

## TEORES DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM EXTRATOS DE FOLHAS DE BANANEIRA NA PRESENÇA DO FUNGO *Mycosphaerella fijiensis*

Raize Ferraz de Lima<sup>145</sup>  
Cléberon de Freitas Fernandes<sup>146</sup>  
José Roberto Vieira Junior<sup>147</sup>

**RESUMO:** A banana (*Musa* spp.) é uma das frutas mais consumidas no mundo, tendo o Brasil como um dos maiores produtores e consumidores. Embora bem adaptada as condições edafoclimáticas, a bananeira sofre o ataque de inúmeros patógenos, onde destaca-se a *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da sigatoka negra. Para se defender, as plantas lançam mão de um arsenal de defesa, sendo a resposta hipersensitiva a primeira etapa deste mecanismo, marcada pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio. Com o objetivo de avaliar o papel do peróxido de hidrogênio neste patossistema, foram utilizadas 3 variedades de bananas, sendo duas consideradas resistentes e ou tolerante a sigatoka negra, a FHIA-18 e BRS Garantida, e outra variedade considerada susceptível, Maçã. As variedades foram inoculadas com uma suspensão de esporos e as folhas coletadas 0, 24, 48, 72, 96, 120 horas e 15 dias da inoculação (hai), as quais foram utilizadas na determinação dos teores de peróxido de hidrogênio. Os teores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variaram de 0,19 a 0,47 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas plantas controle e de 0,14 a 1,30 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas plantas inoculadas, na variedade Maçã. A variedade FHIA-18 apresentou teores variando de 0,31 a 1,53 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas plantas controle e de 0,08 a 0,56 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas plantas inoculadas. Na variedade BRS Garantida, os valores variaram de 0,19 a 0,72 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas plantas controle e de 0,13 a 0,50 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas plantas inoculadas. Os resultados alcançados até o momento sugerem a participação do peróxido de hidrogênio no mecanismo de defesa da bananeira contra o ataque do fungo *M. fijiensis*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bananeira, Defesa de Plantas, Estresse Oxidativo

**ABSTRACT:** Banana (*Musa* sp.) is largely cultivated around the world, being Brazil one of the most important producers. However, the banana crop faces attack from diverse pathogens that contribute to reduced productivity, especially the black sigatoka, caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. To defend themselves against diseases and pests, plants are equipped with constitutive defenses, including the hypersensitive response, which is characterized by the hydrogen peroxide accumulation. In aim to evaluate the role of hydrogen peroxide in this pathosystem, 3 varieties of banana, FHIA-18 and BRS Garantida, resistant, and Maçã, susceptible to black sigatoka were used. Plants were inoculated with a spore suspension and leaves were collected 0, 24, 48, 72, 96, 120 hours and 15 days after inoculation (hai), which were used to determine hydrogen peroxide levels. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels showed variation of 0.19 - 0.47 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in control plants and 0.14 - 1.30 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in inoculated plants, to Maçã. FHIA-18 showed levels of 0.31 - 1.53 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in control plants and 0.08 - 0.56 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in inoculated plants. In BRS Garantida, levels variation was 0.19 - 0.72 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in control plants and 0.13 - 0.50 nmolH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in inoculated one. The results obtained until now suggests that this compound could play an important role in plant defense mechanisms against *M. fijiensis*.

<sup>145</sup> Graduanda em Farmácia-FIMCA. Bolsista do CNPq/ PIBIC. E-mail: [raizefl@hotmail.com](mailto:raizefl@hotmail.com)

<sup>146</sup> Farmacêutico, D.Sc., Pesquisador Embrapa Rondônia. Orientador. E-mail: [cleberon@cpafro.embrapa.br](mailto:cleberon@cpafro.embrapa.br)

<sup>147</sup> Eng. Agrônomo, D.Sc., Pesquisador Embrapa Rondônia. E-mail: [vieirajr@cpafro.embrapa.br](mailto:vieirajr@cpafro.embrapa.br)

**KEYWORDS:** Banana, Plant Defense, Oxidative Stress

## INTRODUÇÃO

A banana (*Musa* spp.) é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo explorada na maioria dos países tropicais, tendo relevância econômica e social, além de possuir elevado valor nutritivo. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de banana tendo produzido no ano de 2009 6.783.482 toneladas de banana, numa área de 483.562 ha, com rendimento médio de 14.143 Kg/ha (IBGE, 2009).

