

ASPECTOS CITOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA INTERAÇÃO ENTRE *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* E *MUSA SP*

Nidiane Dantas Reis¹, Cléberon de Freitas Fernandes²

¹Graduanda Farmácia, Faculdades Integradas Aparício Carvalho – FIMCA, Porto Velho, RO, Bolsista CNPq; ² 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.

RESUMO: A bananeira é cultivada em todas as regiões tropicais do mundo, sendo a banana a fruta de maior produção e comercialização mundial. Entretanto, 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. Apresentando ampla distribuição geográfica, a sigatoka negra causa a morte precoce das folhas infectadas sendo responsável por perdas superiores a 50% da produção. Para se defenderem de doenças e pragas, as plantas estão equipadas com as 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, fenóis, PR-Proteínas e enzimas do estresse oxidativo, e as defesas induzidas.

Este trabalho relata as avaliações citológicas e bioquímicas decorrentes da interação entre o fungo *M. fijiensis* e *Musa sp.*, demonstrando os índices de germinação e penetração de esporos e os níveis de atividades de enzimas ligadas ao mecanismo de defesa da bananeira.

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

ABSTRACT: Banana is largely cultivated in all tropical regions of the world, and the banana is the most important fruit in production and marketing worldwide. However, the banana crop faces attack from diverse pathogens that contribute to reduced productivity, especially the black sigatoka, caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, anamorphic stage *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton. With a wide geographical distribution, the black sigatoka causes early leaf infected death and is responsible for losses of more than 50% of production. To defend themselves against diseases and pests, plants are equipped with constitutive defenses, naturally

present in plants, functioning as physical barriers such as cuticle and trichomes, and chemical barriers, including protease inhibitors, phenols, PR-proteins and enzymes of the oxidative stress, and the induced defenses, which are present after the pathogen attack or abiotic stresses. This work reports the cytological and biochemical assessments resulting from the interaction between the fungus *M. fijiensis* and *Musa sp.*, showing spore germination and penetration and levels of enzyme activities related to the banana defense mechanisms.

KEYWORDS: Black sigatoka, PR- proteins, *Musa sp*, *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 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. 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).

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 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 β -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

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, Nanicão e Prata Anã) ao fungo *M. fijiensis*.

2.1 Avaliação Citológica: Para a avaliação microscópica, folhas das cultivares de bananeira foram tratadas com solução de tricloroacético (TCA), onde a solução era trocada a cada 24 horas, até o total descoramento das folhas. Após o descoramento, as folhas foram mantidas em solução de glicerol 50% até a avaliação em microscópio óptico. Foram avaliados 60 sítios de interação por folha, em triplicata, observando-se parâmetros de germinação do conídio e penetração, seguindo a metodologia descrita por Hückelhoven e colaboradores (1999).

2.2 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).

2.3 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.

2.4 Determinação da Atividade Peroxidásica: 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 uL 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 (UA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação Citológica:

Nas avaliações citológicas foram observados índices de germinação de esporos que variaram de 87 a 93,9%, nas variedades Maçã e Prata Anã, respectivamente. Índices de penetração variaram de 11,3 a 19,2% nas variedades Pacovan Ken (resistente) e Prata Anã (susceptível), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Porcentagem de germinação e penetração de esporos do fungo *M. fijiensis* em variedades de *Musa sp.*

Variedades	Germinação	Penetração
Pacovan	91,7%	11,3%
Maçã	87,0%	17,2%
Prata anã	93,9%	19,2%
FHIA 18	84,5%	16,2%
Nanicão	87,8%	16,4%

Índices mais elevados de penetração foram observados nas variedades suscetíveis. Este resultado está de acordo com as características de cada variedade. Um fato que chamou a atenção foi o alto índice de penetração observado para a variedade FHIA 18. Esta proximidade dos valores de germinação e penetração das variedades susceptível e resistente (FHIA 18) pode ser atribuída, possivelmente, ao tempo de exposição das variedades ao patógeno durante o plantio no campo, o que pode ter ocasionado a proximidade das penetrações dos esporos.

3.2 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 Nanicão e FHIA 18, respectivamente (Fig. 1).

