

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PEROXIDASE DE ASCORBATO NA INTERAÇÃO ENTRE *Mycosphaerella fijiensis* e *Musa sp.*

Nidiane Dantas Reis¹, Cléberson de Freitas Fernandes², José Roberto Vieira Júnior², Raíze Ferraz de Lima¹, Hildebrando Antunes Júnior^{3,*}, Domingos Sávio Gomes da Silva², Carla Freire Celedonio Fernandes⁴.

¹Graduanda Farmácia, Faculdades Integradas Aparício Carvalho – FIMCA, Porto Velho, RO;

²Embrapa Rondônia, BR 364, km 5,5, Caixa Postal 406, CEP: 78900-970, Porto Velho, RO. Tel. (69) 3901-2532. E-mail: cleberson@cpafro.embrapa.br;

³Graduando Agronomia, UNIRON, Porto Velho, RO. ⁴Pesquisadora, Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais – Ipepatro, Porto Velho, RO.

*Bolsista PIBIC-CNPq.

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). 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 sigatoka negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, estágio anamórfico *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton (Gasparotto et al, 2006). 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).

Como já sabido, na interação entre planta e patógeno pode haver o sucesso da infecção (resposta compatível) ou a resistência (resposta incompatível). Nas interações incompatíveis, ou seja, naquelas em que a doença não ocorre, infecções por vírus, bactérias ou fungos irão elicitar respostas localizadas em torno das células infectadas do hospedeiro. Estas respostas incluem a produção de espécies reativas de oxigênio, que podem levar à morte da célula. Futuras respostas nas células ao redor incluem alterações na parede celular que podem inibir a penetração do patógeno e a síntese de compostos antimicrobianos, tais como fitoalexinas e PR-proteínas (Azarkan *et al.*, 1997).

A atividade de peroxidases do ascorbato (APX) é inerente a uma família de enzimas que eliminam peróxido de hidrogênio, às custas de ascorbato, formado durante os processos bioquímicos normais ou durante a imposição de estresses bióticos à planta, como infecção por patógenos (Burhenne e Gregersen, 2000), ou estresses abióticos, como salinidade, seca, compostos químicos ou variações de temperaturas (Peixoto et al, 1999). Constituem-se num dos principais componentes do sistema antioxidante de defesa das plantas superiores (Asada, 1992).

MATERIAL E MÉTODOS

Para os ensaios foram coletadas, no Campo Experimental da Embrapa Rondônia, folhas de bananeira com sintomas de ataque de sigatoka negra, assim como folhas sem os sintomas para as repetições controle. Foram coletadas folhas de variedades resistentes (Pacovan Ken e Fhia-18) e suscetíveis (Maçã, Nanicao e Prata Anã) ao fungo *M. fijiensis*.

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).

Dosagem de Proteínas: Para a determinação de proteína total, foi utilizado o método de Lowry modificado, tendo sido utilizados 100 uL do extrato total e 2000 uL do reagente BCA na mistura reacional. A mistura foi incubada por 30 minutos à 37 °C em banho-maria. A absorbância das amostras à 562 nm foi medida em espectrofotômetro Femto 700plus. A quantidade de proteína foi determinada utilizando-se uma curva de BSA.

Determinação da Atividade Peroxidase de Ascorbato: A atividade de peroxidase do ascorbato (APX) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Nakano e Asada (1981), modificada por Koshiba (1993), conforme descrito por Peixoto (1998), adaptada para as condições experimentais. A mistura reacional consistiu de 600 µL do tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, contendo 0,5 mM de ascorbato, 100 µL H₂O₂ 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, foi mensurado como índice de oxidação do ascorbato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dosagem de Proteínas:

Teores de proteínas variaram de: CONTROLE - 0,18 a 0,72 mgP/mL, nas variedades Maçã e Prata Anã, respectivamente; SINTOMÁTICAS – 0,28 a 0,89 mgP/mL, nas variedades Nanicao e FHIA 18, respectivamente (Fig. 1).