Em Rondônia, onde predomina o cultivo em pequenas propriedades, importante na fixação de agricultores familiares no campo e geração de emprego e renda, a produção de banana foi de 49.183 toneladas numa área de 5.843 ha, com rendimento médio de 8.462 Kg/ha (IBGE, 2009). Esta produtividade é inferior a média nacional, sendo consequência do baixo nível tecnológico adotado pela maioria dos produtores do Estado (COSTA et al., 2007). Outro fator que contribui para o baixo rendimento da cultura é o ataque de pragas e doenças, os quais são responsáveis por perdas significativas na produção da bananicultura no Estado (FERNANDES et al., 2007). Dentre as doenças da bananeira podemos destacar o moko da bananeira, o mal-do-panamá, a sigatoka amarela e a sigatoka negra, a qual vem causando danos expressivos à bananicultura nacional, objeto deste estudo.

A doença é causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (fase anamórfica: *Paracercospora fijiensis*), e os danos causados por tal fungo chegam a comprometer até 100% da produção de banana (GASPAROTTO et al., 2006). Os sintomas da doença são caracterizados pela presença de estrias marrom na face inferior da folha, progredindo para estrias negras (Fig.1), que formam lesões necróticas destruindo toda a área foliar, resultando em redução da fotossíntese e, conseqüentemente da produção (MARIN et al., 2003).



Foto: Fernandes, C.F.

**Figura 1.** Folha de bananeira com sintomas de ataque de sigatoka negra.

Para impedir ou retardar a penetração dos fitopatógenos, as plantas possuem as defesas pré-formadas ou constitutivas, e as pós-formadas. Nos mecanismos bioquímicos pré-formados, as substâncias estão presentes na planta em altas concentrações nos tecidos saudáveis antes do contato com o patógeno ou podem se converter em substâncias altamente tóxicas com o início da infecção (ainda assim são consideradas pré-formadas, devido à ausência de um precursor remoto). Por outro lado, nos mecanismos pós-formados, as substâncias encontram-se ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo ativadas em resposta à presença do patógeno ou produzidas a partir de um precursor remoto. Entre as respostas de defesa apresentadas pelas plantas encontra-se a resposta hipersensitiva ou HR, que é caracterizada por uma resposta local, desencadeada por estresses bióticos e abióticos, que recrutam proteínas comuns (BAKER et al., 1997), e se caracteriza pela produção de peróxido de hidrogênio e indução de enzimas ligadas a defesa e ao estresse oxidativo.

A resposta da planta aumenta os níveis de  $H_2O_2$  para evitar a propagação do fungo na planta. Porém, este mecanismo parece eficiente se o fungo for biotrófico (se alimenta de matéria viva), pois o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  iria lesionar o tecido, causando morte celular, em um processo conhecido como resposta hipersensitiva (HR). Entretanto, se o fungo tiver a característica de necrotrófico (se alimenta de tecido morto) ou hemibiotrófico (se alimenta de matéria viva e morta), a resposta do fungo continua, no caso do hemibiotrófico apresenta duas fases, sendo biotrófico no primeiro estágio e necrotrófico no segundo estágio, o que pode contribuir para o crescimento do patógeno (HAMMOND-KOSACK & JONES, 1996; GOVRIN & LEVINE, 2000).

Desta forma, a identificação do papel do  $H_2O_2$  em patossistemas como *M. fijiensis* – *Musa* sp., contribuirá para o entendimento dos mecanismos de defesa da bananeira contra o ataque deste fungo. Para isto, neste trabalho, foram utilizadas 3 variedades de bananas, sendo duas consideradas resistentes e ou tolerante a sigatoka negra, a FHIA-18 e BRS Garantida, e outra variedade considerada suscetível, Maçã.