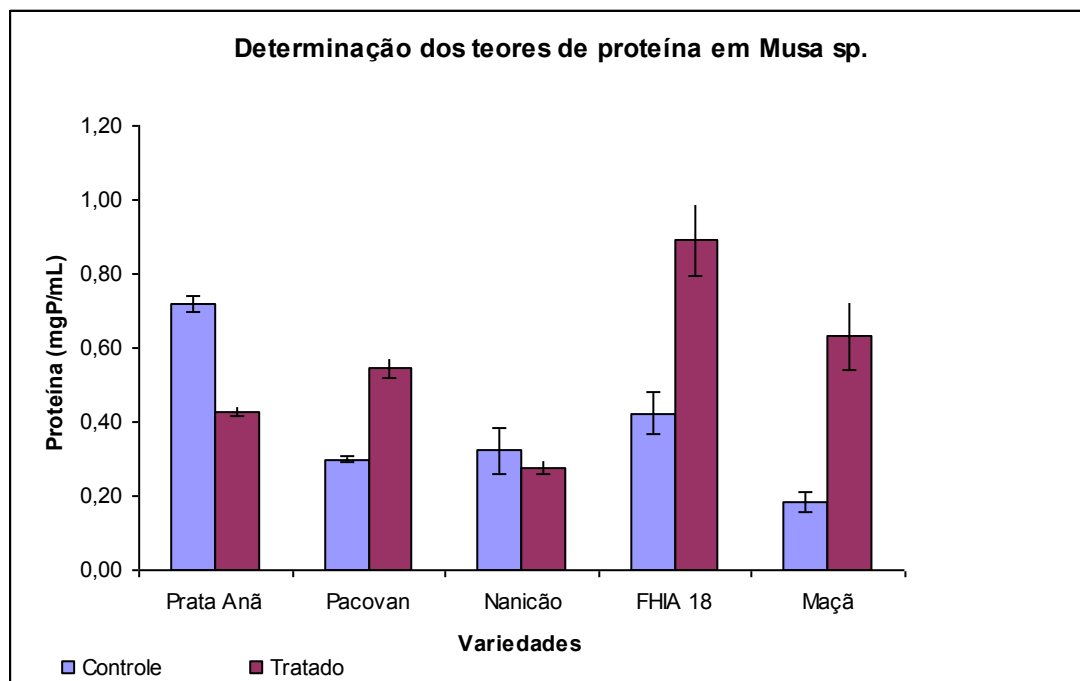


Figura 1. Determinação dos teores de proteína em extratos totais de *Musa sp.*, na ausência e presença do fungo *M. fijiensis*.

3.3 Determinação da Atividade Peroxidásica:

Níveis de atividade peroxidásica variaram de: CONTROLE – 9,5 a 27,81 UA/mgP, nas variedades Prata Anã e Maçã, respectivamente; SINTOMÁTICAS – 13,1 a 34,9 UA/mgP, nas variedades Prata Anã e Nanicão, respectivamente (Fig. 2).

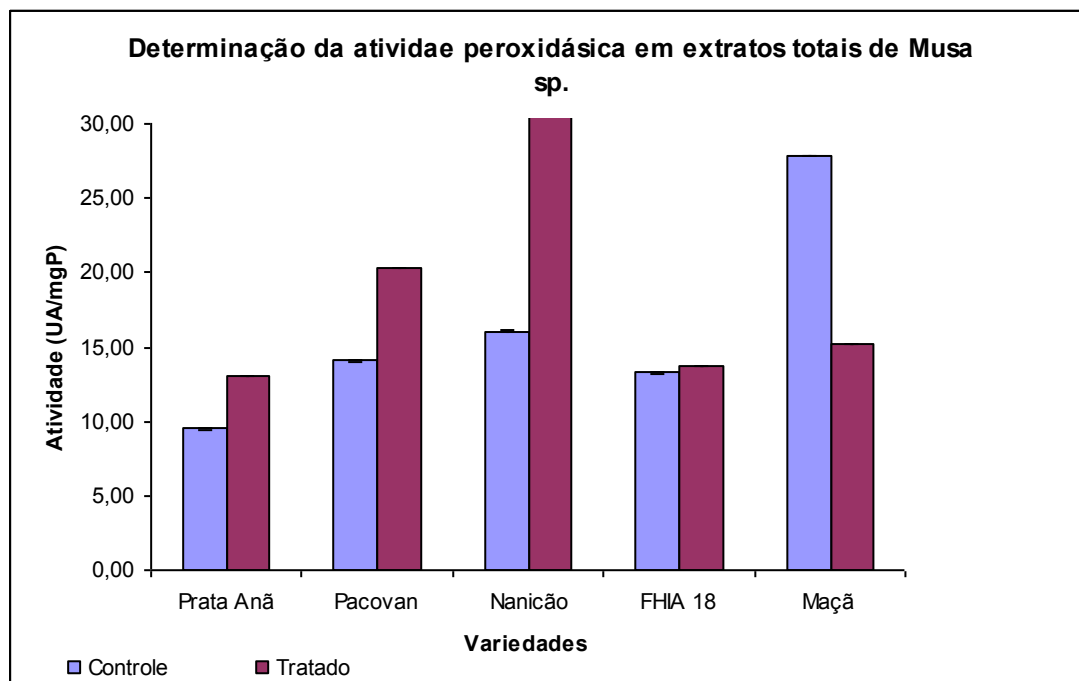


Figura 2. Determinação da atividade peroxidásica em extratos totais de *Musa sp.*, na ausência e presença do fungo *M. fijiensis*.

As atividades peroxidásicas mostraram um aumento em seus níveis de atividade na presença do fungo, com exceção das cultivares Maçã e FHIA 18. Tal resultado chamou atenção para a variedade FHIA 18, onde se esperava um aumento mais significativo desta atividade.

4. CONCLUSÕES

Para as análises citológicas, o percentual de penetração foi confirmatório quanto as características das variedades, tendo índices maiores nas suscetíveis quando comparadas com as variedades resistentes.

Para as análises bioquímicas, os resultados alcançados até o momento sugerem a participação da enzima peroxidase 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.

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
- 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.
- 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.