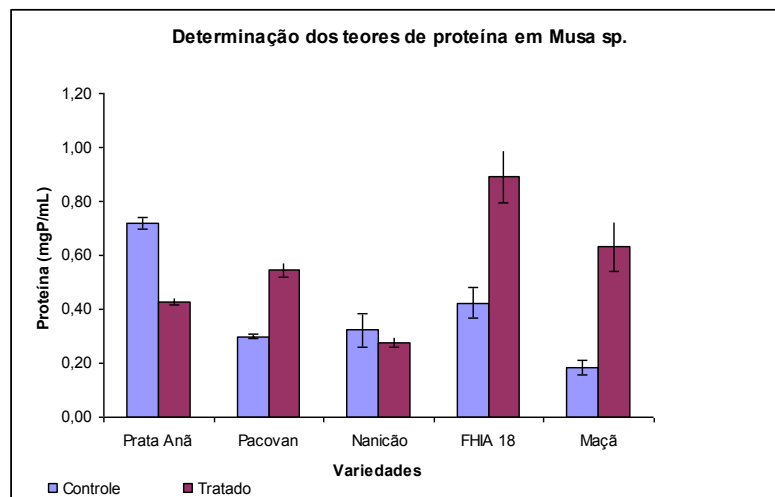


Figura 1. Determinação dos teores de proteína em extratos totais de *Musa sp.*, na ausência e presença do fungo *M. fijiensis*

Determinação da atividade peroxidase de ascorbato

Teores de peroxidase de ascorbato variaram de: CONTROLE - 0,0075 a 0,0145 umol Asc/mgP, nas variedades FHIA 18 e Prata Anã, respectivamente; SINTOMÁTICAS – 0,0058 a 0,0615 umol Asc/mgP, nas variedades Nanicao e FHIA 18, respectivamente (Fig. 2).

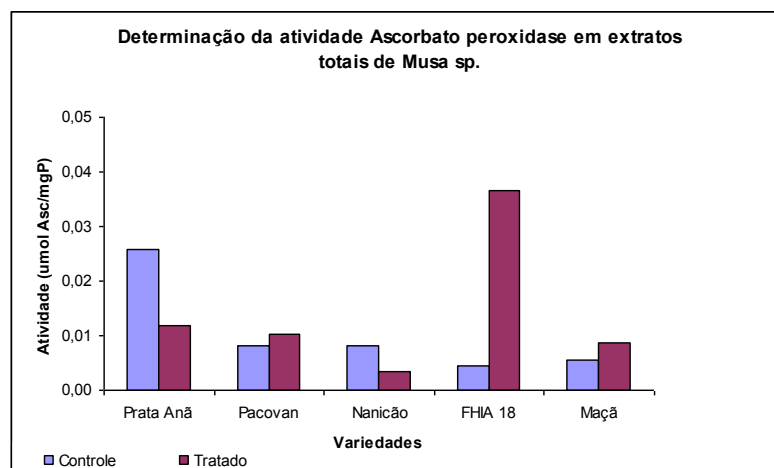


Figura 2. Determinação dos teores de ascorbato peroxidase em extratos totais de *Musa sp.*, na ausência e presença do fungo *M. fijiensis*

CONCLUSÕES

Para as análises bioquímicas, os resultados alcançados até o momento sugerem a participação da enzima peroxidase de ascorbato no mecanismo de defesa da bananeira contra o ataque do fungo. Entretanto, este mecanismo deve ter o auxílio das demais enzimas e compostos de defesa.

REFERÊNCIAS

- ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p.235-241, 1992.
- AZARKAN, M.; AMRANI, A.; VANDERMEERS, A.; SMOLDERS, N.; LOOZET, Y. Carica papaya latex is a rich source of class II chitinase. **Phytochemistry** 46, 8: 1319-1325.1997.
- BURHENNE, K., GREGERSEN, P. L. Up-regulation of the ascorbate-dependent antioxidative system in barley leaves during powdery mildew infection. **Molecular Plant Pathology**, v. 1(5), p. 303-314, 2000.
- 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.
- KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant Cell Physiology**, v. 34(5), p. 713-721, 1993.
- 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.
- NAKANO, Y., ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22(5), p. 867-880, 1981.
- PEIXOTO, P. H. P. Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] com tolerância diferencial ao alumínio. **Tese de Doutorado**. Viçosa, Minas Gerais, 95p., 1998.
- PEIXOTO, P. H. P., CAMBRAIA, J., SANT' ANNA, R., MOSQUIM, P. R., MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11(3), p. 137-143, 1999.
- SAABOR, A. et al. Banana. **FrutiSeries**, Brasília, DF, n. 6, p. 1-8, ago. 2000.