## MATERIAL E MÉTODOS

Mudas micropropagadas de 03 genótipos de banana, sendo 02 resistentes e ou tolerantes (FHIA 18, BRS Garantida) e 01 suscetível (Maçã) ao fungo *M. fijiensis* foram cultivadas em sacos plásticos (7 cm x 14 cm), utilizando-se como substrato areia previamente

lavada com água destilada e autoclavada por 20 minutos, 121 °C, 1,5 atm, e mantidos em casa de vegetação, sob condições controladas de temperatura e umidade. As mudas foram regadas com água destilada até o vigésimo dia de plantio sendo, a partir daí, duas vezes na semana, regadas com solução nutritiva (HOAGLAND e ARNON, 1950), diluída 1:10, intercalada com água destilada.

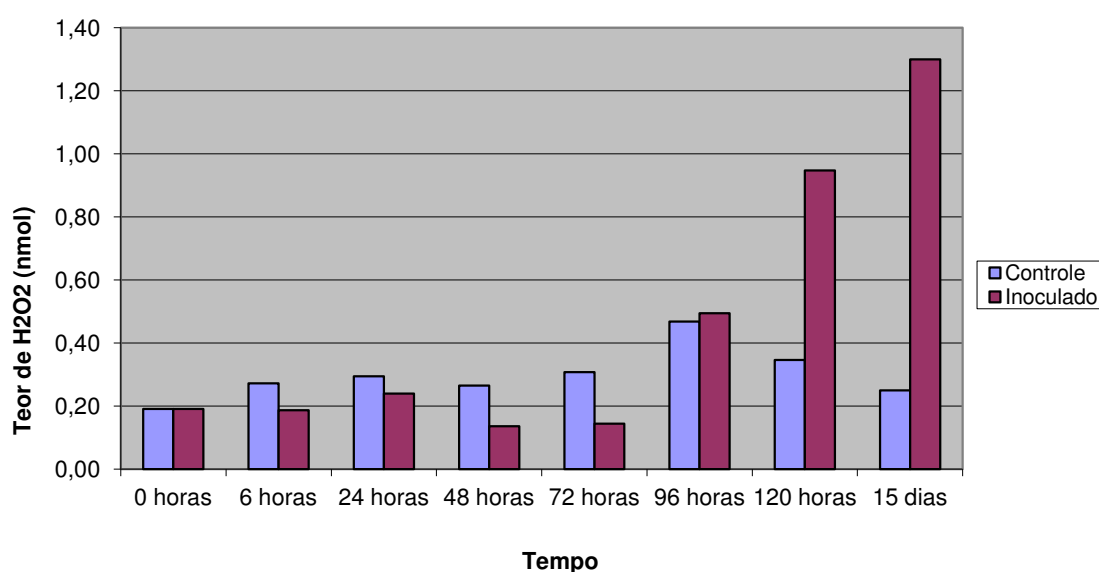
Para o experimento foi utilizado uma suspensão de esporos do fungo *M.fijiensis*, obtida a partir de culturas do fungo em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), contendo antibiótico cloranfenicol. A suspensão de esporos foi obtida de culturas frescas (20 dias após a repicagem), sendo a concentração final da suspensão ajustada para  $10^4$  conídios/mL em água destilada autoclavada (HANADA et al., 2002).

Para o tratamento, folhas intactas, totalmente expandidas, de plântulas micropropagadas já aclimatizadas, tiveram sua superfície abaxial inoculada com a suspensão de esporos. As folhas das plantas controles foram tratadas com água grau Milli-Q. Após 0, 24, 48, 72, 96, 120 horas e 15 dias da inoculação (hai), as folhas inoculadas foram coletadas. As folhas foram destacadas das plantas, lavadas com água grau Milli-Q, secas em papel de filtro, pesadas e congeladas a  $-20$  °C para análises posteriores.

