

Revista Pesquisa & Criação, Publicação Científica da Fundação Universidade Federal de Rondônia, produzida pela PROPESQ. Ano: 2010, nº 09, Periódico Especial, ISSN: 1412-8862.

## AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DA INTERAÇÃO ENTRE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* E *MUSA SP*

Raize Ferraz de Lima<sup>1</sup>, Cléberon de Freitas Fernandes<sup>2</sup>, José Roberto Vieira Junior<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduanda Farmácia, Faculdades Integradas Aparício Carvalho – FIMCA, Porto Velho, RO, Bolsista CNPq; <sup>2</sup> Pesquisador, Embrapa Rondônia, Orientador. BR 364, km 5,5, Caixa Postal 406, CEP: 78900-970, Porto Velho, RO. Tel. (69) 3901-2534. E-mail: [cleberon@cpafro.embrapa.br](mailto:cleberon@cpafro.embrapa.br) <sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa Rondônia.

**RESUMO:** A bananeira é uma fruteira com grande valor comercial, sendo de fácil adaptação somente em regiões tropicais. Entretanto, esta cultura sofre o ataque de uma doença conhecida como sigatoka negra tendo como agente causal o fungo *Mycosphaerella fijiensis*. Esta doença pode causar prejuízos de até 100% na produção e, depois de instalada, provoca aumento significativo nos custos de produção, pois serão necessárias mais de trinta aplicações de produto químico por ano, trazendo impactos econômicos e ambientais. Para se defenderem do ataque de fitopatógenos, as plantas estão utilizando defesas constitutivas, naturalmente presentes na planta, funcionando como barreiras físicas, tais como a cutícula e os tricomas, e barreiras químicas, incluindo os inibidores de proteases e fenóis, e as defesas induzidas, como as PR-Proteínas e enzimas ligadas ao estresse oxidativo. Este trabalho relata as avaliações bioquímicas decorrentes da interação entre o fungo *M. fijiensis* e *Musa sp.*, demonstrando os níveis de atividades de enzimas ligadas ao mecanismo de defesa da bananeira, tais como peroxidase, ascorbato peroxidase, catalase, fenilalanina amônia liase. Os resultados obtidos indicam a participação destas enzimas no mecanismo de defesa da bananeira contra o fungo *M. fijiensis*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sigatoka negra, PR-Proteínas, bananeira, *Mycosphaerella fijiensis*

**ABSTRACT:**

**Revista Pesquisa & Criação, Publicação Científica da Fundação Universidade Federal de Rondônia, produzida pela PROPESQ. Ano: 2010, nº 09, Periódico Especial, ISSN: 1412-8862.**

The banana is a fruit with high commercial value and easier adapted to tropical regions. However, this crop is attacked by a disease known as black Sigatoka, causal agent *Mycosphaerella fijiensis*. This disease can cause losses of up to 100% in production and, once installed, causes significant increase in production costs, as they needed more than thirty chemical applications per year, bringing economic and environmental impacts. To defend themselves from pathogens, the plants are using constitutive defenses, naturally present in plants, functioning as physical barriers such as cuticle and trichomes, and chemical barriers, including protease inhibitors and phenols, and induced defenses, as PR-proteins and enzymes related to oxidative stress. This paper describes the biochemical arising from the interaction between the fungus *M. fijiensis* and *Musa sp.*, showing the levels of enzyme activities related to the banana defense mechanism. The results indicate the possible role of these enzymes in the banana defense mechanism against the fungus.

**KEYWORDS:** Black Sigatoka, PR-Proteins, banana, *Mycosphaerella fijiensis*

## 1. INTRODUÇÃO

A bananeira é cultivada em todas as regiões tropicais do mundo, sendo a banana a fruta de maior produção e comercialização mundial, responsável por 37% do volume total de frutas transacionadas no mercado internacional (Saabor et al., 2000). Índia, Brasil e Equador são os maiores produtores mundiais de banana (680 mil, 491 mil e 216 mil hectares, respectivamente em 2004), segundo dados da FAO (2006), sendo também grandes consumidores, já que ela assume o papel de uma das principais fontes de carboidratos para a população (Barros et al., 2007).

