

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

UMBERTO ZOTTICH PEREIRA

**PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO
PROTÉICO DE FOLHAS DO ABACAXIZEIRO**

VITORIA
2006

UMBERTO ZOTTICH PEREIRA

PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO PROTÉICO DE FOLHAS DO ABACAXIZEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração de Fisiologia Molecular de Plantas.

Orientadora: Dr^a. Patrícia Machado Bueno Fernandes

VITORIA
2006

Umberto Zottich Pereira

PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO PROTÉICO DE FOLHAS DO ABACAXIZEIRO

Dissertação de mestrado submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Biologia Vegetal.

Aprovado em 12 / 06 / 2006 por:

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Patrícia M.B. Fernandes – UFES
Orientadora

Prof. Dr. José Aires Ventura – INCAPER
Examinador interno

Dr. Flávio Dessaune Tardin - INCAPER
Examinador externo

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci - UFES
Examinadora interna

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

P436p Pereira, Umberto Zottich, 1981-
Propriedade antifúngica de extrato protéico de folhas do
abacaxizeiro / Umberto Zottich Pereira. – 2006.
76 f. : il.

Orientadora: Patrícia Machado Bueno Fernandes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Espírito
Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. *Ananas comosus*. 2. Plantas - Proteínas. 3. Fungos. I.
Fernandes, Patrícia Machado Bueno. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

Aos meus pais Walter e Ângela, os grandes responsáveis pela minha formação, pelo amor e carinho constantes, pela alegria, compreensão e incentivo durante toda minha vida.

Dedico

Aos meus irmãos Gustavo e Walter pela compreensão, a Germana, que amo tanto, pelo apoio e carinho e aos meus alunos pela torcida por meu sucesso.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que tornaram possível a realização deste trabalho e de forma especial:

À Profa. Dr^a. Patrícia Machado Bueno Fernandes pela orientação, pela confiança e pela valiosa consideração.

Ao Dr. José Aires Ventura, pelas sugestões, pelo seu exemplo profissional e a quem admiro muito.

Ao Dr. Flávio Dessaune Tardin pelo apoio indispensável no desenvolvimento desta dissertação, pela atenção e paciência constantes e a quem tenho profundos agradecimentos.

À Dr^a. Maria do Carmo Pimentel Batitucci, pelo aceite na participação da banca examinadora.

A todos os amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial Fernando, Eliomara e Mirella Pupo pelo companheirismo.

A meu amigo Nelson, pela amizade e valiosas sugestões.

A minha querida Germana, pela valiosa amizade, carinho e incentivos dados nos momentos mais difíceis.

A todos os professores do curso de pós-graduação em Biologia Vegetal.

Aos funcionários do Centro Biomédico/ UFES.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado, Banco do Nordeste e FINEP pelos financiamentos concedidos.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	15
2.1. ABACAXI (<i>Ananas comoso</i> var. <i>comosus</i>).....	15
2.1.1. Origem e comércio	15
2.2. MELHORAMENTO DO ABACAXIZEIRO.....	17
2.3. MECANISMO DE DEFESA VEGETAL.....	18
2.3.1. Importância	18
2.3.2. Interação planta-patógeno	19
2.4. PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS DE PLANTAS.....	20
2.4.1. Peptídeos antimicrobianos	20
2.4.1.1. Defensinas.....	22
2.4.2. Quitinases	23
2.5. FUNGOS.....	24
2.5.1. Importância	24
2.5.2. Fungos de Importância Econômica Utilizados neste Trabalho	25
2.5.2.1. <i>Aspergillus niger</i>	25
2.5.2.2. <i>Beauveria bassiana</i>	26
2.5.2.3. <i>Cladosporium</i> sp.....	27
2.5.2.4. <i>Chalara paradoxa</i> (<i>Ceratocystis paradoxa</i>).....	28
2.5.2.5. <i>Colletotrichum gloesporioides</i> e <i>C. musae</i>	29
2.5.2.6. <i>Fusarium subglutinans</i> f. sp. <i>ananas</i>	29

2.5.2.7. <i>Penicillium</i> sp.....	30
2.5.2.8. <i>Trichophyton rubrum</i>	31
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL.....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. MATERIAL VEGETAL.....	34
4.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TECIDO VEGETAL.....	34
4.3. PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO.....	35
4.4. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO.....	36
4.5. FUNGOS.....	36
4.6. TESTE DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS TRÊS FRAÇÕES PROTÉICAS DO ABACAXI.....	37
4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. INIBIÇÃO FÚNGICA.....	39
5.2. ANÁLISE DAS RELAÇÕES ENTRE AS FRAÇÕES E SUAS CONCENTRAÇÕES	41
5.3. ANÁLISE QUALITATIVA DAS PROTEÍNAS DAS FOLHAS DE ABACAXI.....	43

5.4. ANÁLISE QUANTITATIVA DAS PROTEÍNAS DAS FOLHAS DE ABACAXI.....	43
5.4.1. Fungos Fitopatogênicos.....	59
5.4.2. Fungos Antropofílicos e Oportunistas.....	61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peptídeos e pequenas proteínas de plantas	21
Tabela 2 - Percentagens relativas à inibição fúngica	40
Tabela 3 - Comparação das médias das absorvâncias	45
Tabela 4 – Valores dos Coeficientes de determinação (R^2).....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Municípios produtores de Abacaxi no Estado do Espírito Santo.....	16
Figura 2 - Análise de regressão do crescimento de <i>Aspergillus niger</i>	48
Figura 3 - Análise de regressão do crescimento de <i>Beauveria bassiana</i>	49
Figura 4 - Análise de regressão do crescimento de <i>Chalara paradoxa</i>	50
Figura 5 - Análise de regressão do crescimento de <i>Cladosporium</i> sp.....	51
Figura 6 - Análise de regressão do crescimento de <i>Coletotrichum gloesporioides</i>	52
Figura 7 -Análise de regressão do crescimento de <i>Coletotrichum musae</i>	53
Figura 8 -Análise de regressão do crescimento de <i>Fusarium subglutinans</i> f. sp. <i>ananas</i>	54
Figura 9 - Análise de regressão do crescimento de <i>F. subglutinans</i> f. sp. <i>ananas</i> isolado E-261.....	55
Figura 10 - Análise de regressão do crescimento de <i>Penicilium</i> sp.....	56
Figura 11 - Análise de regressão do crescimento de <i>Trichophyton rubrum</i>	57

RESUMO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.) é uma fruteira de grande importância econômica para o Brasil, possuindo como principais limitações à sua expansão as doenças, principalmente as de origem fúngica. Desta forma foi avaliado e selecionado pelo INCAPER um genótipo resistente a fusariose (EC-099), não sendo conhecido ainda, qual o mecanismo de resistência desta planta. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo extrair proteínas dos tecidos clorofilados da folha do abacaxizeiro e testar suas atividades contra fungos de interesse econômico. Procedeu-se a extração protéica dos tecidos clorofilados das folhas, seguida da separação por peso molecular através da precipitação com sulfato de amônio, resultando em frações 0-20% (F1), 20-50% (F2) e de 50-75% (F3) p/v. A atividade antifúngica foi avaliada durante 4 dias através da leitura em espectrofotômetro por determinação do crescimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *C. paradoxa*, *Cladosporium* sp., *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* (E-261), este em isolados com e sem resistência ao fungicida benomil, *Penicillium* sp. e *Trichophyton rubrum* em meio líquido de batata dextrose (BD), inoculados com $1,5 \times 10^6$ esporos/ml. Foram avaliadas concentrações protéicas de 0; 0,05, 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/ml de cada fração. A F1 inibiu o crescimento de todos os fungos testados, obtendo as menores médias e diferindo estatisticamente das outras frações quando testados contra os fungos *A. niger*, *C. gloesporioides*, *C. musae*, *Cladosporium* sp., *F. subglutinans* f. sp. *ananas*, *Penicillium* sp. e *Trichophyton rubrum*. O desenvolvimento de *C. paradoxa* foi inibido pelas três frações, em cerca de 30%, não apresentando diferença significativa entre elas. As frações F2 e F3 apresentaram uma maior especificidade, para os fungos *A. niger* e *Cladosporium* sp. No entanto, F2 e F3 não foram eficientes para inibir o crescimento *F. subglutinans* f. sp. *ananas* em percentagens superiores a 20%. A F3 também inibiu o crescimento fúngico de *A. niger* em até 42,9%. Pela análise de regressão observou-se a melhor linearidade de inibição pela F1, obtendo os maiores valores do coeficiente de correlação linear, quando comparada com F2 e F3, exceto para os fungos *B. bassiana* e *C. paradoxa*. Os resultados obtidos nos testes demonstraram a existência de proteínas com ação antifúngica no genótipo do abacaxizeiro (EC-099) resistente a fusariose, sendo que a F1 apresentou a maior eficiência na inibição fúngica. Portanto, podemos inferir que estas proteínas podem estar associadas à resistência deste genótipo a fusariose. A existência de proteínas com um amplo espectro de ação contra fungos, indica o potencial da continuidade das pesquisas para a indústria farmacológica.

Palavras chaves: *Ananas comosus*, Proteínas antifúngicas, Fungos.

ABSTRACT

Although *Ananas comosus* (L.) Merr. is a fruit tree that has a great economic importance in Brazil it faces some limitations mainly in agriculture illness especially those that are caused by fungi. Thus, a fusariosis resistant genotype (EC-099) was selected by INCAPER. Nevertheless resistant factor of this plant is not clear yet. So, extract proteins from chlorophylls tissues of the plant leafs and test their activities against fungi of economic interest. Protein extraction was made followed by the separation by molecular weight trough precipitation with ammonium sulfate resulting in fractions 0-20% (F1), 20-50% (F2) and 50-75% (F3) p/v. The antifungal activity was evaluated during 4 days through in spectrophotometer analysis by determination of fungi growth *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Colletotrichum musae*, *Chalara paradoxa*, *Cladosporium* sp., *Fusarium subglutinans* f. sp. *anas* (E-261) resistant and proneness to the fungicidal Benomyl, *Penicilium* sp. e *Trichophyton rubrum* grown in a potato dextrose (BD) liquid medium, inoculated with $1,5 \times 10^6$ spores/ml. Concentrations of 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 and 0,5 mg/ml of each fraction were tested. F1 inhibited growth of all tested fungi that were, obtaining the minor media and differing statistically from the other fractions when tested against *A. niger*, *C. gloesporioides*, *C. musae*, *Cladosporium* sp., *F. subglutinans* f. sp. *anas*, *Penicilium* sp. and *T. rubrum*. The development of *C. paradoxa* was ~ 30% inhibited by the three fractions, and had no significant difference among them. The F2 and F3 fractions presented a higher specificity to *A. niger* and *Cladosporium* sp. However, F2 and F3 were not efficient to inhibit the growth of *F. subglutinans* f. sp. *anas* (less them 20%). F3 inhibited the *A. niger* growth up to 42,9%. By the regression analysis a better inhibition's linearity by F1 was observed, obtaining higher values of the coefficient of correlation linear, when compared with F2 and F3, excepted to fungi *B. bassiana* e *C. paradoxa*. The results obtained in the tests demonstrated the existence of proteins with antifungal action in the resistant genotype of the pineapple tree (EC-099) and F1 presented higher efficiency in fungal inhibition. Thus, we may deduce that these proteins might be associated with the resistance of this genotype to fusariosis. Furthermore, the results demonstrate the existence of proteins with a high specter of action against different lends of fungi, indicating that this is an important object of research in genetic and in pharmacological industry.

Key words: *Ananas comosus*, Antifungal proteins, fungi.

1. INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é uma espécie tropical de grande interesse econômico para o Brasil.

Conhecido mundialmente por seu sabor peculiar, o abacaxi também possui importantes qualidades medicinais, objetos de estudo quanto ao seu uso farmacológico.

Como entraves para o seu desenvolvimento destacam-se a alta severidade da fusariose e infestação de cochonilhas, cujo controle oneram os custos de produção e depreciam a qualidade dos frutos.

No estado do Espírito Santo três municípios, Itapemirim, Marataízes e Presidente Kennedy têm sua economia a agricultura, destaca-se pela produção e comercialização desta fruta. No entanto, a produção de abacaxi tornou-se dispendiosa pelas grandes perdas ocasionadas pela fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, chegando a inviabilizar a produção. O controle da doença, realizado através da utilização sistemática do fungicida benomil, atualmente proibido pelo Ministério da Agricultura, proporcionou o aparecimento de isolados resistentes do fungo. A partir do surgimento destes isolados resistentes, os agricultores intensificaram o uso do fungicida aumentando o risco de impactos ambientais e resíduos na fruta.

Uma das ações da Secretaria de Agricultura do Estado do Espírito Santo visa minimizar o uso de fungicidas nesta cultura, foi o desenvolvimento de um programa de pesquisa, realizado pelo Instituto Capixaba de Pesquisa e Assistência Técnica e Extensão Rural - INCAPER, para selecionar genótipos resistentes à fusariose. Deste programa foi selecionado o genótipo EC-099, cuja resistência ainda não é conhecida em nível celular ou molecular.

Um dos mecanismos importantes para a aquisição de resistência em plantas é a produção de diversas classes de proteínas, conhecidas como proteínas de defesa de plantas. Desta forma, pode-se inferir que este genótipo esteja produzindo constitutivamente uma ou mais classes destas proteínas. O entendimento das

propriedades terapêuticas destas proteínas poderá levar ao uso no tratamento, não só de doenças de plantas, mas também de animais e do homem.