O acúmulo de  $H_2O_2$  foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Gay e colaboradores (1999). Foram utilizadas 0,3g de folhas das cultivares estudadas de banana foram homogeneizadas com 1,5 mL de tampão Bórax-Borato, 50 mM, pH 8,4, em geral. A suspensão foi centrifugada (15 minutos, 13000 rpm, 4°C) e o sobrenadante usado para o ensaio. A mistura reacional, composta de 200  $\mu$ L do sobrenadante e 1 mL da solução de alaranjado de xilenol, foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente, e a absorbância lida a  $A_{560}$  nm. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (0-8,0 nmol  $H_2O_2$ ) foi construída e usada para determinar a quantidade de peróxido de hidrogênio nos tecidos vegetais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de  $H_2O_2$  mostraram, para a cultivar Maçã, um aumento, após a inoculação com o fungo *M. fijiensis*, quando comparado com o controle (Fig. 2). Os teores de  $H_2O_2$  variaram de 0,19  $nmolH_2O_2$  a 0,47  $nmolH_2O_2$  nas plantas controle e de 0,14  $nmolH_2O_2$  a 1,30  $nmolH_2O_2$  nas plantas inoculadas, alcançando maiores níveis 15 dias após a inoculação com o fungo.



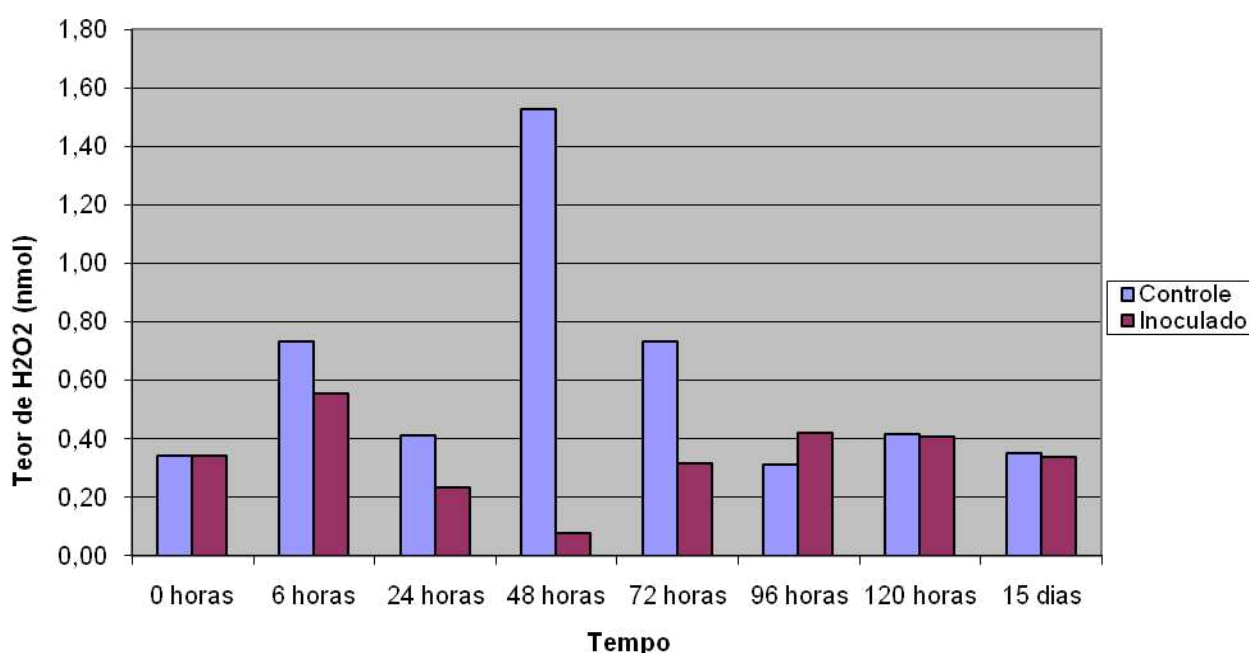
**Figura 2.** Teores de peróxido de hidrogênio na cultivar Maçã, na presença e ausência do fungo *M. fijiensis*.

