity in wounded potato tuber tissue. Plant Physiol., Lancaster, 62: 789-93, 1978.

BOYER,N.; CHAPELLE,B. & GASPAR,TH. Lithium inhibition of thymomorphogenetic response in *Bryonia dioica*. Plant Physiol., Lancaster, 63: 1215-16, 1979.

BOYER,N. & DE JAEGHER,G. Direct or indirect role of peroxidase in ethylene biosynthesis ? In: GREPPIN,H.; PENEL,C. & GASPAR,TH. *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Geneva, Imprimerie Nationale, 1986. p.47-60.

BREDEMEIJER, G.M.M. Peroxidases and pollination. In: GREPPIN, H.; PENEL, C. & GASPAR, TH. *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Geneva, Imprimerie Nationale, 1986, p.317-32.

BRENNEMAN, J.A. & BLACK, L.L. Respiration and terminal oxidases in tomato leaves infected by *Phytophthora infestans*. Physiological Plant Pathology, London, 14: 281-90, 1979.

BREWBAKER, J.L. & HASEGAWA, Y. Polymorphisms of the major peroxidases of maize. In: MARKERT, C.L., coord. *Isozymes III Developmental Biology*. New York, Ed. Academic Press, 1975. 1034p.

CADENA-GOMES, G. & NICHOLSON, R.L. Papilla formation and associated peroxidase activity: a non-specific response to attempted fungal penetration of maize. Physiological and Molecular Plant Pathology, London, 31: 51-67, 1987.

CATESSON, A.M.; IMBERTY, A.; GOLDBERG, R. & CZANINSKI, Y. Nature, localization and specificity of peroxidases involved in lignification processes. In: GREPPIN, H.; PENEL, C. & GASPAR, TH. ed. *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Geneva, Imprimerie Nationale, 1986, p.189-98.

CHALUTZ, E.; DEVAY, J.E. & MAXIE, E.C. Ethylene-induced isocoumarin formation in carrot root tissue. Plant Physiol., Lancaster, 44: 235-41, 1969.

CHANG, H.; SIEGEL, B.Z. & SIEGEL, S.M. Salinity-induced changes in isoperoxidases in taro, *Colocassia esculenta*. Phytochemistry, Oxford, 23: 233-5, 1984.

COFFEY, M.D. & CASSIDY, D.S.M. Peroxidase activity and induced lignification in rusted flax interaction varying in their degree of incompatibility. Can. J. Bot., Ottawa, 62: 134-41, 1984.

COUTURE, R.M.; ROUTLEY, D.G. & DUNN, G.M. Peroxidase activity, B-glucosidase activity and phenolic levels in monogenic resistant (Ht) and susceptible (Ht) maize tissues inoculated with *Helminthosporium turcicum*. Maize Genetics Cooperation News Letter, 43: 160, 1983.

CZECH-KOSLOWSKA, M. & KRZYWANSKI, Z. Phenolic compounds and the polyphenoloxidase and peroxidase activity in callus tissue culture-pathogen combination of red raspberry and *Didymella applanata* (Niessl.) Phytopath. Z., Berlin, 109: 176-82, 1984.

DALY, J.M.; SEEVERS, P.M. & LUDDEN, P. Studies on wheat stem rust resistance controlled at the Sr 6 locus. III. Ethylene and disease reaction. Phytopathology, St. Paul, 60:1648-52, 1970.

DANGE, V. & REDDY, G.M. Isolation and characterization of isoperoxidases from dee-geo-woo-gen rice seedlings. Phytochemistry, Oxford, 23: 237-9, 1984.

DECEDUE, C.J.; ROGRES, S.J. & BORCHERT, R. Molecular weight differences among potato peroxidases. Phytochemistry, Oxford, 23: 723-7, 1984.

DENNA, D.W. & ALEXANDER, M.B. The isoperoxidases of *Cucurbita pepo* L. In: MARKERT, C.L., ed. *Isozymes II. Physiological function*. New York, Academic Press, 1975. p.851-64.

DORN, S. Zur rolle von isomarticin, einem toxin von *Fusarium martii* var. *pisi*, in der pathogenese der stengel- und wurzelfaule an erbsen. Phytopathol.Z., Berlin, 81: 193-239, 1974.