Neste trabalho foi realizada a extração e separação de proteínas de *Ananas comosus* genótipo EC-099 e avaliadas *in vitro* quanto a sua capacidade da inibição do crescimento dos principais fungos com interesse econômico.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ABACAXI (*Ananas comosus* var. *comosus*)

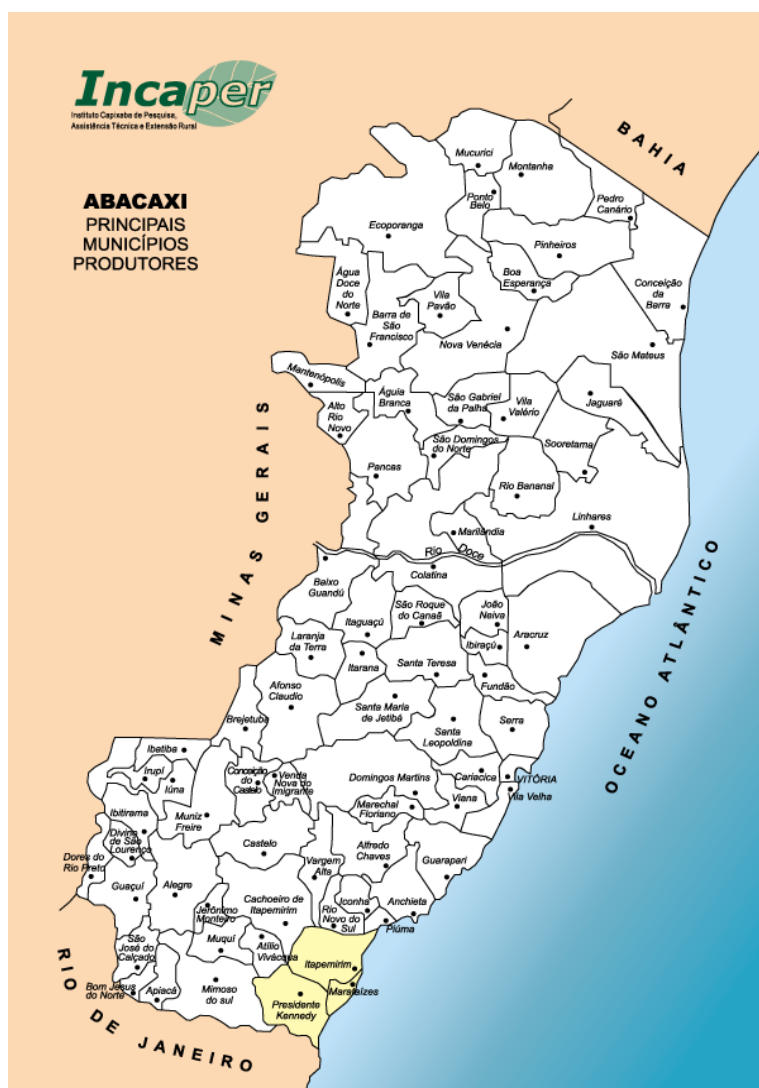
O abacaxi cultivado (*Ananas comosus* (L.) Merrill) é uma monocotiledônea da família *Bromeliaceae* que possui inflorescência terminal e múltiplos frutos. Quando adultas, as plantas de abacaxi medem aproximadamente um metro de altura. A inflorescência consiste de 50 a 200 flores individuais hermafroditas, com corola tubular. As flores normalmente são estéreis e formam frutos partenocarpos. A propagação vegetativa é a forma dominante de reprodução, ocorrendo pelas partes vegetativas como a coroa, o filhote e rebentão (BOTELLA et al, 2000). A polinização raramente ocorre, sendo observados abelhas nativas do gênero *Trigona* e Beija-flores visitando ocasionalmente as flores de abacaxi. As sementes são dormentes e possuem endospermas impermeáveis, sendo usadas somente para programas de germoplasma (OGTR, 2003).

Uma característica desta planta é uma maior resistência a períodos secos provocada pela adaptação na fixação de carbono fotossintetizado, conhecida como estratégia CAM (Metabolismo do ácido das Crassuláceas).

2.1.1. Origem e comércio

O abacaxi teve origem na América do Sul e foi domesticado pelos índios Tupi-Guarani, que a ele deram o nome de Nana, hoje chamado de Ananás (MORTON, 1987). A cultura tem uma produção mundial de aproximadamente treze milhões de toneladas, ocupando lugar de destaque entre as principais culturas de frutas tropicais do comércio internacional. O Brasil, com uma produção de um milhão e setecentos mil toneladas, sendo o segundo produtor mundial de abacaxi, ficando atrás apenas da Tailândia (EMBRAPA, 2004). Segundo dados de 2001 do INCAPER, o abacaxizeiro é uma planta de cultivo tradicional na região litorânea Sul do estado do Espírito Santo, principalmente

nos municípios de Marataízes, Itapemirim e Presidente Kennedy (Figura 1). Os principais cultivares plantados são Pérola e Smooth Cayenne, numa área de cerca de 4.000 ha. O consumo da fruta normalmente é “*in natura*” ou sob forma industrializada.



Fonte - INCAPER

Figura 1 – Municípios produtores de Abacaxi no Estado do Espírito Santo.

Além disso, o abacaxi também é usado para extração de bromelina, um complexo de enzimas proteolíticas (BARRETT et al., 1998) que contém diferentes cisteínas-proteinases similares, mas com seqüências de aminoácidos distintas, conferindo especificidade proteolítica e sensibilidade à inativação (ROWAN et al., 1990; NAPPER et al. 1994; HALE et al., 2005). A bromelina é muito usada em formulações na indústria farmacêutica como digestivo, antiinflamatório e solventes de mucosidades, como as que se acumulam nas vias respiratórias nas afecções broncopulmonares (COLINS, 1960; MONTINOLA, 1991). Pode ainda ser utilizada no combate a dor de garganta, acne, cravo, psoríase, psoríase vermelha, psoríase escamativa, esclerodermias, feridas, úlceras, chagas, máscara rejuvenecedora, digestivo e diurético.

2.2. MELHORAMENTO DO ABACAXIZEIRO

O primeiro trabalho de melhoramento genético do abacaxizeiro foi desenvolvido na Flórida (EUA) com os objetivos de obter cultivares mais adaptados às condições locais e de melhorar a qualidade do fruto para exploração industrial. Posteriormente, programas semelhantes foram conduzidos na África do Sul, Austrália, Costa do Marfim, França, Havaí (EUA), Índia e Malásia. Atualmente alguns programas também são desenvolvidos no Brasil, Cuba, Japão, Porto Rico e Venezuela (CABRAL, 1999).

No Estado do Espírito Santo, o Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), tem implementado ações voltadas para a sustentabilidade no meio rural, tendo como foco as demandas dos diversos segmentos das cadeias produtivas que compõem o agronegócio e agricultura familiar estadual. Dentre estas ações destacam-se programas de pesquisa que objetivam a seleção de genótipos de abacaxi com potencial econômico para o Estado.

Para tal, utilizou-se da metodologia de cruzamentos controlados entre o material conhecido e o que apresenta características a serem incorporadas à planta, realizando experimentos de hibridação entre os diversos cultivares, espécies e gêneros

disponíveis (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999). Os genótipos selecionados no ciclo de propagação sexual são submetidos a várias avaliações clonais para se observar a estabilidade das características de tais genótipos. Os melhores são multiplicados para avaliações posteriores, envolvendo maior número de plantas e vários ambientes (CABRAL et al., 2002; VENTURA, 1994).

No programa de melhoramento desenvolvido pelo INCAPER, vários híbridos foram desenvolvidos a partir do cruzamento entre os cultivares Perolera e Primavera, dos quais se destacou o híbrido EC-099, por apresentar um bom desempenho nas avaliações realizadas quanto à resistência a fusariose, e qualidades organolépticas. Entretanto ainda não foi estabelecido o mecanismo de resistência neste genótipo.

Outros programas de melhoramento, também merecem destaque pelos resultados obtidos no desenvolvimento de genótipos resistentes a fusariose, dentre eles os desenvolvidos pela EMBRAPA, onde 28.826 híbridos foram produzidos e 26 genótipos foram selecionados (CABRAL et al., 2002).

2.3. MECANISMOS DE DEFESA VEGETAL

2.3.1. Importância

Apesar da aparente passividade, associada ao caráter sedentário, as plantas reagem às agressões e sua alta capacidade de adaptação permite que elas sobrevivam mesmo tendo muitas vezes seu desenvolvimento prejudicado. Os efeitos são mais graves sobre as espécies de interesse agrícolas, muito vulneráveis porque, em geral, são usadas em monoculturas geneticamente uniformes. Quando uma doença atinge essas espécies, as perdas podem ser severas (PINHEIRO et al., 1999).

A resistência traduz-se por profundas alterações no metabolismo da célula vegetal, levando a ativação de vias complexas que culminam com a produção de uma série de proteínas e metabólitos celulares relacionados à defesa do vegetal. Tais proteínas exercem vários papéis, de forma direta (combatendo o agente agressor) ou indireta

(mantendo a estrutura e as funções celulares). Os mecanismos de resposta e as substâncias envolvidas nos processos de defesa vêm sendo bastante pesquisados, em especial nas últimas décadas (PINHEIRO et al. 1999).

2.3.2. Interação planta – patógeno

As plantas possuem um complexo aparato de defesa representado por substâncias produzidas continuamente ou, induzidas em resposta ao ataque por patógenos ou à condições ambientais adversas (BAKER et al., 1997; FEYS & PARKER, 2000; THOMMA et al., 2001).

Na interação planta-microorganismo, o contato contínuo estabelece, em alguns casos, uma interação íntima e complexa, resultando em mudanças na expressão gênica de ambos os indivíduos. Essa interação é considerada compatível quando o organismo fitopatogênico consegue invadir e colonizar o hospedeiro sem desencadear respostas específicas de defesa que impeçam a invasão do parasita, o que pode resultar na morte do vegetal hospedeiro (BAKER et al., 1997).

Quando o patógeno não consegue infectar a planta, essa associação caracteriza-se como uma interação do tipo incompatível. Neste tipo de interação, os produtos dos genes de avirulência (*Avr*) liberados pelo microorganismo interagem com produtos expressos a partir dos genes de resistência (*R*) da planta. A partir desta associação, denominada de interação gene-a-gene, é desencadeada uma série de respostas, entre elas, a síntese de vários compostos que possuem propriedades tóxicas ou que conferem maior rigidez à parede celular das células vegetais, impedindo a colonização da planta pelo patógeno (THOMMA et al., 2002; BAKER et al., 1997; STASKAWICZ et al., 1995).

Através da destruição do tecido vegetal, causada por microorganismos patogênicos ou predadores naturais como insetos e mamíferos, também é induzida uma resposta de defesa que leva à produção, por toda a planta, de inibidores de proteases, inibidores de α -amilase e proteínas relacionadas com a patogênese (PR). Os inibidores de protease

e de α -amilase causam efeitos antinutricionais em predadores, impedindo a utilização das proteínas ou de carboidratos dos tecidos vegetais ingeridos por estes (GREEN; RYAN, 1972; RYAN, 1990 e 2000).

2.4. PROTEÍNAS ANTIMICROBIANAS DE PLANTAS

2.4.1. Peptídeos antimicrobianos

Várias classes de moléculas já foram identificadas em plantas por apresentarem atividade antimicrobiana *in vitro*. Dentre elas destacam-se: (1) as espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxigem Species*), como o peróxido de hidrogênio e o peroxinitrito; (2) as fitoalexinas ou fitoanticipinas, que são pequenas moléculas orgânicas; (3) as proteínas relacionadas com a patogênese (PRs) e (4) vários peptídeos antimicrobianos (MENDEZ, 1990; GARCÍA-OLMEDO et al., 1998; GARCÍA-OLMEDO et al., 2001; AGIZZIO et al., 2003).

Como ilustrado na Tabela 1, esta última classe de macromoléculas pode ser dividida em 10 famílias, levando-se em consideração, principalmente, características estruturais. Geralmente os peptídeos antimicrobianos presentes em plantas possuem estrutura tridimensional globular, estabilizada pela presença de pontes dissulfeto. Incluídas neste caso estão: (1) as proteínas transportadoras de lipídeo (LTPs), as quais inicialmente acreditava-se participar no transporte de lipídios entre organelas; (2) as snakinas, que foram inicialmente isoladas de batata (*Solanum tuberosum*); (3) as defensinas de planta, inicialmente isoladas de sementes de cevada (*Hordeum vulgare*); (4) as tioninas, sendo a purotionina, isolada de trigo (*Triticum aestivum*), foi a primeira proteína cuja atividade contra patógenos de plantas foi detectada *in vitro*; (5) os peptídeos tipo-haveína, descritos inicialmente como os peptídeos mais abundantes do látex de seringueiras; (6) os peptídeos tipo-knotininas, isolados inicialmente de sementes de maravilha (*Mirabilis jalapa*); (7) as seferdinas, únicos peptídeos antimicrobianos de plantas descritos que não possuem pontes dissulfeto, representados por cadeias polipeptídicas lineares ricas em glicina e histidina, tendo sido isolados de raiz de bôlsa-

de-pastoros (*Capsella bursa-pastoris*); (8) peptídeos MBP-1, isolados de milho (*Zea mays*); (9) peptídeos macrocíclicos purificados de várias plantas da família Rubiaceae, como o café (*Coffea arabica*) e (10) pequenos peptídeos denominados lb-AMPs isolados de sementes de balsamina (*Impatiens balsamina*);

Tabela 1 - Peptídeos e pequenas proteínas de plantas com atividade antimicrobiana

Família	Nº de resíduos de aminoácidos	Nº de Pontes dissulfeto	Atividade
LTPs	90-95	3-4	antibacteriana; antifúngica
Snakinas	61-70	6	antibacteriana; antifúngica
Defensinas	45-54	4	antibacteriana; antifúngica; inibe α -amilase
Tioninas	45-47	3-4	antibacteriana; antifúngica
Haveina-like	43	4	antibacteriana (Gram +); antifúngica
Knotina-like	36-37	3	antibacteriana (Gram +); antifúngica
Seferdinas	28-38	0	antibacteriana; antifúngica
MBP-1	33	2	antibacteriana; antifúngica
Peptídeos Macrocíclicos	29-31	3	antibacteriana (Gram +)
lb-AMPs	30	2	antibacteriana (Gram +); antifúngica

Fonte: GARCÍA-OLMEDO et al., 2001.

2.4.1.1. Defensinas

Uma especial atenção deve ser dada a classe de proteínas chamadas de defensinas. Quando isoladas de plantas compreendem um grupo de peptídeos antimicrobianos de 45 a 54 aminoácidos, com quatro pontes dissulfeto intramoleculares.

O nome dado a esta família de proteínas decorre da similaridade estrutural e funcional destas proteínas de planta com defensinas isoladas de mamíferos e de insetos. A primeira defensina de mamíferos foi isolada a partir de macrófagos de coelho, em LEHRER et al., (1985). A partir de então, várias outras defensinas foram isoladas de diversas células de mamíferos, incluindo neutrófilos, macrófagos, células epiteliais do trato respiratório e gastrointestinal, entre outras.

Apesar da similaridade de estrutura secundária e terciária, as defensinas de plantas não apresentam similaridade significativa na seqüência de aminoácidos com as defensinas de insetos e mamíferos. As defensinas possuem uma estrutura compacta composta de uma folha- β e, no caso das defensinas isoladas de insetos e de plantas, uma α -hélice (LANDON et al.,1997).

A participação das defensinas nos processos de defesa das plantas foi inicialmente evidenciada por Chiang e Hadwinger (1991). Estes pesquisadores isolaram e clonaram dois cDNAs (ácido desoxirribonucléico complementar a fita de RNA mensageiro) de vagens de ervilha, cuja síntese dos respectivos mRNAs era aumentada após inoculação das vagens com um fitopatógeno incompatível (*Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*), levando a posterior inibição do crescimento do fungo em questão na região da infecção. As defensinas de plantas localizam-se preferencialmente na epiderme dos tecidos vegetais, no xilema e nos estômatos, que são regiões características para o contato inicial com patógenos (TERRAS et al., 1992; BROEKAERT et al., 1995; GARCÍA-OLMEDO et al., 1998 e 2001).