Os baixos teores de  $H_2O_2$  nos tempos iniciais da interação pode indicar uma demora na ativação da resposta de defesa da cultivar Maçã, que é suscetível ao fungo (interação compatível), visto que este composto é tido como uma molécula que atua como sinalizadora de respostas de defesa (FINKEL, 2000). Neste caso, a resposta inicial, que seria a reação de hipersensibilidade (HR), sofreria um retardo com consecutivo prejuízo para a planta. Por outro lado, por ser a *M. fijiensis* um fungo hemibiotrófico, esse aumento nos níveis de  $H_2O_2$  em tempos tardios pode ser um fator que contribua para a colonização do fungo, pois a planta se defende aumentando os níveis de  $H_2O_2$  para matar as células infectadas e as próximas a ela, e é nesse momento que ao invés de beneficiar somente a planta beneficia também o fungo,

pois ele percebe a mudança na planta e em sua defesa passa para o estágio necrotrófico (HÜCKELHOVEN e KOGEL, 2003).

Aumento dos teores de  $H_2O_2$  em variedade suscetível também foi relatado por Fernandes (2004), trabalhando com o patossistema feijão-de-corda x *Colletotrichum lindemuthianum*. Aumento deste composto também foi observado em plantas de cevada que apresentavam manchas foliares (WU e VON TIEDEMANN, 2002).

A variedade FHIA-18, que é resistente ao fungo *M. fijiensis*, apresentou níveis basais de  $H_2O_2$  maiores que a cultivar Maçã, tendo os teores variado de 0,31  $nmolH_2O_2$  a 1,53  $nmolH_2O_2$  nas plantas controle. Nas plantas inoculadas, foram encontrados teores menores que a cultivar Maçã, com variação de 0,08  $nmolH_2O_2$  a 0,56  $nmolH_2O_2$  nas plantas inoculadas (Fig. 3).

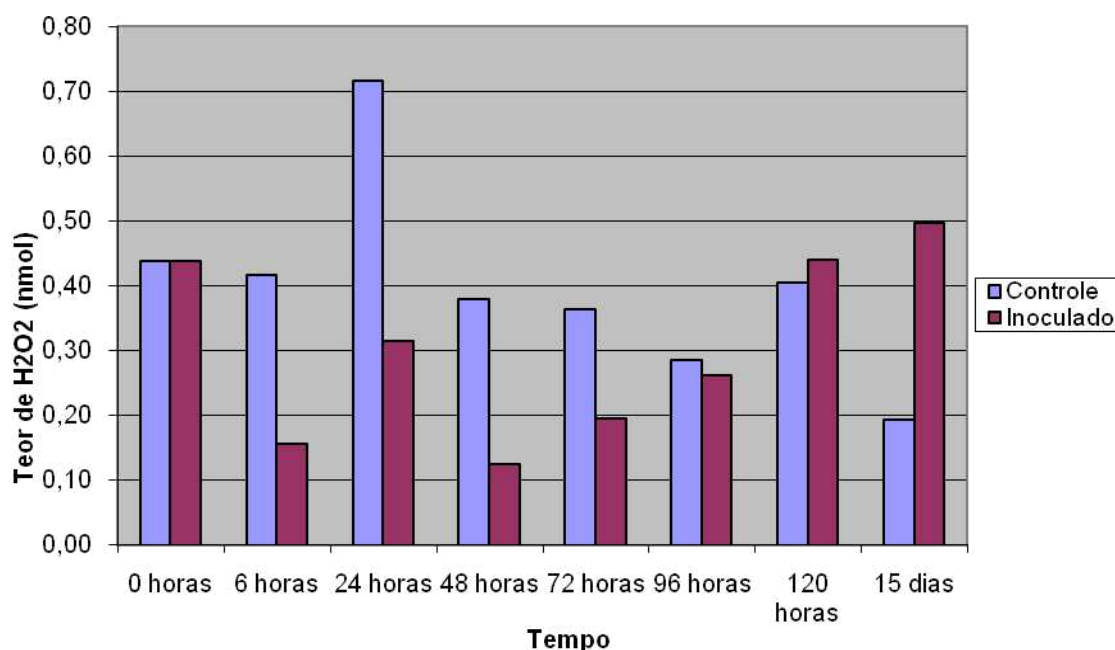


**Figura 3.** Teores de peróxido de hidrogênio na cultivar FHIA-18, na presença e ausência do fungo *M. fijiensis*.

Neste caso, os valores elevados de  $H_2O_2$  nos tempos iniciais podem estar garantindo a ativação do mecanismo de defesa da planta contra o ataque do fungo. Comparando com a cultivar Maçã, os valores inferiores, notadamente nos tempos tardios da interação, pode servir como uma forma de controlar um possível favorecimento ao desenvolvimento do fungo por meio de uma reação hipersensitiva exacerbada.