DRUART,P.; KEVERS,C.; BOXUS,P. & GASPAR,TH. *In vitro* promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. Z.Pflanzenphysiol., Stuttgart, 108: 429-36, 1982.

DUKE,S.O. & NAYLOR,A.W. Light control of anthocianin biosynthesis in *Zea* seedlings. Physiologie Plantarum, Praga, 37: 62-8, 1976.

EBERMANN,R. & LICKL,E. The possible role of peroxidase isoenzymes in the infection of english oak by *Loranthus europaeus*. Phytopathology, St.Paul, 75: 1102-4, 1985.

ESPELIE,K.E. & KOLATTUKUDY,P.E. Purification and characterization of an abscisic acid-inducible anionic peroxidase associated with suberization in potato (*Solanum tuberosum*). Archives of Biochemistry and Biophysic, New York, 240: 539-45, 1985.

FARKAS,G.L. & KIRALY,Z. Enzymological aspects of plant diseases. I. Oxidative enzymes. Phytopath.Z., Berlin, 31: 251-72, 1958.

FARKAS, G.L. & STAHMANN, M.A. On the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected by southern bean mosaic virus. Phytopathology, St. Paul, 56:669-77, 1966.

FLEURIET, A. Expression et regulation du metabolisme des derives hydroxycinnamiques au cours de la croissance de la maturation et de la reaction aux blessures du fruit de la tomate "cerise" (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*). Montpellier, 1982. (These doutorado).

FLEURIET, A. & DELOIRE, A. Aspects histoquimiques de la cicatrization des fruits de tomate blesses. Z. Pflanzenphysiol., Stuttgart, 107: 259-68, 1982.

FREUNDENBERG, K. Lignin: its constitution and formation from *p*-hydroxycinnamyl alcohols. Science, New York, 148: 595-600, 1965.

FRIC, F. Oxidative enzymes. In: HEITEFUSS, R. & WILLIAMS, P.H. ed. *Physiological Plant Pathology*, Berlin, Springer, 1976. p.617-31.

FRIEND, J. Plant phenolics, lignification and plant disease. In: REINHOLD, L. HARBORNE, J.B. & SWAIN, T., Eds. *Progress in Phytochemistry*, vol.VII. Oxford, Pergamon Press, 1981. p.197-261.

FRY, S.C. Incorporation of (14C) cinnamate into hydrolase-resistant components of primary cell wall of spinach. Phytochemistry, Oxford, 23: 59-64, 1984.

GAHAGAN, H.E.; HOLM, R.E. & ABELES, F.B. Effect of ethylene on peroxidase activity. Plant Physiol., Lancaster, 21: 1270-9, 1968.

GARRAWAY, M.O. Electrolyte and peroxidase leakage as indicators of susceptibility of various maize inbreds to *Helminthosporium maydis* races 0 and T. Plant Disease Reporter, 57: 518-22, 1973.

GASPAR, TH.; PENEL, C.; THORPE, T. & GREPPIN, H. *Peroxidases 1970-1980*. Geneva, Universidade de Geneva, Centre de Botanique, 1982, 324 p.

GOLDBERG, R.; CATESSON, A.M. & CZANINSKI, Y. Some properties of syringaldazine oxidase, a peroxidase specifically involved in lignification processes. Z.Pflanzenphysiol., Stuttgart, 110: 267-79, 1983.

GRAND, C. & ROSSIGNOL, M. Changes in the lignification process induced by localized infection of muskmelons with *Colletotrichum lagenarium*. Plant Science Letters, Limerick, 28: 103-110, 1983.

GREPPIN, H. Peroxidase as a tool in the study of the flowering process. In: GREPPIN, H.; PENEL, C. & GASPAR, TH. *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Geneva, Imprimerie Nationale, 1986. p.333-40.

GREPPIN, H.; PENEL, C. & GASPAR, TH. *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Geneva, Imprimerie Nationale, 1986. 470 p.