Em 2006, no Estado de Rondônia a produção de banana foi de 46.117 t numa área de 5.401 ha. O rendimento físico alcançou pouco mais de 8,5 t/ha/ano (IBGE, 2006). Embora bem adaptada às condições edafoclimáticas do país, onde se apresenta como uma das principais frutas produzidas, a cultura da banana enfrenta o ataque de diversos patógenos que contribuem para redução de sua produtividade, notadamente a

**Revista Pesquisa & Criação, Publicação Científica da Fundação Universidade Federal de Rondônia, produzida pela PROPESQ. Ano: 2010, nº 09 , Periódico Especial, ISSN: 1412-8862.**

sigatoka negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, estágio anamórfico *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton (Gasparotto et al, 2006). No Brasil, a doença foi identificada em fevereiro de 1998 nos Municípios de Tabatinga e Benjamim Constant, no Estado do Amazonas, fronteira do Brasil com a Colômbia e Peru (Gasparotto et al, 2005). Os sintomas são caracterizados pela presença de estrias marrom na face inferior da folha, progredindo para estrias negras que formam lesões necróticas destruindo toda a área foliar resultando em redução da produção (Marin *et al.*, 2003). Apresentando ampla distribuição geográfica, a sigatoka negra causa a morte precoce das folhas infectadas sendo responsável por perdas superiores a 50% da produção (Stover & Simmonds, 1987). Os esporos de *M. fijiensis* são disseminados principalmente pelo vento (Figura 1). As mudas de bananeiras doentes e as folhas infectadas com o patógeno colocadas entre os cachos, para evitar o ferimento dos frutos durante o transporte, também representam um meio eficiente e rápido para a disseminação do patógeno a longas distâncias (Pereira *et al.*, 2000).

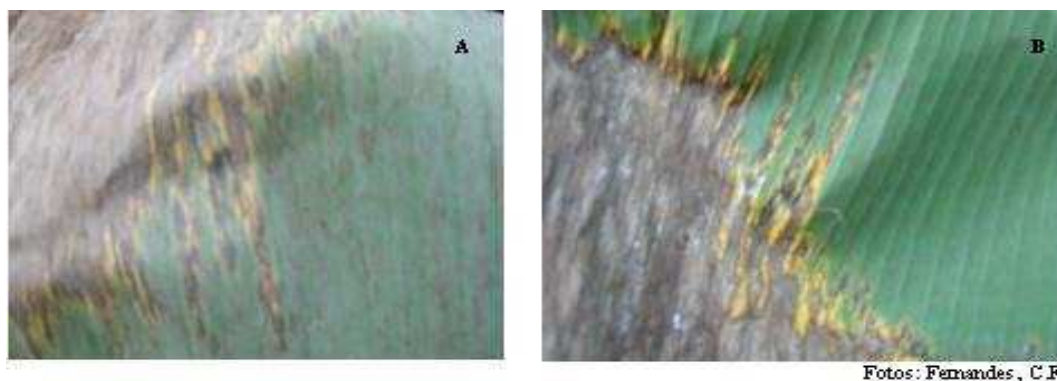


Figura 1 – Folhas de bananeira com sintomas do ataque de *Mycosphaerella fijiensis*.

Como mecanismo de defesa, as plantas utilizam diferentes estratégias, que envolvem barreiras físicas, tais como a cutícula e os tricomas, e/ou químicas, onde podemos destacar a resposta hipersensitiva (HR), que caracteriza-se pelo rápido e

**Revista Pesquisa & Criação, Publicação Científica da Fundação Universidade Federal de Rondônia, produzida pela PROPESQ. Ano: 2010, nº 09, Periódico Especial, ISSN: 1412-8862.**

localizado colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção. A HR induz a produção da PR-proteínas, destacando-se as peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases (Fernandes, 2006). Estas são proteínas hidrolíticas que atuam desestabilizando estruturalmente a membrana celular de fungos e bactérias agressores. As peroxidases atuam ainda no processo de reforço da parede celular das plantas, participando no processo de lignificação. Em decorrência da HR ocorre a resistência sistêmica adquirida (SAR), que induz a resistência em locais da planta distantes do local da infecção pelo patógeno.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção e Inoculação do Fungo *Mycosphaerella fijiensis***

Foram coletadas folhas com sintomas de ataque de sigatoka negra no campo experimental da Embrapa Rondônia, para o isolamento do fungo *Mycosphaerella fijiensis*, que foi realizado com o seguinte procedimento:

1- Identificação dos peritécios (corpo de frutificação do fungo, que tem por finalidade dar proteção e apoio às células esporógenas), apresentando coloração oscilante do marrom ao preto, com estrutura semelhante a ferrugem, em alto relevo;

2- Com o auxílio do furador de rolha, fazer disco em torno dos peritécios, fixando-os ao papel filtro com o grampeador;

3- Fazer a assepsia do material emergindo-o em álcool, hipoclorito de sódio e água destilada estéril.

Após a última lavagem, secar rapidamente o material em papel toalha esterilizado.

4- Identificar, com o auxílio do microscópio, os ascósporos já em meio de cultura, transferindo-os em seguida com uma alça de platina para as placas com meio BDA-cloranfenicol.