Em alguns casos é possível detectar a expressão constitutiva de defensinas, principalmente, na epiderme dos órgãos vegetais. Este é o caso das plantas de fumo (*Nicotina tabacum*), onde foi possível detectar através da técnica de hibridização *in situ*

a presença de mRNAs que codificam defensinas na epiderme de folhas e diferentes órgãos florais, excluindo-se as sépalas onde os transcritos só são detectados após inoculação destas com fungos (GU et al., 1992).

Através da técnica de imunolocalização e da avaliação da atividade antifúngica por difusão em agar, foi demonstrado que as defensinas Rs-AFPs isoladas de sementes de rabanete (*Raphanus sativus*), além de estarem presentes predominantemente na epiderme das sementes, também são secretadas para o meio ambiente durante o processo de germinação, logo após o rompimento da casca da semente pela radícula em crescimento, em quantidade suficiente para inibir o crescimento de fungos (TERRAS et al., 1992).

A hipótese de que as defensinas participam no processo de defesa dos vegetais superiores é reforçada pelo fato de que plantas transformadas com genes que expressam defensinas constitutivamente, em quantidades bem acima do normal, apresentam maior resistência à infecção por fungos em relação às plantas não transformadas. Como exemplos podemos citar o aumento da resistência do tabaco ao patógeno *Alternaria longipes* quando esta planta foi transformada com um gene quimérico da defensina Rs-AFP2 com o promotor viral constitutivo 35S (TERRAS et al., 1992) e o aumento da resistência da batata (*Solanum tuberosum*) ao fungo *Verticillium dahliae* a partir da superexpressão de defensina alfAFP, isolada de alfafa (*Medicago sativa*) (GAO et al., 2000).

2.4.2 Quitinases

As quitinases são enzimas com importante papel de proteção contra fungos fitopatogênicos, por degradar a quitina, um dos maiores componentes das células de muitos fungos (COLLINGE et al., 1993; GRAHAM et al., 1994).

Existem muitos sub-tipos de quitinases de planta e, normalmente, possuem massa molecular em torno de 25 - 35 kDa (COLLINGE et al., 1993), podendo ser produzidas

pela planta constitutivamente ou podendo ser proteínas relacionadas com a patogênese (PRs). Basicamente, pela seqüência de aminoácidos, as quitinases de plantas têm sido classificadas em quatro classes (TAIRA et al, 2005 e SINSHI et al. 2004):

- Classe I – quitinases com um domínio N-terminal (ligação – quitina) e um domínio catalítico.
- Classe II – quitinases com apenas um domínio catalítico homólogo ao da classe I.
- Classe III - quitinases com fragmentos sem homologia com as a quitinases das classes I e II.
- Classe IV – quitinases que possuem homologia com a classe I, exceto em quatro deleções.

Observa-se que plantas tropicais sob estresse osmótico, radiação ultravioleta e altas temperaturas, aumentam a expressão de genes codificadores de quitinases (NEUHAUS et al., 1999).

2.5. FUNGOS

2.5.1. Importância

Os fungos podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes, onde participam de maneira muito importante na degradação de matéria orgânica animal e vegetal. São também responsáveis por diversas doenças nas plantas e podem destruir alimentos e materiais como madeiras e tecidos. Os fungos têm grande relevância para a medicina, pois algumas espécies produzem substâncias como antibióticos, esteróides, ácidos orgânicos etc. Também têm grande valor para a indústria alimentícia, não só alguns deles são comestíveis como agem como fermentadores de alimentos como vinho, cerveja, pão, queijo etc.

Na Saúde Pública a micologia cresceu para uma ciência com numerosas aplicações teóricas e práticas buscando sempre o bem estar do homem, passando assim a ser instrumentos importantes, não só como objetos de estudo em busca de cura e soluções eficientes para as doenças por eles causadas, mas também como ferramentas em outras áreas como o controle biológico e a biotecnologia (MORAES et al., 1999).

Equipados com um aparato enzimático poderoso, responsável pela clivagem de compostos orgânicos, os fungos são muitas vezes, incômodos, podendo produzir toxinas cancerígenas, causar doenças dermatológicas em homens, animais e plantas, ou causando grandes perdas na agricultura (RAVEN et al., 1994). Desta forma serão descritos a seguir os fungos usados no presente trabalho.

2.5.2. Fungos de Importância Econômica Utilizados neste Trabalho

2.5.2.1. *Aspergillus niger* (Van Tieghem)

Pertencente ao filo Ascomycota, ordem Eurotiales, família Trichocomaceae, o gênero *Aspergillus* é representado por fungos filamentosos, com ampla distribuição geográfica. Este pode ser facilmente isolado do solo, restos de plantas e ar. O gênero *Aspergillus* possui cerca de 185 espécies, destas, cerca de 20 têm sido reportadas como agentes causadores de infecções oportunistas, podendo ser três os diagnósticos clínicos ao homem: I – infecção oportunista; II – estado alérgico; III – tóxico. A imunossupressão é o maior fator de predisposição para o desenvolvimento das infecções oportunistas (HO et al., 2000), presentes em um largo espectro, variando de uma infecção local, para disseminação até a aspergilose. Entre todos os fungos filamentosos, *Aspergillus* é em geral o mais facilmente isolado numa infecção. Dentre as muitas afecções causadas pelo gênero destacam-se: sinusite, aspergilose cerebral, pulmonar, cutânea e hepatoesplênica, miocardite, endocardite, entre outras (GALIMBERTI et al. 1998).

Construções em ambientes hospitalares constituem um grande risco para o desenvolvimento de aspergilose, particularmente em pacientes com sistema

imunológico debilitado (LOO et al. 1996). Algumas espécies *Aspergillus* produzem varias micotoxinas, que por ingestão crônica possuem potencial carcinogênico, particularmente em animais. Entre estas micotoxinas, a aflatoxina é conhecida por induzir o carcinoma hepatocelular, sendo produzida geralmente por *Aspergillus flavus*, contaminando gêneros alimentícios, tais como os amendoins (MORI et al. 1998). O Algumas espécies de *Aspergillus* podem causar infecções tanto nos animais quanto no homem podendo desenvolver infecções respiratórias nos pássaros e também induzir aborto em gado e carneiros, quando ingeridos em quantidades elevadas. (ST-GERMAIN et al. 1996).

A morfologia microscópica básica é mesma para todas as espécies. Entretanto, algumas outras estruturas microscópicas são originais a determinada espécie e constituem as características chaves para a identificação destas juntamente com a cor de superfície das colônias, quando crescidas em Placas de Petri. (ST-GERMAIN et al. 1996).

2.5.2.2. *Beauveria bassiana* (Balsarno) Vullemin

Representante do filo Ascomycota, classe Eufungi e ordem Clavicipitales, este fungo hialino foi primeiramente reconhecido como agente etiológico da doença do bicho-da-seda. É encontrado naturalmente em restos de plantas e solo (SHAW et al., 2002). Raramente é patogênico para pessoas, podendo ser associado com queratite e a pneumonia em pacientes com imunodeficiência. Entretanto, possui notável eficiência em causar infecções em insetos (VITALLIS et al., 2005).

Possui hifas hialinas, septadas e finas. As células conidiais são tipicamente em forma de frasco com uma base inflada e filamentos estreitos em zigzag no ápice. Os conídios são produzidos em cada ponto da dobra, lateralmente ao filamento. Este tipo de produção de conídio é chamado de crescimento geniculato simpodial. Os conídios (diâmetro: 2-4 μm) são hialinos de forma globosa a ovóide. As células conidiais tendem a dar forma a conjuntos densos, estes conjuntos aparecem como esferas

pequenas nas hifas aéreas quando vistos através da dissecação em microscópio (COLLIER et al. 1998).

O ciclo de vida de *B. bassiana* em um artrópode é iniciado com a germinação dos conídios que entram em contato com o integumento do artrópode e produz um tubo germinativo que penetra o fungo e coloniza o hospedeiro inicialmente com uma fase de levedura, que para muitos fungos entomopatogênico é uma fase parasítica obrigatória (ALVES, 1998).

2.5.2.3. *Cladosporium* sp.

Gênero pertencente ao filo Ascomycota, subfilo Ascomicotina, é distribuído extensamente no ar e no material orgânico podre e freqüentemente como um contaminador de alimentos (DIXON et al., 1991). Algumas espécies são predominantes de regiões tropicais e subtropicais (DE HOOG et al., 2000). O gênero *Cladosporium* inclui cerca de 30 espécies, dentre as quais as mais comuns são *C. elatum*, *C. herbarum*, *C. sphaerospermum*, e *C. cladosporioides*.

Podem ser agentes causadores de lesões de pele, de ceratoconjuntivite, de sinusite e de infecções pulmonares em humanos (PRITCHARD, et al., 1987), podendo também ser agente causador de doenças em plantas. *Cladosporium fulvum* [syn. *Passalora fulva*] (BRAUN et al., 2003) é o organismo causal do molde da folha do tomate. Geralmente, a folha é o único órgão afetado pelo fungo, embora ocasionalmente também as hastes, as flores, os pecíolos e a fruta sejam infectados (JONES et al., 1997). Os conídios do fungo podem infectar com sucesso se se estabelecerem no lado abaxial de uma folha, germinando e entrando subsequente no estômato aberto (BART et al., 2003).

O *Cladosporium* sp. produz hifas marrons e septadas, conidióforos eretos e pigmentados e conídios. Os conidióforos de *C. cladosporioides* e de *C. phaerospermum* não são geniculatos, enquanto *Cladosporium herbarum* têm uma aparência geniculata e

seus conidióforos têm sustentação terminal com inchaços intercalados. Os conídios de *Cladosporium* sp., no geral, são elípticos a cilíndricos na forma, com cor bege ao marrom escuro. A parede conidial é lisa ou ocasionalmente com pontas pequenas. O *C. cladosporioides* produz conídio unicelular, enquanto *C. herbarum* possuem duas a quatro células (COLLIER et al., 1998).

A taxa de crescimento de colônias do *Cladosporium* sp. é moderada no meio de cultura batata dextrose ágar à 25°C. Em placa de Petri, a cor é verde oliva a enegrecer-se por cima com textura aveludada e preta no reverso, não crescendo em temperaturas acima de 35°C (DIXON et al., 1991).

2.5.2.4. *Chalara paradoxa* (De Seyn) Hohn. (*Ceratocystis paradoxa*)

C. paradoxa é um fitopatógeno oportunista que infecta plantas estressadas, incluindo palmeiras, cana de açúcar, coco e abacaxi. É um fungo muito difundido, e sua patogenicidade à palma e ao abacaxi é muito documentada, em especial nas áreas onde a seca e a salinidade são elevadas (SULEMAN et al., 2001a; SULEMAN et al., 2001b).

O *Ceratocystis* é um gênero monofilético dispersado por inseto, sendo fungos patogênicos de plantas. As doenças causadas pelo *Ceratocystis* sp. ocorrem principalmente em angiospermas tanto em ecossistemas agrícolas, quanto naturais, em regiões tropicais do mundo (KILE, 1993). O *Ceratocystis paradoxa* foi associado com a podridão da folha, fruta e raiz do abacaxi (*Ananas comosus*) (KILE, 1993). *Ceratocystis radicola* (D.E. Bliss) C. Moreau (synonym: *Ceratostomella radicola*, anamorfo: *T. punctulata*) foi relatado como o agente causal da morte repentina (rhizosis) da palma madura dos EUA e da África do Sul (LINDE e SMITH, 1999; BLISS, 1941).

2.5.2.5. *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig), Penzig & Saccardo e *C. musae* (Berk. & M. A. Curtis)

Pertencente ao filo Ascomycota Classe Euascomycetes, Ordem Sordariales e a Família Chaetomiaceae, *Colletotrichum gloeosporioides*, teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & Schrenk, causador da antracnose em várias fruteiras, e *Colletotrichum musae*, específico da banana, ocorrem em áreas onde as condições climáticas são favoráveis aos patógenos (MATTA, 1982). Podendo ser observados com maior intensidade no período chuvoso e dependendo da região restringem-se a esse período. A alta umidade relativa e temperatura média ótima de 27°C favorecem o desenvolvimento da antracnose. Temperaturas baixas, como 15°C, limitam a doença, mesmo na presença de chuva. De modo geral, a doença torna-se mais expressiva no segundo ano do plantio de maracujá (TEIXEIRA, 1995; LIBERATO, 2002), embora existam práticas de manejo integrado recomendado para a pré-colheita (JUNQUEIRA, 2002). O patógeno ataca toda a parte aérea da planta em qualquer idade, causando sintomas como lesões necrosadas nas folhas, que podem cair; cancrios nos ramos, e manchas deprimidas de coloração escura nos frutos, que poderão afetar a polpa, resultar em podridão e provocar a queda destes frutos (PISSARRA et al, 1979).

2.5.2.6. *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* (Ventura, Zambolim & Gilbertson)

Dentre todas as doenças do abacaxizeiro, a fusariose destaca-se por ser a que maiores prejuízos econômicos traz aos produtores, uma vez que as perdas podem atingir até 80% da produção (SANTOS et al., 2002). A procedência das mudas usadas no plantio é um dos pontos mais importantes no bom rendimento dos pomares, podendo representar até 16% do custo de produção.

Decorrente a fusariose do abacaxizeiro estima-se que em algumas regiões produtoras, 15-20% das mudas são eliminadas durante o processo de seleção antes do plantio (VENTURA et al., 1993). O tratamento com fungicida das mudas em pré-plantio,

independentemente do tempo de tratamento e mesmo com altas doses, não tem ação curativa nas mudas já infectadas, além disso, o uso do fungicida sistêmico benomyl para o controle da doença tem induzido o aparecimento de isolados de fungo resistentes (VENTURA *et al.* 1994; SANTOS, 2000).

Em virtude da infecção de mudas em pré-plantio, vários autores recomendam a produção de mudas sadias usando-se a técnica da multiplicação rápida com seccionamento do talo (PISSARRA *et al.* 1979; REINHARDT, 1985; VENTURA *et al.* 1993; VENTURA, 1994) ou a micropropagação *in vitro*.

O fungo *Fusarium subglutinans* (Wollenweber & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas f. sp. *ananas* Ventura, Zambolim & Gilbertson; pertence ao filo Ascomycota, classe Deuteromiceto, ordem Moliniales e família Tuberculariaceae. Estes fungos deuteromiceto, que são conhecidos como fungos imperfeitos, reproduzem-se em sua maioria, na forma de conídios, que são esporos imóveis, produzidos pelas pontas ou pelos lados dos micélios (hifas) em células especializadas ou quando em sua forma Teleomórfica. Este fungo apresenta elevado grau de especificidade fisiológica, mostrando-se patogênico apenas ao abacaxi, causando a fusariose do abacaxi (*Ananas comosus* L.) (VENTURA *et al.* 1993). O patógeno é capaz de infectar praticamente toda a planta, colonizando desde a região das inserções foliares até os frutos e, principalmente, as mudas (PISSARRA *et al.*, 1979). Na fase adulta, as lesões restringem-se à parte basal, acompanhadas de podridão gomosa, enquanto que, em mudas, a exsudação gomosa é sempre menos pronunciada. Plantas com sintomas de fusariose podem apresentar encurtamento do talo, morte do ápice, enfezamento e clorose (PISSARRA *et al.*, 1979).