GRIFFING, L.R. & FOWKE, L.C. Cytochemical localization of peroxidase in soybean suspension culture cells and protoplast: intracellular vacuole and differentiation and presence of peroxidase in coated vesicles and multivesicular bodies. Protoplasma, Heidelberg, 128: 22-30, 1985.

GRISEBACH, H. Lignins. In: CONN, E.E., ed. *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. Secondary plant products*. New York, Academic Press, 1981. vol.VII, p.457-478.

GRISON,R. Peroxidase racinaires (*Zea mays* L.) quelques problemes methodologiques et physiologiques. Paris, 1984. (tese - Universidade de Paris).

GRISON,R. & PILET,P.E. Properties of syringaldazine oxidase/peroxidase in maize roots. J.Plant Physiol., Stuttgart, 118: 201-8, 1985a.

GRISON,R. & PILET,P.E. Cytoplasmic and wall isoperoxidases in growing maize roots. J.Plant Physiol., Stuttgart, 118: 189-99, 1985b.

GRISON,R. & PILET,P.E. Maize root peroxidases: relationship with polyphenol oxidases. Phytochemistry, Oxford, 24:2519-21, 1985c.

GROSS,G.G. Recent advances in the chemistry and biochemistry of lignin. In: SWAIN,T.; HARBONE,J.B. & VAN SUMERE,C.F., ed. *Biochemistry of plant phenolics*. Ghent, Plenum Press, 1979. vol.XII, p.177-220.

HALL,J.L. & SEXTON,R. Cytochemical locatization of peroxidase activity in root cells. Planta, Heidelberg, 108: 103-20, 1972.

HAMILL, D.E. & BREWBAKER, J.L. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. IV. The peroxidase isoenzymes of maize (*Zea mays*). Physiologie Plantarum, Praga, 22: 945-58, 1969.

HAMMERSCHMIDT, R. Rapid deposition of lignin in potato tuber tissue as a response to fungi non-pathogenic on potato. Physiological Plant Pathology, London, 24:33-4, 1984.

HAMMERSCHMIDT, R. & NICHOLSON, R.L. Resistance of maize to anthracnose: changes in host phenols and pigments. Phytopathology, St. Paul, 67: 251-8, 1977.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.M. & KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. Physiological Plant Pathology, London, 20: 73-82, 1982.

HARKIN, J.M. & OBST, J.R. Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. Science, New York, 180: 296-8, 1973.

HASCHKE, R.H. & FRIEDHOFF, J.M. Calcium-related properties of horseradish peroxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 80: 1039-42, 1978.

HASKINS, F.A. Changes in the activities of several enzymes during germination and seedling development in corn (*Zea mays* L.). Plant Physiol, Lancaster, 30:74-8, 1955.

HAZELL, P. & MURRAY, D.R. Peroxidase isoenzymes and leaf senescence in sunflower, *Helianthus annuus* L. Z.Pflanzenphysiol, Stuttgart, 108: 87-92, 1982.

HEIM, D.; NICHOLSON, R.L.; PASCHOLATI, S.F.; HAGERMAN, A.E. & BILLET, W. Etiolated maize mesocotyls: a tool for investigating disease interactions. Phytopathology, St. Paul, 73: 424-8, 1983.

HISLOP, E.D. & STAHMANN, M.A. Peroxidase and ethylene production by barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. Physiological Plant Pathology, London, 12: 297-312, 1971.

HOFFMAN, S.E. & ZSCHEILE, F.P., JR. Resistance and susceptibility of *Zea mays* to *Helminthosporium carbonum*: A) toxin and lesion induction B) isozyme differences. Phytopath. Z., Berlin, 80: 13-28, 1974.

HOGSETT, W.E.; RABA, R.M. & TINGEY, D.T. Biosynthesis of stress ethylene in soybean seedlings: similarities to endogenous ethylene biosynthesis. Plant Physiol., Lancaster, 53: 307-14, 1981.

HOYLE, M.C. High resolution of peroxidase-indoleacetic acid oxidase isoenzymes from horseradish by isoelectric focusing. Plant Physiol., Lancaster, 60: 787-93, 1977.

I.E.A. Mercado de produtos: Milho. Prognóstico agrícola 88/89, São Paulo, Instituto de Economia Agrícola, v.1, cap.5, 56-63p.