Após o crescimento das colônias foi preparada uma solução de esporos com água destilada estéril, a mesma foi quantificada em câmara de Neubauer, obtendo-se uma concentração de:  $7,8 \times 10^6$  esporos/mL. Esta solução foi então inoculada nas

**Revista Pesquisa & Criação, Publicação Científica da Fundação Universidade Federal de Rondônia, produzida pela PROPESQ. Ano: 2010, nº 09, Periódico Especial, ISSN: 1412-8862.**

seguintes variedades de *Musa sp.*: Grande Naine, Maçã, Garantida, Caprichosa, Prata Anã, Fhia-18, Prata Ken.

## **2.2 Coleta do Material Vegetal**

Foram coletadas as folhas primárias e secundárias das plantas inoculadas, os tempos de coleta foram os seguintes: 0 hora, 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas e 15 dias. Após coleta as folhas eram lavadas, cortadas, separando-se os cortes para os testes posteriores e logo em seguida os pedaços eram pesados, embalados e congelados.

**2.3 Preparação dos Extratos Totais:** As folhas foram maceradas em nitrogênio líquido e em seguida foi adicionado tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,2, 1:5 (p/v) e centrifugadas (13000 rpm, 4 °C, 15 min). Esta preparação foi denominada de extrato total e utilizada nas determinações de proteína e atividades enzimáticas (Fernandes et al., 2006).

**2.4 Dosagem de Proteínas:** Para a determinação de proteína total, foi utilizado o método de Bradford (1976). A absorbância das amostras à 595 nm foi medida em espectrofotômetro Femto 700plus. A quantidade de proteína foi determinada utilizando-se uma curva de BSA.

**2.5 Determinação do acúmulo de Peróxido de Hidrogênio:** Determinado de acordo com o método de Gay e colaboradores (1999). A mistura reacional foi composta de 200 µL do sobrenadante e 1 mL da solução de alaranjado de xilenol. A mistura reacional foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente, e a absorbância da reação colorimétrica lida a  $A_{560}$  nm.

**2.3 Determinação da Atividade Peroxidásica (POX):** O extrato total foi utilizado para as determinações da atividade peroxidásica, segundo o método descrito por Urbanek e colaboradores (1991) com modificações. Para tanto, foi utilizado 20 µL

**Revista Pesquisa & Criação, Publicação Científica da Fundação Universidade Federal de Rondônia, produzida pela PROPESQ. Ano: 2010, nº 09, Periódico Especial, ISSN: 1412-8862.**

de extrato total, 1000 uL de guaiacol 0,02 M, 1000 uL de peróxido de hidrogênio 0,06M e 1980 uL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, totalizando um volume final de 4000 uL. A mistura reacional foi incubada em banho-maria por dez minutos a 30 °C, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro Femto 700plus com um comprimento de onda de 480 nm. A variação de 1 unidade de absorbância por minuto foi assumida como 1 unidade de atividade peroxidásica (UAP).

**2.4 Determinação da Atividade de Catalase (CAT):** Foi determinada através da adição de 50 µL do extrato total a 950 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, contendo 12,5 mM de H<sup>2</sup>O<sub>2</sub>, a 30 °C (Havir e McHale,1987). A adição do peróxido de hidrogênio ao tampão fosfato de potássio será feita imediatamente antes de seu uso. A atividade enzimática será determinada pela medida do decréscimo da leitura de absorbância a 240 nm, no intervalo de tempo de 30 segundos, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (Anderson ET AL.,1995).

**2.5 Determinação da Atividade de Peroxidase do Ascorbato (APX):** Foi determinado segundo o método descrito por Peixoto (1998), adaptada para as condições experimentais. A mistura reacional consistirá de 600 µL do tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5 Mm de ascorbato, 100 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2 mM e 300 µL do extrato total a ser testado, a 25 °C. O decréscimo na leitura de absorbância medida a 290 nm, no intervalo de 10 – 180 segundos, será mensurado como índice de oxidação do ascorbato. A atividade APX será determinada utilizando-se uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de ascorbato (0,1 – 1,0 µmol ascorbato/mL).

**2.6 Determinação da Atividade de Fenilalanina Amônia Liase (PAL):** Foi determinada segundo o método descrito por Tanaka e colaboradores (1974) e Mori e colaboradores (2001), adaptado para as condições experimentais. A mistura reacional consistirá de 200 µL do extrato total, 200 µL de fenilalanina 40 mM, 20 µL de β-mercaptoetanol 50 Mm e 480 µL do tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,8. A mistura reacional será incubada a 30 °C por 1 hora. A reação será parada pela adição de 100

Revista Pesquisa & Criação, Publicação Científica da Fundação Universidade Federal de Rondônia, produzida pela PROPESQ. Ano: 2010, nº 09, Periódico Especial, ISSN: 1412-8862.