2.5.2.7. *Penicillium* sp.

Filo Ascomycota, classe Euscomycetes, Ordem Eurotiales, Família Trichomaceae, com somente uma exceção (o *Penicillium marneffeii*, que é termico dimorfo), os membros do gênero *Penicillium* são fungos filamentosos. Os *Penicillium* sp. é bastante

difundido, sendo encontrado no solo, na vegetação em deterioramento e no ar. O *P. marneffe* é endêmico do sudeste da Ásia, onde infecta os ratos de bambu, os quais são reservatórios epidemiológicos para infecções humanas.

O gênero *Penicillium* é geralmente considerado como contaminador, mas pode causar infecções, particularmente em pessoas com sistema imunológico debilitado. O *P. marneffe* é patogênico de pacientes com AIDS e sua isolamento do sangue é considerado como um marcador do HIV em áreas endêmicas. Além do seu potencial de infecção, os *Penicillium* sp. são produtores de micotoxinas (PITT et al., 2000). As espécies mais comuns incluem o *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. janthinellum*, *P. marneffe*, *P. purpurogenum*. A identificação em nível de espécie é baseada na morfologia macroscópica e em características microscópicas (DE HOOG et al. 2000).

As culturas de *Penicillium*, a exceção de *P. marneffe*, têm texturas lisas, filamentosas, aveludadas ou como algodão. As culturas são inicialmente brancas e transformam-se em verde azul, verde cinzento, cinza verde-oliva, amarelo ou rosa. O reverso da placa é geralmente pálido a amarelado (SUTTON et al., 1998; DE HOOG et al., 2000). As espécies, com exceção do *P. marneffe*, possuem hifas hialinas e septadas (1,5 a 5 µm de diâmetro), conidioforos simples ou ramificados. Os conídios (2,5-5 µm de diâmetro) são redondos, unicelulares (LARONE, 1995).

2.5.2.8. *Trichophyton rubrum* (Strain)

Trichophyton é um dermatófito que habita o solo, os seres humanos e outros animais. Relacionado a seus habitats naturais, o gênero inclui espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas. Algumas espécies são cosmopolitas, outras têm uma distribuição geográfica restrita. O *Trichophyton concentricum*, por exemplo, é endêmico das ilhas do pacífico, sudeste da Ásia e América central. Similar a outros dois gêneros, *Trichophyton* é um fungo filamentosos queratinofílico. A habilidade de invadir tecidos queratinizados com uso de diversas enzimas tais como proteinases ácidas, elastase, queratinases, e

outras proteinases, são os principais fatores de virulência destes fungos (WIETZMAN; SUMMERBELL, 1995).

O *Trichophyton rubrum* é o causador mais comum de dermatofitoses no mundo (ARENAS et al., 1995) podendo causar infecções invasivas em pacientes imunodebilitados (SQUEO et al. 1998). A taxa de crescimento de colônias de *Trichophyton* é lenta a moderadamente rápido, a cultura em placa de Petri possui textura aveludada, com o verso da placa de cor branca à violeta bege ou vermelha amarelada brilhante. O reverso é amarelado, marrom, ou avermelhado (SUTTON et al. 1998; DE HOOG et al. 2000).

Possuem hifas hialinas e septadas, com conidióforos, microconídio, macrogonídio e artroconídio presentes e clamidósporos também podendo ser produzido. Conidióforos são mal diferenciados das hifas. O microconídio é unicelular, redondo ou piriforme, sendo numerosos, podendo ser solitários ou arranjados em conjuntos, sendo o tipo predominante de conídio produzido por *Trichophyton*. Os macroconídios são multicelulares (duas ou mais células), lisos, ovais, cilíndricos ou em forma de bastão (SUTTON et al., 1998; DE HOOG et al., 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

A resistência de plantas a infecções fúngicas pode estar relacionada a proteínas que inibam o crescimento do patógeno. Desta forma, o presente trabalho visa à extrair, separar e analisar frações protéicas de folhas de mudas de abacaxi resistente a fusariose (EC099) quanto à potencialidade antifúngica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e fracionar proteínas da folha de abacaxi resistente a fusariose;
- Avaliar a eficiência inibitória de cada fração protéica no crescimento de diferentes fungos;
- Avaliar a capacidade generalista ou especialista das proteínas fracionadas quanto à ação inibitória ou fungitóxica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

As mudas de abacaxi do tipo rebentão, genótipo resistente EC-099 foram cedidas pelo INCAPER e plantadas em vasos plásticos de 25 cm de diâmetro e 30 cm de altura, contendo uma mistura de 2:1 p/p de terra adubada com esterco e areia de rio lavada, com irrigação quinzenal, mantidas no telado do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM), Núcleo de Biotecnologia, CCS, UFES, com sombreamento de aproximadamente 50%.

4.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO TECIDO VEGETAL

Os tecidos foliares clorofilados foram rompidos através de trituração em nitrogênio líquido e colocados rapidamente em tampão 30 mM Tris pH 7,5 com inibidores de proteases, aprotinina, pepstatina, leupeptina à concentração final de 25 μ M e PMSF 100 μ g/ml. A utilização dos inibidores é fundamental para a manutenção da integridade das proteínas extraídas por evitar a interferência das proteases capazes de fragmentar as proteínas de interesse. O extrato foi submetido a agitação por 4 horas à 4 °C, visando à diluição das proteínas no meio líquido. Restos celulares e macro elementos foram excluídos através de centrifugação por 40 min a 4 °C à 10000 rpm e recuperação do sobrenadante. Para a concentração das proteínas do sobrenadante, este foi colocado em um pequeno saco de membrana com poro de 3,5 kDa e colocado em uma bandeja contendo polietilenoglicol 4000. Desta forma, as proteínas de pesos moleculares superiores ao tamanho do poro ficaram retidas no interior da membrana. As proteínas concentradas foram armazenadas em freezer a -20 °C.

4.3. PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

A solubilidade de uma proteína em geral decresce em soluções com alta força iônica, resultado da competição entre os íons salinos adicionados e a proteína, diminuindo a capacidade de solvatação do solvente aquoso. Este fenômeno, conhecido como “salting out”, constitui-se em uma das técnicas mais utilizadas para a purificação de proteínas. O sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ é o sal mais utilizado para o “salting out”, uma vez que sua solubilidade é alta (3,9 M a 0°C), permitindo gerar soluções aquosas de alta força iônica.

O extrato protéico total foi colocado em um baker de 250 ml e submetido a leve agitação, em placa agitadora magnética, à 4° C. O sulfato de amônio foi adicionado ao extrato, até atingir (1) 20% (p/v) de saturação de sal. A adição deste sal foi realizada lentamente (\cong 1g/min), aguardando a dissolução total dos cristais antes de se adicionar mais sal ao extrato. Ao final, o extrato foi deixado sob agitação a fim de se obter a solubilização total do sal. Para obtenção da primeira fração, de proteínas de baixo peso molecular, foi efetuada uma centrifugação a 11.000 rpm por 20 min. O volume do sobrenadante foi medido com auxílio de uma proveta e o precipitado (pellet) dissolvido em água ultrapura com os inibidores de proteases.

Pra a obtenção das frações protéicas de médio e alto peso molecular procedeu-se como descrito anteriormente, aumentando a concentração de sal. Desta forma, ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio, até atingir (2) 50% (p/v) de saturação de sal. Após a centrifugação, o pellet foi solubilizado em água ultrapura contendo inibidores de proteases e o sobrenadante submetido a precipitação até (3) 75% (p/v) com posterior solubilização em água ultrapura contendo inibidores de protease.

Após as etapas de precipitação, as amostras foram colocadas em membranas seletivas e dializadas em água destilada durante 4hs, para a completa retirada do sal.

Desta forma, após a obtenção do extrato bruto, as proteínas foram isoladas em 3 frações:

- (1) F1, proteínas de baixo peso molecular, precipitadas na faixa de 0 a 20% de saturação de sal;
- (2) F2, proteínas de médio peso molecular, precipitadas na faixa de 20 a 50% de saturação de sal;
- (3) F3, proteínas de alto peso molecular, precipitadas na faixa de 50 a 75% de saturação.

4.4. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO PROTÉICO

O conteúdo de proteínas foi determinado a partir do método do biureto, descrito por Vilella et al. 1972, onde há formação de complexos corados na presença de CuSO_4 , resultante da formação de um complexo coordenação dos íons cúpricos com elétrons desemparelhados do nitrogênio da ligação peptídica, sendo a intensidade da cor diretamente proporcional a concentração de proteínas.

A curva padrão de proteínas foi determinada utilizando-se padrões de albumina de soro bovino nas concentrações de 1, 5, 10, 20 e 38 mg/ml. A leitura foi feita em espectrofotômetro à 545 nm em espectrofotômetro (Biomate 3, EUA) .

4.5. FUNGOS

Os fungos originários de plantas foram cedidos pelo INCAPER e os de alimentos e causadores de doenças em humanos foram cedidos pelo Departamento de Microbiologia da UFES. Todos os fungos foram crescidos e mantidos em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), a uma temperatura de 30 °C.

Para obtenção da suspensão de esporos procedeu-se a raspagem dos fungos crescidos em meio BDA. Estes foram diluídos em uma solução salina (0,9% NaCl, 0,1% Tween), filtrados em gaze dupla e armazenados à 10 °C.

4.6. TESTE DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DAS TRÊS FRAÇÕES PROTÉICAS DO ABACAXI.

Uma suspensão de esporos (1.5×10^6 conídios/ml) de cada um dos fungos testados foi inoculada em meio de cultura Batata-Dextrose, a uma concentração final de $10 \mu\text{l/ml}$. Alíquotas de $150 \mu\text{l}$ desta cultura foram colocadas nos poços de placas de 96 poços (tipo placa de ELISA). A cada poço foram adicionadas diferentes concentrações protéicas (0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/ml de proteína) e tampão 30 mM Tris pH 7,5 para um volume final de $300 \mu\text{l}$. Como controle negativo utilizou-se água destilada estéril. As placas foram incubadas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 ou 4 dias, tempo necessário para que o microorganismo controle atingisse metade da fase exponencial de crescimento. O crescimento fúngico foi acompanhado em espectrofotômetro a uma densidade ótica (DO) de 620 nm em aparelho de ELISA (ELX 800 LBP, EUA).

4.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A absorbância mensurada foi submetida a uma análise de variância conforme o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, num esquema fatorial 3×7 , sendo 3 frações protéicas (0-20%, 20-50% e 50-75% de saturação salina) e 7 concentrações protéicas (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5mg/ml) de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + C_j + FC_{ij} + e_{ijk} ;$$

em que:

y_{ijk} = observação da característica avaliada dentro da concentração j na fração i;

μ = média geral;

F_i = efeito relativo à fração i;

C_j = efeito relativo à concentração j;

FC_{ij} = efeito da interação entre concentração e fração.

e_{ijk} = erro experimental

No caso de diferenças significativas, pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade, para as diferentes frações, foi realizado o teste de comparação de médias de Tukey ($P < 0,05$). Já para diferenças significativas entre concentrações, por se tratar de uma variável quantitativa, foram realizadas análises de regressão e confeccionados os gráficos com as linhas lineares de tendência para cada fração ao longo das concentrações protéicas. No caso de interação significativa entre concentração e fração, foram realizados os desdobramentos necessários, estudando-se o comportamento fúngico para as frações dentro de cada concentração bem como das concentrações dentro de cada fração.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. INIBIÇÃO FÚNGICA

Proteínas totais foram extraídas de folhas de mudas do genótipo EC099, resistente a fusariose do abacaxizeiro. A partir deste extrato, procedeu-se uma separação baseada no peso molecular das proteínas, por precipitação salina (“salting out”). Desta forma, proteínas de baixo peso molecular (PM) foram coletadas na primeira fração (F1), as de peso molecular intermediário, na segunda fração (F2) e as maiores, na terceira fração (F3).

Conforme já descrito no item Material e Métodos, as frações obtidas (F1, F2 e F3) representam diferentes grupos protéicos, de grande importância na identificação de proteínas com atividade antifúngica. Desta forma, esta metodologia de separação pode ser utilizada como ferramenta eficaz, sendo uma etapa que precedem a purificação de uma proteína específica (SILVA, 2004).

O presente trabalho apresenta os resultados de atividade antifúngica obtidos com concentrações crescentes de cada uma das três frações (F1, F2, F3), contra 10 diferentes fungos de importância econômica.

Os ensaios antifúngicos foram realizados em placas do tipo ELISA, onde o crescimento dos fungos na presença das diferentes frações protéicas foi acompanhado diariamente através da medida da absorbância a 620 nm. A eficácia das frações foi observada através da inibição do crescimento fúngico, que, em alguns casos, foi superior a 50%, como apresentado na Tabela 2.

A F1 foi capaz de inibir o crescimento de todos os dez diferentes fungos testados, apresentando portanto, um caráter generalista. Quando comparada à inibição observada para as demais frações, F2 e F3, nota-se que a F1 apresentou a maior percentagem de inibição, com inibição superior a 30 % para todos dos fungos testados exceto *Beuveria bassiana* (Tabela 2).

Por outro lado, F2 e F3 além de apresentarem um potencial de inibição fúngica inferior a F1, também foram menos eficazes em inibir o crescimento dos fungos antropofílicos e oportunistas, apresentando um valor de inibição do crescimento inferior a 20% para *Penicillium* sp. e *T. rubrum*. Mais ainda, essas frações apresentaram maior potencial inibitório quando testado contra o fungo fitopatogênico *Chalara paradoxa*, o que poderá ser mais bem observado na análise de regressão. Entretanto, ainda em relação aos fungos fitopatogênicos, enquanto F1 apresentou inibições que variaram de 30 à 50% a F2 e F3 não foram eficientes em inibir o crescimento destes fungos a uma percentagem superior a 20%, salvo quando submetido ao crescimento de *C. paradoxa* (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentagens relativas à inibição fúngica em diferentes frações protéicas na concentração de 5mg/ml.