JENNINGS, P.H.; BRANNAMAN, B.L. & ZSCHEILE, F.P., JR. Peroxidase and polyphenoloxidase activity associated with *Helminthosporium* leaf spot of maize. Phytopathology, St. Paul, 59: 963-7, 1969.

KAHL, G. Induction and degradation of enzymes in aging plant storage tissues. In: Kahl, G. ed. *Biochemistry of wounded plant tissues*. Frankfurt, Walter de Gruyter, 1978. p.347-90.

KAHL,G. Molecular biology of wound healing: the conditioning phenomenon. In: KAHL,G. & SCHELL,J.S. ed. *Molecular biology of Plant tumors*. London, Academic Press, 1982. p.211-67.

KAHN,V. & ANDRAWIS,A. Tropolene as a substrate for horseradish peroxidase. Phytochemistry, Oxford, 24: 99-130, 1985.

KAHN,V.; GOLDSHMIDT,S.; AMIR,J. & GRANIT,R. Some properties of soluble and wound potato tuber peroxidase. Journal of Food Science, Chicago, 46: 756-64, 1981.

KALIR,A.; OMRI,G. & POLJAKOFF-MAYBER,A. Peroxidase and catalase activity in leaves of *Halimione portulacoides* exposed to salinity. Physiol.Plant, Copenhagen, 62: 238-44, 1984.

KEVERS,C. & GASPAR,TH. Soluble, membrane and wall peroxidases, phenylalanine ammonia-lyase, and lignin changes in relation to vitrification of carnation tissues cultured *in vitro*. J.Plant Physiol., Stuttgart, 118: 41-8, 1985.

KLAPPER, M.M. & HACKETT, D.P. Investigation on the multiple components of commercial horseradish peroxidase. Biochemica et Biophysica Acta, Amsterdam, 96: 272-82, 1965.

KLISURKA, D. & DENCHEVA, A. Substrate specificity of peroxidase isoenzymes for hydrogen donors. Biologia Plantarum, Praga, 22: 404-9, 1980.

KONZE, J.R. & KWIATKOWSKI, G.M.K. Rapidly induced ethylene formation after wounding is controlled by regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. Planta, Heidelberg, 151: 327-30, 1981.

KOSUGE, T. The role of phenolics in host response to infection. Ann. Rev. Phytopathol., Palo Alto, 7: 195-222, 1969.

KUĆ, J. Plant immunization-mechanisms and practical implications. In: WOOD, R.K.S., *Active defense mechanisms in plants*. New York, Plenum Press, 1982. p.157-78.

LAVEE, S. & AVIDAN, M. Involvement of cathodic isoperoxidases in growth processes. In: GREPPIN, H.; PENEL, C. & GASPAR, TH. *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Geneva, Imprimerie Nationale, 1986. p.309-16.

LEATHAM, G.F.; KING, V. & STAHMANN, M.A. *In vitro* protein polymerization by quinones or free radicals generated by plant or fungal oxidative enzymes. Phytopathology, St. Paul, 70:1134-40, 1980.

LEE, T.H.; MCGLASSON, W.B. & EDWARDS, R.A. Physiology of disks of irradiated tomato fruit. I. Influence of cutting and infiltration on respiration, ethylene production and ripening. Rad. Bot., 10:521-9, 1970.

LEGRAND, B.; GASPAR, TH.; PENEL, C. & GREPPIN, H. Light and hormonal control of phenolic inhibitors of peroxidase in *Cichorium intybus* L. Planta Biochem. J. New Delhi, 3: 119-27, 1976.

LEWAK, S. Peroxidases and germination. In: GREPPIN, H.; PENEL, C. & GASPAR, TH. *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*. Geneva, Imprimerie Nationale, 1986, p.367-74.

LIU, E.H. Substrate specificities of plant peroxidase isozymes. In: MARKERT, C.L., ed., *Isozymes II. Physiological functions*. New York, Academic Press, 1975, p.837-49.

LOVREKOVICH, L.; LOVREKOVICH, H. & STAHMANN, M. A. The importance of peroxidase in the wild fire disease. Phytopathology, St. Paul, 58: 193-8, 1968.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 193: 265-75, 1951.