$\mu\text{L}$  HCl 6 N e a absorbância a 290 nm medida. No branco do ensaio, a fenilalanina será adicionada após a adição do HCl 6 N. A atividade de PAL será determinada utilizando-se uma curva padrão construída a partir de concentrações conhecidas de ácido *trans*-cinâmico (0,01 – 0,1  $\mu\text{g}$  ácido *trans*-cinâmico/mL).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *M. fijiensis* obtidos no presente estudo foram considerados de boa qualidade, obtendo-se colônia puras do fungo, as quais foram utilizadas para inoculação das plântulas de bananeira, nas diferentes variedades testadas (Figura 2).



Figura 2 – Isolado de *Mycosphaerella fijiensis* em meio de cultura BDA.

Os teores de proteínas mostraram aumento para as variedades testadas após a inoculação com o fungo *M. fijiensis*. Valores de proteínas encontrados de 0,0825 mgP/mL para a variedade FHIA-18, 0,087 mgP/mL para a variedade Pacovan Ken e de 0,076 mgP/mL para a variedade Maçã.

**Revista Pesquisa & Criação, Publicação Científica da Fundação Universidade Federal de Rondônia, produzida pela PROPESQ. Ano: 2010, nº 09, Periódico Especial, ISSN: 1412-8862.**

Os níveis de atividade peroxidásica mostraram alterações significativas dentre as variedades testadas, notadamente nas amostras inoculadas com o fungo *M. fijiensis*. Valores de atividade encontradas foram de 1,265 UA/mL para a variedade Prata Anã e de 1,03 UA/mL para a variedade Caprichosa.

A atividade de catalase também mostrou alterações em seus níveis de atividade entre as diferentes variedades testadas, com valores de absorbâncias variando entre 0,010 UA e 0,077 UA, nas variedades FHIA 18 e Maçã, respectivamente.

A atividade de ascorbato peroxidase mostrou alterações nas diferentes variedades avaliadas, tendo níveis de atividade de 0,096 UA, 0,068 UA, 0,109 UA, 0,081 UA, 0,132 UA, 0,109 UA e 0,090 UA nas variedades Prata Anã, FHIA 18, Garantida, Grande Naine, Caprichosa, Prata Ken e Maçã, respectivamente.

A atividade de fenilalanina amônia liase mostrou variações em seus níveis de atividade entre as diferentes variedades testadas, com valores de absorbâncias variando entre 0,034 UA e 0,055 UA, nas variedades Grande Naine e Garantida, respectivamente.

#### **4. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos mostram o aumento dos níveis de atividades das enzimas testadas, o que indica o possível papel destas enzimas dentro do mecanismo de defesa da bananeira contra o ataque do fungo *M. fijiensis*, agente causal da sigatoka negra.

#### **5. REFERÊNCIAS**

BARROS, M. A. B; LOPES, G. M. B; WANDERLEY, M. B.; Tipologia do consumo de frutas: um estudo sobre o comportamento do consumidor de banana. XXVII Encontro Nacional de Engenharia de Produção. 2007

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.



**Revista Pesquisa & Criação, Publicação Científica da Fundação Universidade Federal de Rondônia, produzida pela PROPESQ. Ano: 2010, nº 09, Periódico Especial, ISSN: 1412-8862.**

**FAO.** Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (Roma Itália) STATISTICS DIVISION. 2006. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>.

FERNANDES, C. F.; MORAES, V. C. P.; VASCONCELOS, I. M.; SILVEIRA, J. A. G.; OLIVEIRA, J. T. A. Induction of an anionic peroxidase in cowpea leaves by exogenous salicylic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 1040-1048, 2006.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; HANADA, R. E.; MONTARROYOS, A. V. V. Sigatoka-negra da bananeira. Embrapa Amazônia Ocidental. 2006.

GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; URBEN, A. F.; HANADA, R. E.; PEREIRA, M. C. N. *Heliconia psittacorum*: Hospedeira de *Mycosphaerella fijiensis*, Agente Causal da Sigatoka-Negra da Bananeira. Fitopatol. bras. 30(4), jul - ago 2005.

GAY, C., COLLINS, J., GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylenol orange complex. **Analytical Biochemistry**, v. 273, p. 149-155, 1999.

HÜCKELHOVEN, R., FODOR, J., PREIS, C., KOGEL, K.-H. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1251-1260, 1999.

LSPA – Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. IBGE/ Emater Rondônia, 2006.

MARIN, D. H. et al. Black sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. **Plant Disease**, v.87, p.208-222, 2003.

PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTO, L.; COELHO, A.F.S.; VÉRAS, S.M. Doenças da bananeira no Estado do Amazonas. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental. 2000.(Circular técnica, 7).

SAABOR, A. et al. Banana. FrutiSeries, Brasília, DF, n. 6, p. 1-8, ago. 2000.

STOVER, R.H.; SIMMONDS, N.W. Bananas. 3ed. **Longman Scientific & Technical**, Essex, England. 1987.

URBANEK, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E., HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13(1), p. 43-50, 1991.