Fungos	Inibição de crescimento (%)		
	Fração 1	Fração 2	Fração 3
<i>Aspergillus niger</i>	65,66	38,57	42,9
<i>Beauveria bassiana</i>	21,02	<20	<20
<i>Chalara paradoxa</i>	32,64	27,79	30,72
<i>Cladosporium</i> sp.	50,1	<20	36,12
<i>Collettrichum gloesporioides</i>	49,45	<20	<20
<i>C. musae</i>	30,41	<20	<20
<i>F. subglutianans</i> f. sp. <i>ananas</i>	48,86	<20	<20
<i>F. subglutianans</i> f. sp. <i>ananas</i> (E-261)	47,56	<20	<20
<i>Penicillium</i> sp.	39,31	<20	<20
<i>Trichophyton rubrum</i>	49,15	<20	<20

<20 – percentagem de inibição inferior a 20% quando comparado ao controle negativo

Esses resultados corroboram com a observação de Geyid et al. (2005), de que a atividade de alguns extratos de plantas quanto à inibição de diferentes organismos esta relacionada à sua grande diversidade genética, oriunda dos processos evolutivos.

Contudo, segundo os mesmos autores, a maioria destes extratos depende de um espectro estreito de atividade.

A reação das plantas contra diferentes patógenos, então, parece estar relacionada diretamente à diversidade qualitativa e ou quantitativa das proteínas que estão sendo acumuladas pelas plantas investigadas (GEYID et al., 2005). Desta forma, uma análise qualitativa é realizada ao se separar as proteínas da planta em diferentes frações e testa-las contra diferentes fungos. Enquanto que uma análise quantitativa é feita através do teste de diferentes concentrações protéicas contra os fungos, expressando a quantidade de proteínas de uma determinada fração protéica necessária para inibição fúngica.

5.2. ANÁLISE DAS RELAÇÕES ENTRE AS FRAÇÕES E SUAS CONCENTRAÇÕES.

A análise de variância (ANOVA) mostrou a diferença significativa entre os tratamentos (frações e concentrações), evidenciada pelo teste F, ao nível de 5% de probabilidade, onde os quadrados médios demonstram diferenças significativas para a absorvância avaliada (Apêndice A). A análise de variância de um delineamento inteiramente casualizado, indica ainda, a existência de pelo menos uma fração ou uma concentração diferindo das demais ao nível de 5% de probabilidade.

Nos ensaios antifúngicos, três diferentes frações protéicas foram avaliadas quanto sua capacidade de inibição do desenvolvimento fúngico. Para cada fração, sete tratamentos diferentes, com concentrações crescentes de proteínas, tiveram sua eficiência inibitória avaliada. Tal inibição fúngica foi mensurada na leitura da absorvância em espectrofotômetro, sendo esta, diretamente proporcional ao crescimento fúngico.

No experimento, a eficiência pôde ser observada a partir do coeficiente de variação (CV), demonstrando que a precisão do experimento foi relativamente elevada na

característica avaliada (Apêndice A), levando-se em conta que se trata de um experimento biológico.

Sabendo-se que as concentrações formam um gradiente de inibição, procedeu a análise de variância, a fim de verificar a diferença entre as concentrações de frações distintas (Cx F). Tal investigação demonstrou que pelo menos em uma concentração das três frações diferem quanto à progressão aritmética, fugindo ao padrão linear decrescente na medida em que se aumenta a concentração. Desta forma, é possível observar que os fungos *B. bassiana*, *C. paradoxa*, *F. subglutinans* f. sp. *ananas* isolado E-261 e *C. musae* apresentaram diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade, quando comparados as concentrações protéicas com as frações, em outras palavras, nestes fungos o padrão de inibição das três frações não são semelhantes, o que pode ser melhor observado através da análise de regressão discutida mais adiante.

Para melhor compreensão das concentrações responsáveis pela diferença dos padrões decrescentes, fez-se necessário a comparação das médias através do teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (dado não mostrado), a partir do qual foi observada diferença significativa em seis concentrações de *B. bassiana*, *F. subglutinans* f. sp. *ananas* isolado E-261 e *C. musae*, provavelmente ocasionada pelos valores inferiores das absorbâncias obtidas na F1.

C. paradoxa apresentou apenas a concentração de 0,4 mg/ml, da F1, diferindo da mesma dose das F2 e F3. Tal diferença provavelmente foi ocasionada por contaminação de um dos poços da placa utilizada, fazendo com que a média da concentração 0,4 mg/ml fosse mais alta na F1 do que nas demais frações.

5.3. ANÁLISE QUALITATIVA DAS PROTEÍNAS DAS FOLHAS DE ABACAXI

As três frações avaliadas causaram efeitos distintos sobre os fungos testados. A partir de tais efeitos foi possível observar a fração que teve a maior eficiência antifúngica. Para isso, analisou-se a média das absorvâncias dos crescimentos dos fungos em relação as diferentes frações.

A F1 foi a mais relacionada à inibição fúngica, exibindo as menores médias e diferindo das demais, exceto quando testada para *C. paradoxa* e *Cladosporium* sp., que não apresentaram diferenças significativas entre as frações. Contudo, estes fungos obtiveram a menor média de crescimento na F1 (Tabela 3).

Portanto, objetivando a descoberta de proteínas relacionadas à resistência a doenças, a F1 seria a fração protéica da folha de abacaxi de interesse para posterior purificação. Considerando que, uma vez descoberta a proteína com capacidade antifúngica, seu seqüenciamento e, conseqüentemente, seu gene codificador poderá ser de grande interesse para programas de melhoramento genético.

5.4. ANÁLISE QUANTITATIVA DAS PROTEÍNAS DAS FOLHAS DE ABACAXI

Com a análise de regressão foi possível observar de que forma se comportou cada fungo quando submetido às concentrações das diferentes frações. Apesar de comprovada a melhor eficiência na inibição fúngica pela F1, o uso da análise de regressão é indicada para a melhor compreensão do crescimento fúngico, já que a absorvância neste experimento caracteriza um dado quantitativo.

A correlação linear negativa obtida neste trabalho refere-se à inibição do crescimento fúngico associado ao aumento da concentração protéica. Quanto mais uniforme for essa inibição, em relação à concentração protéica, maior será o coeficiente de

determinação (R^2) (Tabela 4). Determinando, assim, um valor de “confiabilidade” na linearidade, conforme se aumenta à concentração protéica.

Tabela 3 – Comparação das médias das absorvâncias, relativa ao crescimento dos diferentes fungos em três extratos protéicos obtidos de folha de abacaxizeiro.

Fração	Absorvância (620 nm) ¹									
	ASP	BEA	CHA	CLA	FUSR	FUSS	GLO	MUS	PEN	TRI
1	0.3637 b ²	0.4372 b	0.4543 a	0.3427 a	0.3412 b	0.3453 c	0.3826 b	0.6791 b	0.3830 b	0.3570 b
2	0.5004 a	0.5288 a	0.4453 a	0.3101 a	0.4141 a	0.4738 a	0.4689 a	0.8270 a	0.4415 a	0.4430 a
3	0.4985 a	0.4372 a	0.4352 a	0.3120 a	0.4435 a	0.4364 b	0.4712 a	0.7263 b	0.4611 a	0.4019 ab

1 - ASP – *Aspergillus niger*; BEA – *Beauveria bassiana*; CHA – *Chalara paradoxa*; CLA – *Cladosporium* sp.; FUSR – *Fusarium subglutinans* f sp. ananas isolado E-261; FUSS – *F. subglutinans* f sp. ananas susceptível ao Benomyl; GLO – *Colletotrichum gloesporioides*; MUS – *C. musae*; PEN – *Penicillium* sp.; TRI – *Trichophyton rubrum*.

2 - Médias de 3 repetições de 6 concentrações. Médias seguidas na coluna pela mesma letra, não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Tabela 4 – Valores dos Coeficientes de determinação (R^2) referentes as regressões das figuras 1 à 10.

Fração	Fungos ¹ (R^2)									
	ASP	BEA	CHA	CLA	FUSR	FUSS	GLO	MUS	PEN	TRI
1	0,5317	0,6435	0,2419	0,9025	0,5317	0,7223	0,7161	0,8987	0,8367	0,905
2	0,1939	0,8294	0,8732	0,0002	0,1939	0,2163	0,2612	0,4134	0,0061	0,6701
3	0,3512	0,3378	0,8394	0,2687	0,3512	0,0003	0,267	0,0369	0,0678	0,0651

1 - ASP – *Aspergillus niger*; BEA – *Beauveria bassiana*; CHA – *Chalara paradoxa*; CLA – *Cladosporium* sp.; FUSR – *Fusarium subglutinans* f sp. ananas isolado E-261; FUSS – *F. subglutinans* f sp. ananas susceptível ao Benomyl; GLO – *Colletotrichum gloesporioides*; MUS – *C. musae*; PEN – *Penicillium* sp.; TRI – *Trichophyton rubrum*

Pela regressão linear, foi possível observar que em todos os fungos submetidos à F1 ocorreram correlações lineares negativas. Comprovando-se, assim, a eficiência da fração na inibição fúngica quando se eleva a concentração. Já para as F2 e F3 este comportamento não foi expressivo para todos os fungos, conforme pode ser observado nas figuras 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10. Também puderam-se verificar valores inferiores do R^2 para a F2 e F3, que demonstram uma menor representatividade da regressão linear quando comparados com F1 (Tabela 4).

A menor representatividade da regressão linear, diminui a confiabilidade da maioria das inibições ocasionadas pelas F2 e F3 (Tabela 2), já que a concentração protéica não influencia proporcionalmente a inibição fúngica. No entanto, a F1 obteve em sua maioria valores de R^2 superiores a 0,5, salvo na regressão de *C. paradoxa* (Tabela 4), demonstrando assim, a maior regularidade das inibições ocasionadas pelas concentrações da F1.

Contudo, analisando-se dois diferentes trabalhos, onde o objetivo principal era a descoberta de peptídeos antimicrobianos da classe das defensinas, podem-se observar comportamentos distintos para proteínas de mesma classe. Almeida et al., (2000) e Pervieux et al., (2004) purificaram defensinas de ervilha e de sementes de maracujá, respectivamente, a partir de frações protéicas de 20 a 50% de saturação por sulfato de amônio. Os autores do primeiro trabalho demonstraram que a inibição fúngica estava diretamente proporcional à concentração protéica testada, no entanto, o desvio padrão encontrado por Pervieux et al., (2004) para as diferentes concentrações era muito alto, fazendo com que o aumento da concentração aparentemente não influenciasse na inibição fúngica, semelhantemente as inibições ocasionadas por F2 e F3.

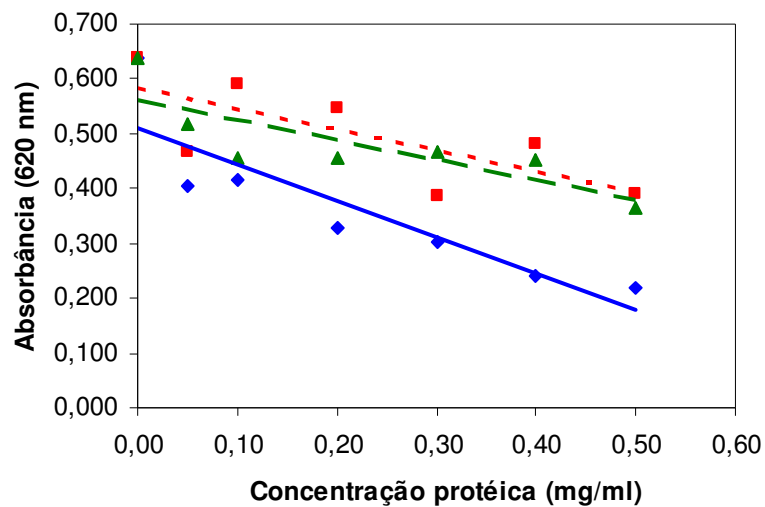


Figura 2 – Análise de regressão do crescimento de *Aspergillus niger* sob diferentes concentrações de 3 frações protéicas (F1 —, F2 - - - - - , F3 - - -) da folha de *Ananas comosus* genótipo EC-099 do INCAPER.

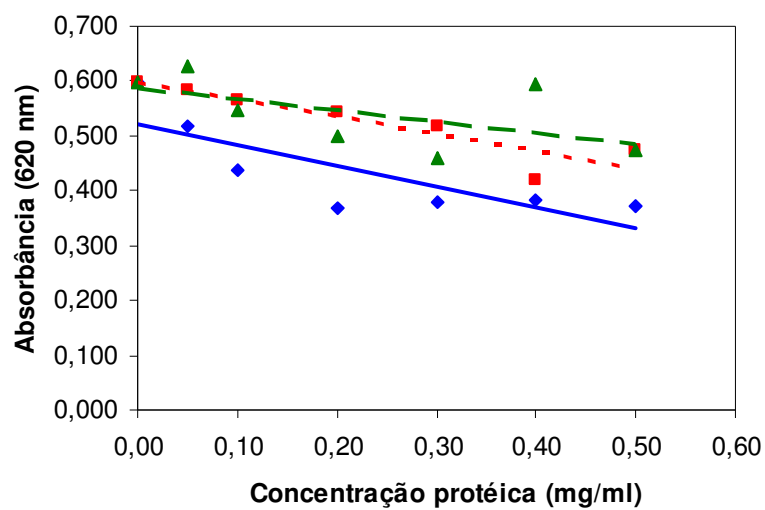


Figura 3 – Análise de regressão do crescimento de *Beauveria bassiana* sob diferentes concentrações de 3 frações proteicas (F1 —, F2 - - - - - , F3 — —) da folha de *Ananas comosus* genótipo EC-099 do INCAPER.

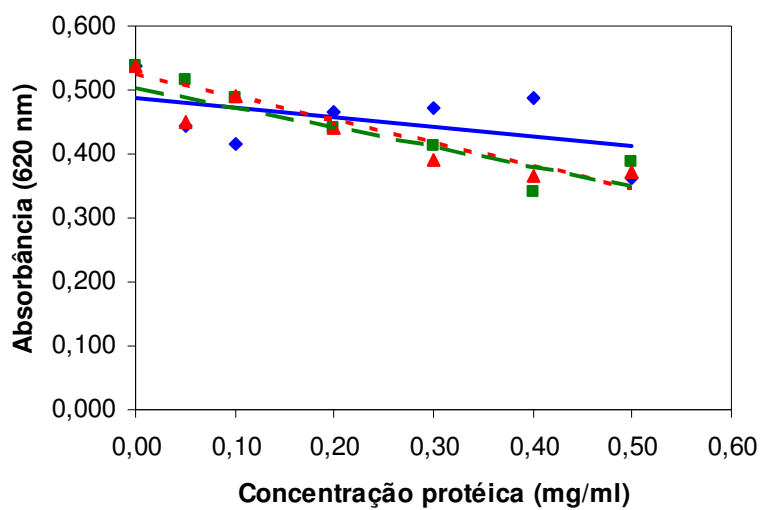


Figura 4 – Análise de regressão do crescimento de *Chalara paradoxa* sob diferentes concentrações de 3 frações protéicas(F1 —, F2 - - - - -, F3 - - - -) da folha de *Ananas comosus* genótipo EC-099 do INCAPER.