MACRI, F.; DILENNA, P. & VIANELLO, A. Preliminary research on peroxidase, polyphenoloxidase activity and phenol content in healthy and infected corn leaves, susceptible and resistant to *Helminthosporium maydis* race T. Rivista di Patologia Vegetale, Pavia, 10: 109-21, 1974.

MADER, M.; MEYER, Y. & BOPP, M. Lokalisation der peroxidase-isoenzyme in protoplasten und zellwänden von *Nicotiana tabacum* L. Pflanze, Heidelberg, 122: 259-68, 1975.

MADER, M.; NESSEL, A. & BOPP, M. Über die physiologische bedingung der peroxidase-isoenzym gruppen des tabaks anhand einiger biochemischer eigenschaften. II. pH-optima, Michaelis-konstanten, maximale oxidationsraten. Z. Pflanzenphysiol., Stuttgart, 82: 247-60, 1977.

MAEHLY, A.C. Plant peroxidases. In: COLWICK, S.P. & KAPLAN, N.O., ed., *Methods in enzymology*. Maryland, Academic Press, 1955. vol. II, p. 801-13.

MAEHLY, A.C. & CHANCE, B. The assay of catalase and peroxidase. In: GLICK, D., ed. *Methods of biochemical analysis*. New York, Interscience Publishers. 1954. vol. I, p. 357-408.

MAGRO, P.; MARCIANO, P. & DI LENNA, P. Metabolic alteration induced by *Botrytis allii* in two onion cultivars with different resistance to neck rot. Plant Pathology, Oxford, 32: 295-302, 1983.

MANSFIELD, J.W. & HUTSON, R.A. Microscopical studies on fungal development and host responses in broad bean and tulip leaves inoculated with five species of *Botrytis*. Physiological Plant Pathology, London, 17: 131-44, 1980.

MAPSON, L.W. & WARDALE, D.A. Role of indolyl-3-acetic acid in the formation of ethylene from 4-methylmercapto-2-oxo-butyric acid by peroxidase. Phytochemistry, Oxford, 11: 1371-87, 1972.

MARAITÉ, H. Changes in polyphenoloxidases and peroxidases in muskmelon (*Cucumis melo* L.) infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*. Physiological Plant Pathology, London, 3: 29-42, 1973.

MASON, H.S. & PETERSON, E.W. Melanoproteins. I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. Biochim. Biophys. Acta, 111: 134-46, 1965.

MATILE, P. Das toxische kompartment der pflanzenzelle. Naturwissenschaften, Berlin, 71: 18-24, 1984.

MELLON, J.E. & LEE, L.S. Elicitation of cotton isoperoxidases by *Aspergillus flavus* and other fungi pathogenic to cotton. Physiological Plant Pathology, London, 27: 281-8, 1985.

MENDGEN, K. Ultrastructural demonstration of different peroxidase activities during the bean rust infection process. Physiological Plant Pathology, London, 6: 275-82, 1975.

MEUDT, W.J. & STECHER, K.J. Promotion of peroxidase activity in the cell wall of *Nicotiana*. Plant Physiol., Lancaster, 50: 157-60, 1972.

MISAGHI, I.J. *Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions*. Plenum Press, 1982. 286 p.

MONTALBINI, P. & ELSTNER, E.F. Ethylene evolution by rust-infected detached bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves susceptible and hypersensitive to *Uromyces phaseoli* (Pers.) Wint. Planta, Heidelberg, 135:301-6, 1977.

MUELLER, W.C. & BECKMAN, C.H. Ultra structural localization of polyphenoloxidase and peroxidase in roots and hypocotyls of cotton seedlings. Can.J.Bot., Ottawa, 56: 1579-87, 1978.

NADOLNY, L. & SEQUEIRA, L. Increases in peroxidase activities are not directly involved in induced resistance in tobacco. Physiological Plant Pathology, London, 16: 1-8, 1980.

OHGUCHI, T. & ASADA, Y. Dehydrogenation polymerization products of *p*-hydroxycinnamyl alcohols by isoperoxidases obtained from downy mildew-infected roots of Japanese radish (*Raphanus sativus*). Physiological Plant Pathology, London, 5: 183-92, 1975.