Resultados semelhantes foram encontrados para a variedade BRS Garantida, onde os valores de  $H_2O_2$  variaram de 0,19  $nmolH_2O_2$  a 0,72  $nmolH_2O_2$  nas plantas controle e de 0,13  $nmolH_2O_2$  a 0,50  $nmolH_2O_2$  nas plantas inoculadas (Fig. 4).

O mecanismo pelo qual o fungo induz o acúmulo de  $H_2O_2$  ainda não está bem compreendido. Mayer e colaboradores (2001) sugeriram que fungos necrotróficos talvez se valham de uma série de enzimas para estabelecer o processo infeccioso no hospedeiro, no caso da relação compatível.



**Figura 4.** Teores de peróxido de hidrogênio na cultivar BRS Garantida, na presença e ausência do fungo *M. fijiensis*.

## CONCLUSÃO

Para as análises realizadas nas variedades Maçã, FHIA-18 e BRS Garantida, os resultados alcançados até o momento sugerem a participação do peróxido de hidrogênio no mecanismo de defesa da bananeira contra o ataque do fungo *M. fijiensis*.

Os níveis de peróxido de hidrogênio encontrados na variedade suscetível sugerem que a ativação da resposta de defesa nesta variedade é tardia, quando comparada com a variedade resistente, o que pode comprometer a eficiência desta resposta.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, v. 276, n. 5313, p. 726-133, 1997.
- COSTA, J. N. M; MARCOLAN, A. L.; FERNANDES, C. F.; RAMOS, J. E. L.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; OLIVEIRA, S. J. M.; HOLANDA FILHO, Z. F. Sistema de produção para a cultura da banana no Estado de Rondônia. **Sistemas de produção** 29. Nov. 2007.
- FERNANDES, C. F. **Expressão de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e ao mecanismo de defesa do feijão-de-corda [vigna unguiculata (L.)Walp.] ao fungo Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav.** Tese de doutorado em bioquímica. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.2004.
- FERNANDES,C.F.; VIEIRA JUNIOR,J.R.; SILVA,D.S.G.; SANTIAGO,V.; MIRANDA,S.L.V.; COSTA,J.N.M.; HOLANDA FILHO,Z.F.; NUNES,A.M.L. **Sigatoka negra em Rondônia.**2007.
- FINKEL, T. Redox-dependent signal transduction. **FEBS Letters**, v. 476, p. 52-54, 2000.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; HANADA, R. E.; MONTARROYOS, A. V. V. Sigatoka-negra da bananeira. **Embrapa Amazônia Ocidental**. 2006.
- GAY, C., COLLINS, J., GEBICKI, J. M. Hydroperoxide assay with the ferric-xylene orange complex. **Analytical Biochemistry**, v. 273, p. 149-155, 1999.
- GORVIN, E. M.; LEVINE, A. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. **Current Biology**, v. 10, p. 751-757, 2000.
- HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense responses. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1773-1791, 1996.
- HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 170-173, 2002.
- HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station of University of California, Berkeley**, v. 347, p.139, 1950.
- HÜCKELHOVEN, R., KOGEL, K.-H. Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? **Planta**, v. 216, p. 891-902, 2003.
- IBGE Sidra – Sistema IBGE de Recuperação Automática. Banco de dados agregados. **Disponível em:** <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 19/11/2010.
- MARIN, D. H.; ROMERO, R. A.; GUZMAN, M.; SUTTON, T. B. Black sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. **Plant Disease** 87:208-222, 2003.



MAYER, A. M., STAPLES, R. C., GIL-AD, N. L. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in host expressing the hypersensitive response. **Phytochemistry**, v. 58, p. 33-41, 2001.

WU, Y.-X., VON TIEDEMANN, A. Evidence for oxidative stress involved in physiology leaf spot formation in winter and spring barley. **Phytopathology**, v. 92(2), p. 145-155, 2002.