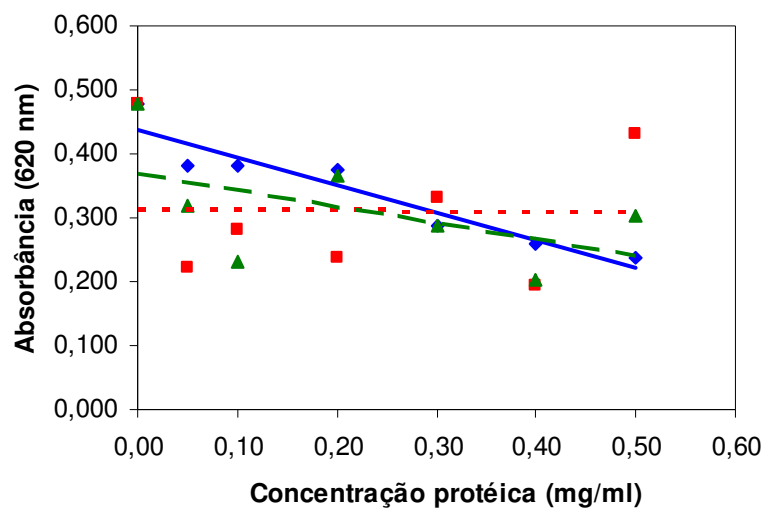


Figura 5 – Análise de regressão do crescimento de *Cladosporium* sp. sob diferentes concentrações de 3 frações protéicas (F1 —, F2 - - - - - , F3 -) da folha de *Ananas comosus* genótipo EC-099 do INCAPER.

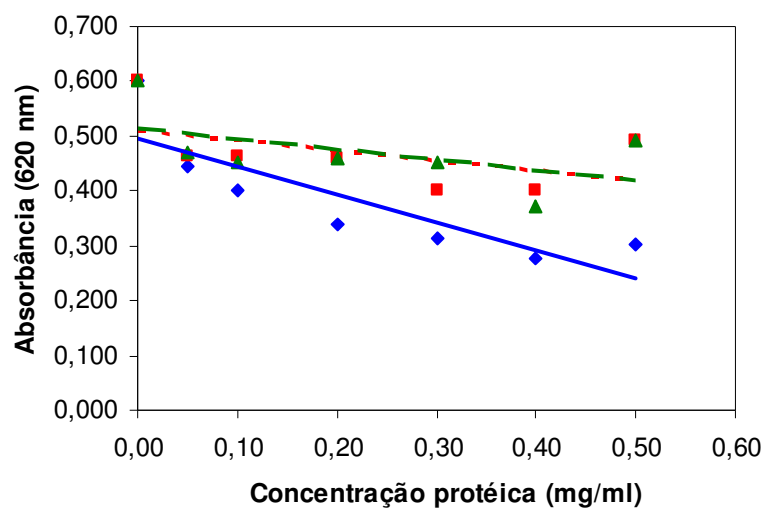


Figura 6 – Análise de regressão do crescimento de *Coletotrichum gloesporioides* sob diferentes concentrações de 3 frações protéicas (F1 —●—, F2 —■—, F3 —▲—) da folha de *Ananas comosus* genótipo EC-099 do INCAPER.

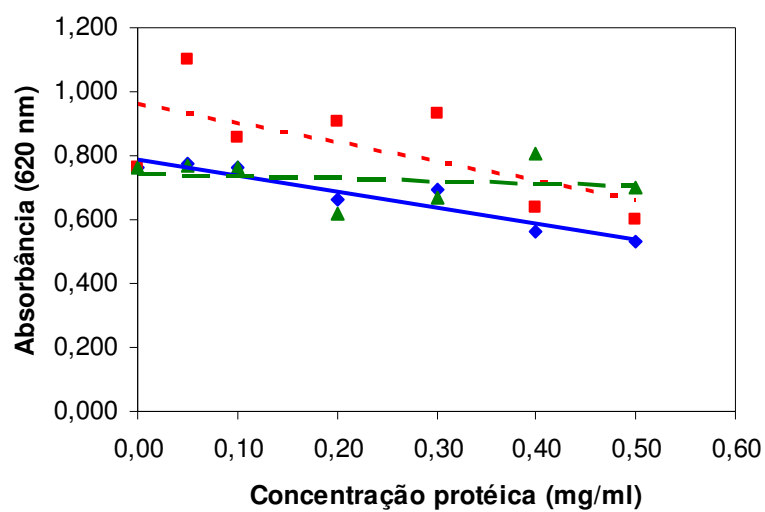


Figura 7 – Análise de regressão do crescimento de *Coletotrichum musae* sob diferentes concentrações de 3 frações protéicas (F1 —, F2 - - - - - , F3 — —) da folha de *Ananas comosus* genótipo EC-099 do INCAPER.

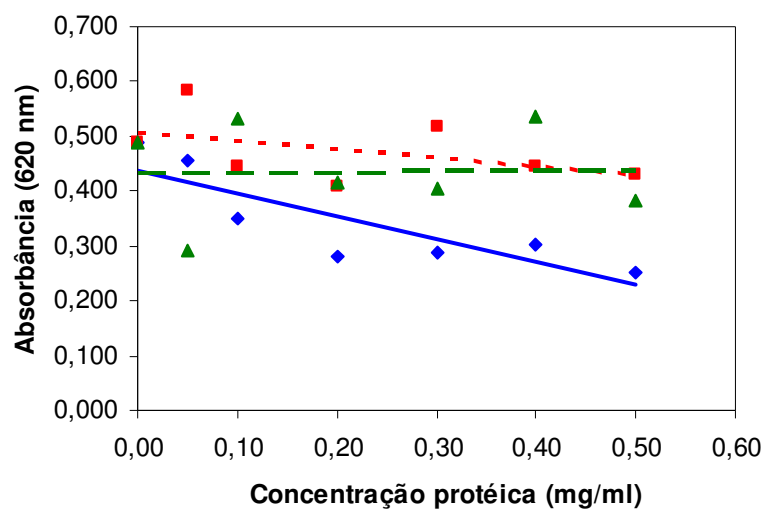


Figura 8 – Análise de regressão do crescimento de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* em diferentes concentrações de 3 frações protéicas (F1 —●—, F2 —■—, F3 —▲—) da folha de *Ananas comosus* genótipo EC-099 do INCAPER.

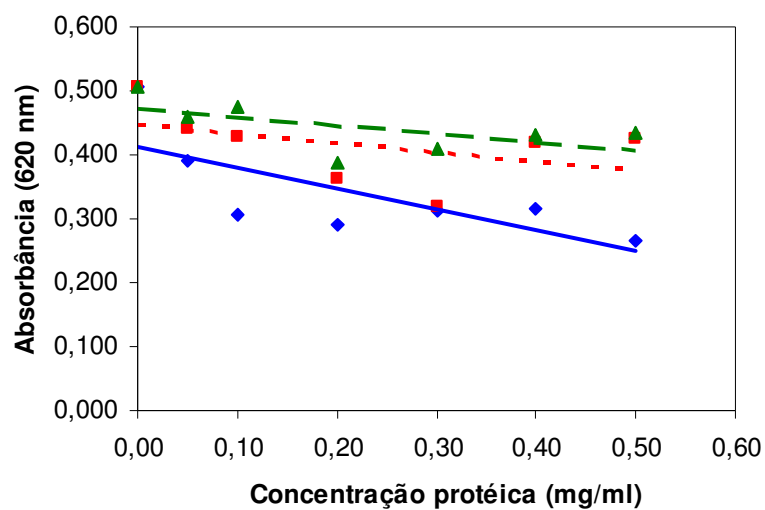


Figura 9 – Análise de regressão do crescimento de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* isolado E-261 sob diferentes concentrações de 3 frações protéicas (F1——, F2 - - - - -, F3 — —) da folha de *Ananas comosus* genótipo EC-099 do INCAPER.

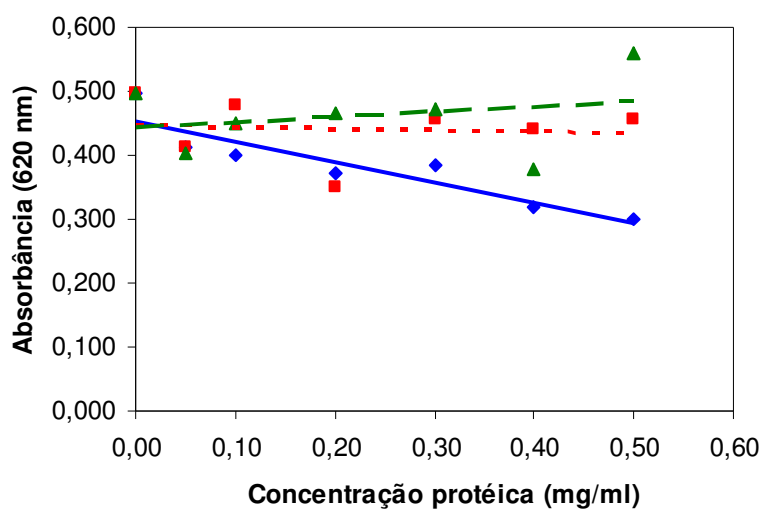


Figura 10 – Análise de regressão do crescimento de *Penicillium* sp. sob diferentes concentrações de 3 frações protéicas (F1 ———, F2 - - - - - , F3 — —) da folha de *Ananas comosus* genótipo EC-099 do INCAPER.

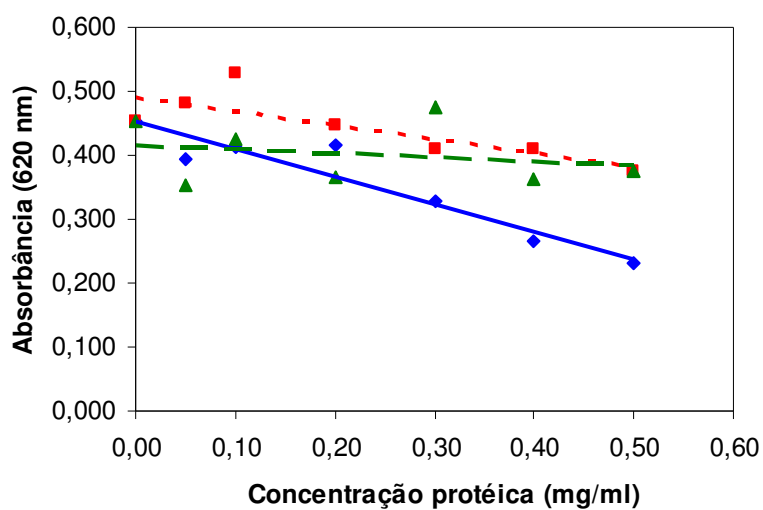


Figura 11 – Análise de regressão do crescimento de *Trichophyton rubrum* sob diferentes concentrações de 3 frações protéicas (F1 —, F2 - - - - - , F3 - - -) da folha de *Ananas comosus* genótipo EC-099 do INCAPER.

Deve-se, então, levar-se em conta que a linearidade decrescente dos valores das absorvâncias, de acordo com o aumento da concentração protéica, nem sempre é observada nos testes antifúngicos com defensinas de plantas. Muitas delas podem causar proliferação das hifas dos fungos, causando várias modificações nos seus filamentos (THOMA et al., 2002), podendo desta forma, promover um aumento na absorvância, proporcional à elevação da concentração protéica. Essas ramificações, por sua vez, podem secretar uma cascata de enzimas que degradam parede celular, capazes de aumentar a virulência do fungo e combater as defesas das plantas (DI PIERO et al., 2003).

Também há evidências da presença de proteínas de defesa nas F2 e F3, já que as mesmas apresentam uma forte inibição para alguns fungos, apesar de não apresentar um padrão linear igual ao da F1.

Quando comparada uma mesma fração em relação a inibição dos fungos *A. niger*, *B. bassiana*, *C. gloesporioides*, *C. musae*, *F. subglutinans* f. sp. *ananas*, *F. subglutinans* f. sp. *ananas* isolado E-261 e *T. rubrum*, observou-se que o comportamento deles eram semelhantes (Figuras 2, 3, 6, 7, 8 e 9). Mais ainda, a análise de regressão do crescimento desses fungos mostrou uma maior linearidade na inibição fúngica pela F1, apresentando os maiores valores do coeficiente de determinação linear (R^2) (Tabela 4), reforçando que as inibições obtidas pela F1, observadas na Tabela 2, estão diretamente proporcionais a sua concentração. Essa linearidade também foi observada por Almeida et al., (2000), quando submeteu o crescimento de *Aspergillus niger* a concentrações da defensina Psd 1.

Nas análises de regressão das F2 e F3, as alterações nos valores das absorvâncias, quando se aumenta a concentração protéica, não correspondem sempre à correlação linear, obtendo, então, valores inferiores para R^2 , exceto quando testado contra *B. bassiana*, a qual demonstrou o maior valor para a F2 (Tabela 4). No entanto, teve seu crescimento inibido mais fortemente na F1 (Tabela 2). Também foi observado que quando submetido às diferentes concentrações das F1 e F2, *B. bassiana*, teve comportamento muito semelhante em ambas (Figura 3).

Além das supostas proteínas de defesa e complexos protéicos presentes no extrato do abacaxi, *B. bassiana* pode estar sofrendo alterações morfológicas, provavelmente por ser patogênico a insetos e possuir uma forma de levedura, quando no hospedeiro e outra filamentosa (MCCOY et al., 1985; ALVES, 1998). Determinados fungos têm esta fase, com forma de levedura, quando cultivados nos meios líquidos artificiais, os quais podem ser semelhantes ao hemolinfa dos insetos (JACKSON, 1997). Essa característica morfológica em meio líquido nos faz suspeitar da possibilidade das proteínas presentes nas frações alterarem de alguma forma o padrão de crescimento do fungo, já que o mesmo, ao alternar sua fase de levedura e filamentosa pode comprometer a relação de crescimento com densidade ótica sob leitura em espectrofotômetro. Dados da literatura demonstram que a defensina RsAFP2 isolada de *Raphanus sativus*, em concentrações μM , inibi o crescimento da levedura *Candida albicans*, o qual interage com glucosilceramidas da membrana fúngica (THEVISSSEN et al., 1996, 1999).

5.4.1. Fungos Fitopatogênicos

Com intuito de compreender a resistência do genótipo de abacaxi EC-099, foram testadas as três frações contra cinco fungos fitopatogênicos. A utilização desses fungos deu-se por eles exercerem uma grande influência na evolução de seus hospedeiros, demonstrando uma grande diversidade no modo pela qual interagem.

A observação da capacidade de inibição destas três frações vem comprovar que os fungos fitopatogênicos, *Coletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* e *F. subglutinans* f. sp. *ananas* (E-261), apresentaram a F1 como a mais eficiente em inibir seus crescimentos, apresentando as melhores médias e diferindo das demais pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 3).