OHGUCHI, T.; YAMASHITA, Y. & ASADA, Y. Isoperoxidases of Japanese radish root infected by downy fungus. Annals of the Phytopathological Society of Japan, Tokyo, 40: 419-426, 1974.

PARISH, R.W. The lysosome-concept in plants. I. Peroxidase associated with subcellular and wall fractions of maize root tips: implication for vacuole development. Planta, Heidelberg, 123: 1-13, 1975.

PASCHOLATI, S.F.; LUSSO, M.F.G.; SILVA, S.R.; HADDAD, G. & MORAES, W.B.C. Reação de híbridos de milho ao *Helminthosporium maydis*, raça 0 e *Helminthosporium carbonum*, raça 1. In: 18º Congresso da Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 152, Fortaleza, 1985. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, Kitajima, E.W., 1985. 10: 289.

QUESSADA, M.P. Les peroxydases de l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.) et leur intervention dans l'incompatibilité au greffage. Montpellier, 1984. (Tese).

RATHMELL, W.G. & BENDALL, D.S. The peroxidase-catalysed oxidation of chalcone and its possible physiological significance. Biochem. J., 127:125-32, 1972.

REUVENI, R. & BOTHMA, G.C. The relationship between peroxidase activity and resistance to *Sphaeroteca fuliginea* in melons. Phytopath.Z., Berlin, 114: 260-7, 1985.

REUVENI, R. & PERL, M. Peroxidase isoenzyme specificity in abscission zone fragments of pepper leaves affected by powdery mildew or stress condition. Phytopath.Z., Berlin, 96: 208-14, 1979.

RIDE, J.P. The role of cell wall alterations in resistance to fungi. Ann.Appl.Biol., Cambridge, 89: 302-6, 1978.

RIDE, J.P. & PEARCE, R.B. Lignification and papilla formation at sites of attempted penetration of wheat leaves by non pathogenic fungi. Physiological Plant Pathology, London, 15: 79-92, 1979.

RIDGE, I. & OSBORNE, D.J. Hydroxiproline and peroxidase in cell wall of *Pisum sativum*: regulation by ethylene. Journal of Experimental Botany, London, 69: 843-856, 1970.

SAINI, R.S.; ARORA, Y.K. & WAGLE, D.S. Soluble proteins and multiple forms of peroxidase in growing points of wheat plants in relation to their resistance to loose smut. Biochem.Physiol.Pflanzen., Jena, 180: 239-49, 1985.

SAKO, N. & STAHMANN, M.A. Multiple molecular forms of enzymes in barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f.sp.*hordei*. Physiological Plant Pathology, London, 2: 217-226, 1972.

SALISBURY, F.B. & ROSS, C.W. Lipids and aromatic compounds. In: *Plant Physiology*. 2 ed. California, Wadsworth Publishing Company, 1978, p.422.

SALTVEIT, M.E. & DILLEY, D.R. Rapidly induced wound ethylene production from excised segments of etiolated *Pisum sativum* II. Oxygen and temperature dependency. Plant Physiol., Lancaster, 61: 675-9, 1978.

SAUNDERS, B.C.; HOLMES-SIEDLE, A.G. & STARK, B.P. Peroxidase. The properties and uses of a versatile enzyme and some related catalysts. Washington, Butter Worths, 1964. 264 p.

SCHALL, R.A.; NICHOLSON, R.L. & WARREN, H.L. Influence of light on maize anthracnose in the greenhouse. Phytopathology, St.Paul, 70: 102-10, 1980.

SCIANCELEPORE, V.; LONGONE, V. & ALVITI, F.S. Partial purification and some properties of peroxidase from malvasia grapes. Am.J.Enol.Vitic., Bari, 36: 104-10, 1985.

SEEVERS, P.M.; DALY, J.M. & CATEDRAL, F.F. The role of peroxidase to wheat stem rust disease. Plant Physiol., Lancaster, 48: 353-60, 1971.

SEQUEIRA, L. Growth regulators in plant disease. Ann. Rev. Phytopathol., Palo Alto, 1: 5-30, 1963.