O fato das proteínas serem extraídas da parte clorofilada da folha do abacaxi pode estar levando a inibição do crescimento dos fungos *C. gloesporioides* e *C. musae*, conhecidos pela antracnose causada em frutos. Estes, quando infectam frutas verdes, freqüentemente não se desenvolvem, já que os frutos em estado clorofilado normalmente

possuem uma maior quantidade de compostos antifúngicos. Assim, o retardamento no crescimento pode representar um mecanismo para evitar níveis tóxicos de compostos antifúngicos das plantas (PRUSKY et al. 1991a; 1991b; 1993; 1995). Esta área foi estudada particularmente para as interações que envolvem o *C. gloeosporioides* e as frutas subtropicais, manga e abacate. Os níveis destes compostos diminuem durante amadurecimento da fruta e esta diminuição ocorre mais rapidamente nos cultivares suscetíveis, sugerindo que a presença destas substâncias antifúngicas na casca da fruta verde podem retardar o crescimento fúngico e causar sua latência (PRUSKY et al. 1991a). Desta forma é possível que a inibição fúngica, neste caso, esteja relacionada a proteínas presentes em partes clorofiladas da folha.

O fungo responsável pela fusariose do abacaxizeiro apresentou a maior inibição quando submetido às dosagens protéicas da F1, na forma selvagem e resistente ao benomil, além de apresentar o melhor valor de R^2 (Tabela 4), sendo a linearidade pouco representativa para F2 e F3 (Figura 8 e 9). Esse comportamento é de grande importância para trabalhos de melhoramento genético, já que, a variabilidade genética do *F. subglutinans* f. sp. *ananas* dificulta o desenvolvimento de atividades que visam variedades de *Ananas comosus* L. resistentes a Fusariose (SANTOS et al. 2002). Desta forma, o extrato protéico do genótipo EC-099 foi eficiente em inibir o crescimento das duas formas do patógeno.

O fungo *C. paradoxa*, responsável pela podridão do abacaxizeiro, não demonstrou diferenças entre as frações (Tabela 2, 3 e Apêndice A), além do baixo valor de R^2 para F1 (Tabela 4), provavelmente ocasionado pela suposta contaminação de um dos poços da concentração 0,4 mg /ml, já comentada acima. Contudo, este fungo foi inibido por todas as frações testadas em cerca de 30% (Tabela 2; Figura 3). Este resultado demonstra que o genótipo EC-099, desenvolvido com o principal objetivo de resistência a fusariose, também pode ser eficaz contra a podridão do abacaxizeiro.

Outros extratos processados de plantas também se mostraram eficazes contra *C. paradoxa*. A eficácia destes é listada em ordem decrescente: *Meriandra bengalensis*, *Mentha piperita*, *Curcuma longa*, *Phlogacanthus thyrsiflorus*, *Toona ciliata*, *Vitex negundo*, *Azadirachta indica*, *Eupatorium birmanicum*, *Ocimum sanctum* e *Leucas*

aspera. Os extratos de *Cassia tora*, *Gynura cusimba*, *Calotropis gigantea* e *Ocimum canum* mostraram-se fracas quanto a sua fungitoxicidade (DAMAYANTI et al. 1996).

O tratamento de frutas de abacaxi infestadas com o *C. paradoxa* com o extrato *Xanthium strumarium* reduziu a severidade da podridão negra do abacaxizeiro (DAMAYANTI et al. 1996). Este resultado no leva a acreditar que é possível utilizar as proteínas das três frações em pesquisas para o combate de fitopatógenos.

5.4.2. Fungos Antropofílicos e Oportunistas

Objetivando compreender a generalidade de inibição das frações protéicas do genótipo EC-099, procederam-se ensaios antifúngicos com fungos patogênicos e oportunistas.

Dentre estes fungos apenas *Cladosporium* sp. não demonstrou diferenças entre as frações, no entanto, foi inibido em cerca de 50% na F1 (Tabela 2). Mostrando ainda, que a linearidade da inibição foi melhor na F1, obtendo o melhor valor para R^2 (Tabela 4; Figura 4), o que comprova a melhor eficiência no retardamento do crescimento deste fungo, não sendo representativa as inibições ocorridas por F2 e F3, já que através da regressão linear foi possível observar que a correlação linear negativa não é representativa para as inibições destas duas frações (Tabela 4; Figura 4).

Resultados semelhantes aos apresentados na F1 (Figura 4) foram encontrados por Mackeen et al., (2000), que demonstrou que apenas órgãos clorofilados de *Garcinia atroviridis* eram capazes inibir várias bactérias e também *Cladosporium*.

O fungo *T. rubrum*, causador de infecções dermatológicas em humanos, também foi mais eficientemente inibido sob as concentrações da F1. Nesta, obteve os melhores valores de R^2 (Tabela 4). Por ser um fungo causador de pequenas inflamações, é possível que quando submetido às frações, o fungo tenha sido inibido pelo complexo proteolítico de enzimas, já reconhecida em *Ananas comosus*, já que a mesma é conhecida como agente antiinflamatório. No entanto não está claro como cada enzima do complexo proteolítico poderia influenciar neste processo. Sabe-se, contudo, do efeito

benéfico da bromelina, que são sugeridos e testados em uma variedade de doenças. Estes incluem as arterioscleroses imunologicamente mediado pelo rato (GACIONG et al. 1996), os modelos alérgicos experimental de encefalomielite (TARGONI et al., 1999), rinite alérgica perenial (THORNHILL et al., 2000) e a artrite em rato (ROVENSKA et al., 2001). Sendo que em alguns estudos, as bromelinas tiveram a eficácia similar às drogas antiinflamatórios padrões (HALE et al., 2005).

Os fungos oportunistas *A. niger* e *Penicillium* sp., conhecidos por inviabilizarem alimentos, são fungos muito pesquisados por suas capacidades de produzirem toxinas, muitas vezes prejudiciais ao homem, principalmente quando ingeridos, já que são muito comuns em sementes estocadas. Também sendo muito utilizados em testes antifúngicos, onde o objetivo principal objetivo é a descoberta de compostos com atividade inibitória ou tóxica contra fungos. (DEKKER & RICHARDS, 1975).

A. niger e *Penicillium* sp foram mais eficientemente inibidos nas concentrações da F1. Esta, além de possibilitar um maior linearidade, diretamente proporcional ao aumento da concentração, também apresentou um maior valor de R^2 (Figura 1 e 9; Tabela 4), semelhantemente a Almeida et al. (2000) e Lay et al., (2003), que observaram a inibições significativas de até 50% do crescimento de *Aspergillus niger* e uma de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, em concentrações de $\mu\text{g/ml}$. Além de García et al., 2002, que selecionou 12 peptídeos, dos quais 3 (PAF26, PAF32 e PAF34) mostraram grande atividade antifúngica contra duas espécies de *Penicillium*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As inibições alcançadas pelas concentrações da F1 comprovam a existência de proteínas de defesa com características generalistas, sendo eficazes no retardamento do crescimento de todos os fungos testados. Já as F2 e F3 apesar de demonstrarem maior especificidade contra alguns fungos, suas inibições sempre se apresentaram inferiores as da F1.

Os resultados obtidos com *Fusarium subgutinans* f sp. *ananas* e seu isolado resistente ao Benomyl (E-261), evidenciou que o grupo das proteínas na F1 foram eficientes para inibir o crescimento fúngico dos dois isolados. No entanto, esta maior eficiência da F1 não foi estatisticamente comprovada nos ensaios com *C. paradoxa*, fungo fitopatogênico do abacaxizeiro, todavia este foi inibido em cerca de 30% em todas as 3 frações testadas.

A resistência do abacaxizeiro a fusariose no genótipo EC-099 pode estar relacionada a mais de uma proteína de defesa, já que foi possível observar inibições significativas do fungo nas três frações testadas.

Observa-se ainda, a possível existência de proteínas antimicrobianas nas F2 e F3, que inibiram o crescimento de três fungos testados: *A. niger*, *C. paradoxa* e *Cladosporium*.

Em relação aos fungos fitopatogênicos *C. musae* e *C. gloesporioides*, é possível que compostos antifúngicos presentes nas partes clorofiladas das folhas do abacaxi sejam responsáveis por um estado de latência, semelhantemente ao observado em frutos verdes (PRUSKY et al. 1991).

Outro fator importante para a compreensão da atuação destas proteínas é a inibição restrita a F1, em valores acima de 20%, em algumas espécies. Existem relatos na literatura que a coevolução entre fungos e plantas pode fazer com que o hospedeiro desenvolva complexos de defesa restritos (BARBIERI & CARVALHO, 2001). Este fato explica uma maior atuação das proteínas restritas as F2 e F3 contra *C. paradoxa*.

A presença de proteínas com capacidade antifúngica no genótipo EC-099 foi confirmada, no entanto para o melhor entendimento e conseqüentemente um melhor uso para o melhoramento genético, faz-se necessário a purificação destas proteínas e o seu estudo em relação a patogênese.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIZZIO, A. P.; CARVALHO, A. O.; RIBEIRO, S. F. F.; MACHADO, O. L. T.; ALVES, E. W.; OKOROKOV, L. A., SAMARÃO, S. S.; BLOCH, C. Jr.; PRATES, M. V.; GOMES, V. M. A. 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 416, p. 188-195, 2003.

ALMEIDA, M.; CABRAL, K.; KURTENBACK, E. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 378, p. 278-286, 2000.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. FEALQ, Piracicaba, 1998.

BAKER, B., ZAMBRYSKI, P.; STASKAWI, C. Z. B.; DINESH-KUMAR, S. P., Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, Washington, v. 267, p. 726–733, 1997

BARBIERI, R.; CARVALHO, F. I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Rev. Bras. de Agrociência**, Pelotas, v. 7 n.2, p. 79-83, 2001.

BARRETT A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, Academic Press, San Diego, pp. 566–567, 1998.

BART, P. H. J.; THOMMA, H.; VAN ESSE, P.; CROUS, P. W.; PIERRE J. G. M. Pathogen profile *Cladosporium fulvum* (syn.*Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plantpathogenicity cosphaerellaceae. **Mycol. Progr.**, Berlin, v. 2, p.3-18, 2003.

BLISS, D. E. A new species of *Ceratostomella* on the date palm. **Mycologia**, v. 33, p. 468-482, 1941.

BOTELLA, J. R.; CAVALLARO, A. S.; CAZZONELLI, C. I. Towards the production of transgenic pineapple to control flowering and ripening. **Proc. III Int'l. Pineapple Symp. Acta Hort.**, Australia, v. 529, p. 115-121, 2000.

BRAUN, U.; CROUS, P. W.; DUGAN, F.; GROENEWALD, J. Z.; HOOG, G. S., Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. **Mycological Progress**, Berlin, v. 2, p. 3-18, (2003).

BROEKAERT, W. F., TERRAS, F. R., CAMMUE, B. P., OSBORN, R. W. Plant defensins: Novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. **Plant Physiol.**, v. 108, p. 1353-1358, 1995.

CABRAL, J. R. S. Melhoramento genético. In: CUNHA, A. P.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S (Orgs.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 83-103, 1999..

CABRAL, J. R. S; SOUZA, J. S.; FERREIRA, F. R. **Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi**. Disponível: site: <http://www.cpatsa.embrapa.br/livrorg/abacaxi.doc>. Consultado em 23 de out. 2002.

CHIANG, C. C.; HADWIGER, L. A. The *Fusarium solani*-induced expression of a pea gene family encoding high cysteine content proteins. **Mol. Plant-Microb. Interac.**, v. 4, p. 324-331, 1991.

COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. Arnold, London, Sydney, Auckland, New York, 9a ed, vol. 4, 1998.

COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinases, **Plant J.**, v. 3, p. 31-40, 1993.

COLLINS, J. L. The Pineapple: Botany Cultivation and Utilization,. **Interscience Publishers**, New York. 1960.

DAMAYANTI, M.; SUSHEELA, K.; SHARMA, G. J. Effect of plant extracts and systemic fungicide on the pineapple fruit-rotting fungus, *Ceratocystis paradoxa*. **Cytobios**, Cambridge, v.346, n. 86, p. 155-65, 1996.

DE HOOG, G. S., QUEIROZ-TELLES, F.; HAASE, G.; FERNANDEZ-ZEPPENFELDT, G.; ANGELIS, D. A.; VAN DEN ENDE, A.; MATOS, T.; et al., Black fungi: clinical and pathogenic approaches. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 38, p. 243-250, 2000.

DEKKER, R. F. H.; RICHARDS; G. N. Purification properties and mode of action of hemicellulase II produced by *Ceratocystis paradoxa*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam. v. 42, p. 102-123, 1975.

DI PIERO, A.; MADRID, P. M.; CARACUEL, Z.; JARANA, J. D.; RONCERO, M. I. G., *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 5, p. 315-325, 2003.

DIXON, D. M.; POLAK-WYSS, A. The medically important dematiaceous fungi and their identification. **Mycoses**, Berlin, v. 34, p. 1-18, 1991.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2000. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Abacaxi/CultivodoAbacaxiRO/index.htm>. Acesso em: 20 de set. 2004

FEYS, B. J.; PARKER, J. E., Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends in Genet.**, Amsterdam, v. 16, p. 449–55, 2000

GACIONG, Z.; PACZEK, L.; BOJAKOWSKI, K.; SOCHA, K., WISNIEWSKI, M.; EIDLAND A.; Beneficial effect of proteases on allograft arteriosclerosis in a rat aortic model, *Nephrol.*, **Dial. Transplant**, Sherman Oaks, Calif., v. 11, p. 987–989, 1996.

GALIMBERTI, R., KOWALCZUK, PARRA, H., RAMOS G.; FLORES V., Cutaneous aspergillosis: a report of six cases. **British Journal of Dermatology**, Oxford, v. 139 , p. 522-526, 1998.

GAO, A. G., HAKIMI, S. M., MITTANCK, C. A., WU, Y., WOERNER, B. M., STARK, D. M., SHAH, D. M., LIANG, J., ROMMENS, C. M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. **Nat. Biotech.**, v. 18, p. 1307-1310, 2000.

GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J. M.; PALENZUELA, P. R. Plant defense peptides. **Biopolymers**, v. 47, p. 479-491, 1998.

GARCIA-OLMEDO, F.; PALENZUELA, P. R.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J.M.; LOPEZ-SOLANILLA, E., BERROCAL-LOBO; M., POZA-CARRION; C. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxy-nitrite in plant defence. **FEBS Lett.**, v. 498, p. 219-222, 2001.

GEYID, A.; ABEBE, D.; DEBELLA, MAKONNEN, A.; ABERRA, F.; TEKA, F.; KEBEDE T.; URGA, K.; et al. Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their antimicrobial. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n° 5, p. 2453-2460, 2005.

GRAHAN, L. S., STICKERLEN, M. B. Plant chitinases, **Can. J. Bot.**, v. 72, 1057-1083, 1994.

GREEN, T. R.; RYAN, C. A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. **Science**, Washington, v. 175, p. 776-777, 1972.

GU, Q., KAWATA, E. E., MORSE, M.J., WU, H. M., CHEUNG, A. Y. A flower-specific cDNA encoding a novel thionin in tobacco. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 234, p. 89-96, 1992.

HALE, L. P.; GREER, P. K.; CHAU, T. T.; GOTTFRIED, M. R. Treatment with oral bromelain decreases colonic inflammation in the IL-10-deficient murine model of inflammatory bowel disease. **Clin. Immunol.**, Orlando, v.106, p. 135-142, 2005.

INCAPER – Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural; disponível em: <<http://www.incaper.es.gov.br/fruticultura/fruticultura.htm>> acesso em 17 de junho de 2005.

JACKSON, M. A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, Houndmills, Basingstoke, Hampshire, v. 19 p. 180–187, 1997.

JONES, J. B.; JONES, J. P.; STALL, R. E.; ZITTER, T. A. **Compendium of Tomato Diseases**, St. Paul, MN: APS Press, 1997

JUNQUEIRA, N. T. V. Manejo integrado de doenças do maracujazeiro, da mangueira, da goiabeira e das anonáceas. In: Zambolim, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais – doenças e pragas**. Viçosa, MG. p. 239-277, 2002.

KILE, G. A. **Plant diseases caused by species of *Ceratocystis sensu stricto* and *Chalara***. In ***Ceratocystis and Ophiostoma: Taxonomy, Ecology and Pathogenicity*** (ed. M. J. Wing, K. A. Seifert & J. F. Webber), St Paul p. 173-183, 1993. ,

LANDON, C.; SODANO, P.; HETRU, C.; HOFFMANN, J.; PTAK, M. Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. **Protein Sci.**, New York, v. 6, p. 1878-1887, 1997.

LARONE, D. H. **Medically Important Fungi - A Guide to Identification**. Washington, D.C. ed.3, ASM Press, 1995.

LEHRER, R. I.; DAHER, K.; GANZ, T.; SELSTED, M. E., Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. **J. Virol.**, Baltimore, v.54, p. 467–472, 1985.

LAY, F. T.; BRUGLIOLA, F.; ANDERSON; ANDERSON, A. Isolation and properties of floral defensin from ornamental tobacco and petunia. **Plant Physiology**, Oxford, v. 131, p. 1283-1293, 2003.

LIBERATO, J.R. **Controle das doenças causadas por fungos, bactérias e nematóides em maracujazeiro**. In: Zambolim, L.; Vale, F.X.R. do; Monteiro, A.J.A.; Costa, H. (Eds.) **Controle de doenças de plantas: Fruteiras**. Viçosa, MG. p. 699-825. 2002.

LINDE, C.; SMITH, W. A., First report of rhizosis caused by *Ceratocystis radicicola* on date palms in South Africa. **Plant Disease**, St. Paul, v. 83, p. 880, 1999.

LOO, V. G.; BERTRAND, C.; DIXON C.; VITYE, D.; DESALID, B.; MCLEAN, A. P. H.; BRONX A.; ROBSON, H. G. Control of construction-associated nosocomial aspergillosis in an antiquated hematology unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, Chicago, v. 17, p. 360-364, 1996.

MACKEEN, M.M.; ALI, A.M.; LAJIS, N.H.; KAWAZU K.; HASSAN, Z.; AMRAN, M.; HABSAH, M.; MOOI, L.Y.; MOHAMED, S.M. Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 395–402, 2000.

MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D. E. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 147, 1999.

MATTA, E. A. F. **Doenças do maracujazeiro no estado da Bahia**. Salvador: EPABA. Circular Técnica 2. 1982.

MCCOY, C. W.; SAMSON, R. A.; BOUCIAS, D. G. Entomogenous fungi. In: Ignoffo. **Handbook of Natural pesticides**. Ed. C.M., 1985 Microbial Insecticides, Part A.CRC Press, Boca Raton: vol. 5, pp. 151–243.

MENDEZ, E.; MORENO, A.; COLILLA, F.; PELAEZ, F.; LIMAS, G.G.; MENDEZ, R.; SORIANO, F.; SALINAS, M.; DE HARO, C. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 194, P. 533-539, 1990.

MORAES, A. M. L.; BORBA, C. M.; COSTA, G. L.; RODRIGUES, K.; SARQUIS, M. I. M., Fungos: Ferramentas na saúde pública, **Biotecnologia**, São Paulo, ano 2, n. 7, 1999.

MONTINOLA, L. R. **Pina**. Amon Foundation, Manila, Filipinas. 1991

MORI, T.; MATSUMURA, M.; YAMADA, K.; IRIE, S.; OSHIMI, K.; SUDA, K.; OGURI, T.; ICHINOE, M. Systemic aspergillosis caused by an aflatoxin-producing strain of *Aspergillus flavus*. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 36, p. 107-112, 1998.

MORTON, J. Grapefruit - *Citrus paradisi*. In: MORTON, J.F. **Fruits of warm climates**. Miami: Agscience, p. 152-158, 1987.

NAPPER, A. D.; BENNETT, S. P.; BOROWSKI, M.; HOLDRIDGE, M. B.; LEONARD, M. J. C.; ROGERS, E. E. Purification and characterization of multiple forms of the pineapple-stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain. **Biochem. J.**, London, v. 301, p. 727– 35, 1994.

NEUHAUS, J. M.; Plant chinasases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In “Pthogenesis – Related Protein in Plant”, ed. Datta, S. K., and Muthukrishnan, S., CRC Press, Boca Raton, p. 77-105, 1999.

OGTR – Office Gene Technology Regulator. **The Biology & Ecology of Pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*) in Australia**. Sydney, 2003.

PERVIEUX I.; BOURASSA, M.; LAURANS, F.; HAMELIN, R.; SÉGUIN, A. A spruce defensin showing strong antifungal activity and increased transcript accumulation after wounding and jasmonate treatments. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, p. 1-11, 2004.

PISSARRA, T. B.; CHAVES, G. M.; VENTURA, J. A. Sintomatologia da fusariose (*Fusarium moniliforme* Scheld.var. *subglutinans* Wr. & Rq.) do abacaxizeiro, **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 4, p. 225-263, 1979.

PINHEIRO, M. M.; SANDRONI, M.; LUMMERZHEIM, M.; OLIVEIRA, D. E., A defesa das plantas contra as doenças, **Ciência hoje**, São Paulo, v. 147, 1999.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important? **Med. Mycol.**, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000.

PRITCHARD, R. C.; MUIR, D. B. Black fungi: a survey of dematiaceous hyphomycetes from clinical specimens identified over a five year period in a reference laboratory. **Pathology**, Sydney, v. 19, p. 281-4 1987.

PRUSKY, D.; KOBILER I.; FISHMAN Y.; SIMS J. J.; MIDLAND S. L.; KEEN N. T. Identification of an antifungal compound in unripe avocado fruits and its possible involvement in the quiescent infections of *Colletotrichum gloeosporioides*. **J. Phytopathology**, St. Paul, v. 132, p. 319–327, 1991a.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY R. A.; KOBILER I. The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 40, p. 45–52, 1991b.

PRUSKY, D.; KEEN, N. T. Involvement of preformed antifungal compounds in the resistance of subtropical fruits to fungal decay. **Plant Disease**, St. Paul, v. 77, p. 114–119, 1993.

PRUSKY, D.; KEEN, N. T. **Inducible preformed compounds and their involvement in the resistance of plants to pathogens. Novel approaches to integrated pest management.** Lewis publishers, Boca Raton, Fla., p. 139–151, 1995.

RAVEN, P. H; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 5 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan: 1994.

REINHARDT, D. H. R. C. Propagação do abacaxi. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.11, n.130, p.18-21, 1985.

ROVENSKA, E.; SVIK, K.; STANCIKOVA, M.; ROVENSKY, J., Inhibitory effect of enzyme therapy and combination therapy with cyclosporin A on collagen-induced arthritis, **Clin. Exp. Rheumatol.**, Pisa, Italia, v. 19, p. 303–309, 2001.

ROWAN, A. D.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. The cysteine proteinases of the pineapple plant. **Biochem. J.**, Londres, v. 266, p. 869–75. 1990

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **An. Rev. Phytopathol.**, Palo Alto, v. 28, p. 425-449, 1990.

RYAN, C. A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1477, p. 112-121, 2000.

SANTOS, B.A. Resistência do Abacaxizeiro a Fusariose: Análise Molecular do Patógeno e do Hospedeiro. (Tese de Doutorado).Viçosa. Minas Gerais. 2000.

SANTOS, B. A.; ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; VALE, F. X. R., Severidade de isolados de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* sensíveis e resistentes ao Benomyl em abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 101-103, 2002.

SHAW, K. E.; DAVIDSON, G.; CLARK, S. J.; BALL, B. V.; PELL, J. K.; CHANDLER, D.; SUNDERLAND, K. D. Laboratory bioassays to assess the pathogenicity of mitosporic fungi to *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), an ectoparasite mite of the honeybee, *Apis mellifera*. **Biol. Control**, San Diego, v. 24, p. 266–276, 2002.

SHINSHI, H.; USAMI, S.; OHME-TAKAGI, M., Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a tobacco class I chitinase in rice. **Mol. Cell**, v. 17, 144-150, 2004.

SILVA JR., J. G., **Cromatografia de Proteínas: guia teórico e prático**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004.

SQUEO, R. F.; BEER R.; SILVERS D.; WEITZMAN I.; GROSSMAN M. Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host. **J Am Acad Dermatol.**, St. Louis, V. 39, p. 379-80, 1998.

ST-GERMAIN, G.; SUMMERBELL R.. **Identifying Filamentous Fungi - A Clinical Laboratory Handbook**. 1st ed. Star Publishing Company, Belmont, California, 1996.

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B.J.; ELLIS, J.G.; JONES, J.D.G., Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, Washington, v. 68, p. 661–7, 1995.

SULEMAN, P.; AL-MUSALLAM, A.; MENEZES, C. A. Incidence and severity of black scorch on date palms in Kuwait. **Kuwait Journal of Science and Engineering**, v. 28, p.161-170. 2001a.

SULEMAN, P.; AL-MUSALLAM, A., MENEZES, C. A. The effect of solute potential and water stress on black scorch caused by *Chalara paradoxa* and *Chalara radiciola* on date palms. **Plant Disease**, St. Paul, v. 85, p. 80-83, 2001b.

SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W; RINALDI, M. G. **Guide to Clinically Significant Fungi**, 1a ed. Williams & Wilkins, Baltimore 1998.

TAIRA, T.; TOMA, N.; ICHI, M.; TAKEUCHI, M.; ISHIHARA, M. Tissue distribution, Synthesis Stage, and Ethylene Induction of Pineapple (*Ananas comosus*) Chitinases. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, Tokio, v. 64, n. 4, p. 852-854, 2005.

TEIXEIRA, C. G. Cultura. In: **Instituto de Alimentos. Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**, Campinas: 1995, 2^a ed, p. 1-42.

TERRAS, F. R.; SCHOOF, H. M.; DE BOLLE, M. F.; VAN LEUVEN, F.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, n. 267, p. 15301–9, 1992.

THEVISSSEN, K.; GHAZI, A.; DE SAMBLANX, G. W.; BROWNLEE, C.; OSBORN, R. W.; BROEKAERT, W. F. Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. **J. Biol.Chem.**, Baltimore, n. 271 p. 15018–25, 1996.

THEVISSSEN, K.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K.; TERRAS, F. R.; BROEKAERT, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. n. 65, p. 5451–8, 1999.

TARGONI, O. S.; TARY-LEHMANN, M.; LEHMANN, P. V., Prevention of murine EAE by oral hydrolytic enzyme treatment, **J. Autoimmun.**, London, San diego, v. 12, p. 191–198, 1999.

THOMMA B. P. H. J.; CAMMUE B. P. A.; THEVISSSEN K.; Plant defensins. **Planta**, Berlin, New York, v. 216, p. 193–202, 2002.

THOMMA, B. P. H. J.; PENNINGCKX, I.A.; BROEKAERT, W.F.; CAMMUE, B.P. The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, p. 63-68, 2001.

THORNHILL, S. M.; KELLY, A. M. Natural treatment of perennial allergic rhinitis, **Altern. Med. Rev.**, Sandpoint, Idaho, v. 5, p. 448– 454, 2000.

VENTURA, J. A., ZAMBOLIM, L.; GILBERTSON, R.L. Proposição de nova forma specialis em *Fusarium subglutinans* no abacaxizeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, p. 280, 1993.

VENTURA, J.A., COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Resistência de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* ao benomyl em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 328, 1994.

VITALIS, W. W.; MANIANIA, N. K.; KNAPP, M.; BOGA, H. I., Pathogenicity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to the tobacco spider mite *Tetranychus evansi*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam ; New York, v. 36, p. 41-50, 2005.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL R. C. The dermatophytes. **Clin. Microbiol. Rev.** Washington, p. 240-59, 1995.

APENDICE A – Quadro da Análise de Variância

Apêndice A - Análise de Variância de um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) num esquema fatorial 3x7

F.V	G.L	QM ^{1/}									
		ASP	BEA	CHA	CLA	FUSR	FUSS	GLO	MUS	PEN	TRI
Fração	2	0.1291**	0.068**	0.0019 ^{NS}	0.0069 ^{NS}	0.0582**	0.0916**	0.0535**	0.1197**	0.0346**	0.0389**
Conc.	6	0.0918**	0.035**	0.0256**	0,0541**	0.0284**	0.0198**	0.0559**	0.0674**	0.0133*	0.0215**
CxF	12	0.0107 ^{NS}	0.0069**	0.0055**	0.0137 ^{NS}	0.0039 ^{NS}	0.0204**	0.0465 ^{NS}	0.0331**	0.0083 ^{NS}	0.0073 ^{NS}
Resíduo	42	0.0082	0.0017	0.0017	0.0090	0.0057	0.0006	0.0026	0.0073	0.0044	0.0043
C.V.		19.946	10.165	9.392	29.505	18.931	6.048	11.698	11.504	15.547	16.424

F.V – Fator de variação; G.L – Grau de liberdade; C.V. – Coeficiente de variação; QM1/ - Quadrado médio; Conc – Concentração; CxF – Concentração x Fração; ASP – *Aspergillus niger*; BEA – *Beauveria bassiana*; CHA – *Chalara paradoxa*; CLA – *Cladosporium* sp.; FUSR – *Fusarium subglutinans* f sp. ananas isolado E-261; FUSS – *F. subglutinans* f sp. ananas susceptível ao Benomyl; GLO – *Colletotrichum gloesporioides*; MUS – *C. musae*; PEN – *Penicillium* sp.; TRI – *Trichophyton rubrum*; NS – Não significativo pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade; ** - Significativo pelo teste F, em nível de 1% de probabilidade; * - Significativo pelo teste F, em nível de 5% de probabilidade.