SHANNON, L.M.; KAY, E. & LEW, J.V. Peroxidase isozymes from horseradish roots. The Journal of Biological Chemistry, Baltimore, 241: 2166-72, 1966.

SHURTLEFF, M.C. *Compendium of corn disease*. 2 edição. Illinois, The American Phytopathological Society, 1980. 105 p.

SIMONS, T.J. & ROSS, F.A. Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to tobacco mosaic virus in hypersensitive tobacco. Phytopathology, St. Paul, 60: 383-4, 1970.

SMITH, M.M. & O'BRIEN, T.P. Distribution of autofluorescence and esterase and peroxidase activities in the epidermis of wheat roots. Australian Journal of Plant Physiology, Stuttgart, 6: 201-19, 1979.

SOLYMOSY, F.; SZIRMAI, J.; BECZNER, L. & FARKAS, G.L. Changes in peroxidase-isozyme patterns induced by virus infection. Virology, 32:117-21, 1967.

STAFFORD, H.A. & BRAVINDER-BREE, S. Peroxidase isozymes of first internodes of sorghum. Tissue and intracellular localization and multiples peaks of activity isolated by gel filtration chromatography. Plant Physiol., Lancaster, 49: 950-6, 1972.

STAHMANN, M.A. Influence of host-parasite interactions on proteins, enzymes, and resistance. In: MIROCHA, C.J. & URITANI, I., ed., Minnesota, Bruce Publ. CO., 1967. p.357-69.

STAHMANN, M.A. & DEMOREST, D.M. Changes in enzymes of host and pathogen with special reference to peroxidase interactions. In: BYRDE, R.J.W. & CUTTING, C.V., coord. *Fungal pathogenicity and the plant response*. Cambridge, Academic Press, 1973. p.405-20.

STAHMANN, M.A.; SPENCER, A.K. & HONOLD, G.R. Cross linking of proteins in vitro by peroxidase. Biopolymers, 16:1307-18, 1977.

STERMER, B.A. & HAMMERSCHMIDT, R. Heat shock induces resistance to *Cladosporium cucumerinum* and enhances peroxidase activity in cucumbers. Physiology Plant Pathology, Oxford, 25: 239-49, 1984.

THORPE, J.R. & HALL, J.L. Chronology and elicitation of changes in peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase activities in wounded wheat leaves in response to inoculation by *Botrytis cinerea*. Physiological Plant Pathology, London, 25: 262-379, 1984.

TOMIYAMA, K. Physiology and Biochemistry of disease resistance of plants. Ann. Rev. Phytopathol., Palo Alto, 1: 295-316, 1963.

TORRECILLAS, A.; LEON, A.; DEL AMOR, F. & MARTINEZ-MONPEAN, M.C. A rapid chronometric assay of peroxidase activity in citrus leaf discs. Scientia Horticulturae, Amsterdam, 26: 273-7, 1985.

TUITE, J. *Plant pathological methods - fungi and bacteria*. Minneapolis, Burgess Publishing Company, 1969.

UENG, P.P. & DALY, J.M. Comparison of indole-3-acetic acid oxidation in peroxidases from rust-infected resistant wheat leaves. Plant Cell Physiology, Tokyo 26: 77-87, 1985.

URITANI, I. Protein metabolism. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, NS 4, p.509-525, 1976.

URITANI, I. & OBA, K. The tissue slice system as a model for studies of host-parasite relationships. In: KAHL, G. ed. *Biochemistry of wounded plant tissues*. Berlin, Walter de Gruyter, 1979. p.287-308.

VANCE, C.P.; ANDERSON, J.D. & SHERWOOD, R.T. Soluble and cell wall peroxidases in reed canarygrass in relation to disease resistance and localized lignin formation. Plant Physiol., Lancaster, 57: 920-2, 1976.

VANCE, C.P.; KIRK, T.P. & SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. Ann.Rev.Phytopathology, Palo Alto, 18: 259-88, 1980.

VANCE, C.P. & SHERWOOD, R.T. Regulation of lignin formation in reed canarygrass in relation to disease resistance. Plant Physiol., Lancaster, 57: 915-9, 1976a.

VANCE, C.P. & SHERWOOD, R.T. Cyclohexamide treatments implicate papilla formation in resistance of canarygrass to fungi. Phytopathology, St.Paul, 66: 498-502, 1976b.

VANCE, C.P. & SHERWOOD, R.T. Lignified papilla formation as a mechanism for protection in reed canarygrass. Physiological Plant Pathology, London, 10: 247-54, 1977.

VAN LOON, L.C. Tobacco polyphenoloxidase: a specific staining method indicating non-identity with peroxidase. Phytochemistry, Oxford, 10: 503-7, 1971.

VAN LOON, L.C. The significance of change in peroxidase in disease plants. In: GREPPIN, H.; PENEL, C. & GASPAR, TH., ed. *Molecular and physiological aspects of plant peroxidase*. Geneva, Imprimerie Nationale, 1986. p.405-18.

VAN LOON, L.C. & GEELEN, J.L.M.C. The relationship of polyphenoloxidase and peroxidase to symptom expression in tobacco var. "Samsun NN" after infection with tobacco mosaic virus. Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung., 6: 9-20, 1971.

VARSHNEY, S.R.K. & VARSHNEY, C.K. Response of peroxidase to low levels of SH2 Environmental and Experimental Botany, London, 25: 107-14, 1985.

VEGETTI, G.; CONTI, G.G. & PESCI, P. Changes in phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenoloxidase during the development of local necrotic lesions in pinto bean leaves infected with alfalfa mosaic virus. Phytopath. Z., Berlin, 84: 153-71, 1985.

WANG, Z. & LUH, B.S. Characterization of soluble and bound peroxidase in green asparagus. Journal of Food Science, Chicago, 48: 412-21, 1983.

WARD, E.W.B. Biochemical mechanisms involved in resistance of plants to fungi. In: BAILEY, J.A., ed. *Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions*, Ilminster, Springer-Verlag, 1986. p.107-31.

WASFY, E.H.; SHEIR, H.M.; EL-METENY, A.Y. & DARWEESH, M.M. Changes in peroxidase isoenzyme pattern of bean hypocotyl due to infection with *Rhizoctonia solani*. Transaction of the British Mycological Society, London, 82:154-6, 1984.

WELINDER, K.G. Amino acid sequence studies for horseradish peroxidase. European Journal of Biochemistry, Berlin, 96: 483-502, 1979.

WERDER, J. Infektionsverlauf und abwehrreaktionen in mais gegen *Helminthosporium carbonum*. Zurich, 1982, 65 p. (Doutorado - Swis Federal Polytechnic University).

WHITMORE, F.W. Lignin-protein complex catalyzed by peroxidase. Plant Science Letters, Limerick, 13: 241-5, 1978.

WOOD, R.K.S. *Physiological plant pathology*. Oxford-Edinburg, Blackwell Scientific Publ., 1967.

WOOD, K.R. Peroxidase isoenzymes in leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars systemically infected with the W strain of cucumber mosaic virus Physiological Plant Pathology, London, 1: 133-9, 1971.

YAMAMOTO, H.; HOKIN, H. & TANI, T. Peroxidase and polyphenoloxidase in relation to the crown rust resistance of oat leaves. Phytopath. Z., Berlin, 91: 193-202, 1978.

YU, Y.B. & YANG, S.F. Biosynthesis of wound ethylene. Plant Physiol., Lancaster, 66: 281-5, 1980.

ZIMMERMANN, H. & ROSENSTOCK, G. Proteingehalt, proteinmuster, peroxydase- und malatdehydrogenase-isoenzymmuster während der entwicklung und lagerung der knollen von *Solanum tuberosum* L. Biochem. Physiol. Pflanzen, Jena, 169:321-36, 1976.

ZINKERNAGEL, V. Untersuchungen zur anfalligkeit und resistenz von kopfsalat (*Lactuca sativa*) gegen falschen mehltau (*Bremia lactucae*). III. peroxydase-, peroxydatische katase und polyphenoloxydase-aktivitäten. J. Phytopathology, Berlin, 115: 257-66, 1986.