UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Concentração - Bromatologia

**A influência da biodiversidade no entorno do cultivo sobre a expressão de
proteínas de bananas produzidas no Vale do Ribeira**

Versão corrigida da tese, conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Florence Polegato Castelan

Tese apresentada ao Departamento de
Alimentos e Nutrição da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Doutor

Orientadora:

Profa. Titular Beatriz Rosana Cordenunsi

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Castelan, Florence Polegato
C348i A influência da biodiversidade no entorno do cultivo sobre
a expressão de proteínas de bananas produzidas no Vale do
Ribeira / Florence Polegato Castelan. -- São Paulo, 2015.
106p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador : Cordenunsi, Beatriz Rosana

1. Banana : Bioquímica dos alimentos 2. Biodiversidade
3. Fisiologia vegetal I. T. II. Cordenunsi, Beatriz Rosana,
orientador.

641.3477

CDD

Florence Polegato Castelan

A influência da biodiversidade no entorno do cultivo sobre a expressão de
proteínas de bananas produzidas no Vale do Ribeira

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Tit. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi
Orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo

2015

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento do presente estudo só foi possível graças ao eficiente trabalho de uma equipe, suportada por um laboratório que dispõe de competentes profissionais e com a assistência de pesquisadores de diferentes instituições. A tentativa de descrever aqui todos aqueles relevantes para o desenvolvimento do trabalho seria certamente fracassada.

No entanto, caberia ressaltar alguns protagonistas desta jornada. A professora Beatriz Cordenunsi deve ser a primeira a ser mencionada, pois ela foi quem semeou e cultivou a idéia deste trabalho e quem teve a perspicácia e a ousadia necessária para o desenvolvimento do projeto. Um agradecimento especial também deve ser feito ao Lorenzo Saraiva, por ter me dado todo o suporte que poderia precisar, além dos conselhos de um atencioso pesquisador sempre à mão. À minha mãe, minhas tias e irmãs, agradeço por sempre poder contar com elas, além do incentivo em seguir minhas escolhas.

Aos integrantes da equipe: Talita Pimenta, Lorenzo Saraiva, Victor Castro-Alves, Maria Fernanda Calháu e a professora Beatriz Cordenunsi, meus sinceros agradecimentos por partilhar desta empreitada, cujo aprendizado está sendo de grande valia. Aos professores João Roberto Nascimento, João Paulo Fabi, Neuza Hassimoto e Eduardo Purgatto pelas inúmeras ocasiões em que dispuseram a mergulhar nas minhas dúvidas infundáveis. A disponibilidade e atenção da Lúcia Justinos, Márcia Ribeiro, Tânia Shiga e Elias Araújo, também foi fundamental para a evolução do trabalho, um agradecimento especial a todos. Aos amigos e colegas do laboratório, que não só tornaram o ambiente de trabalho muito mais divertido, como sempre estiveram dispostos a compartilhar suas experiências. Aos amigos e colegas do Guapiruvu: Chico, Ceni, Sérgio e Gilberto, sempre dispostos a nos ajudar.

Um genuíno agradecimento a todos os outros pesquisadores e profissionais que contribuíram para a montagem do desenho experimental, em especial, os professores Miguel Altieri, José Ozinaldo Sena, Carlos Tadeu dos Santos Dias e Paulo Kageyama, fundamentais nesse processo. Além do prof. Hasime Tokeshi, que não só participou de todas as etapas do trabalho, como me guiou e inspirou cientificamente desde o início da minha graduação. E a todos os outros que me cederam tempo e disposição para me ajudar. Estes não foram poucos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização do curso de doutorado. Ao CNPQ pelo financiamento da minha bolsa. Aos diferentes colegas da FCF, sempre muito dispostos a resolver todas as questões administrativas relacionadas ao andamento do trabalho e à minha formação profissional, especialmente aos da secretaria, Mônica, Edílson, Cléo e Roberta, do setor de Compras, Vanessa e Alan, e do serviço de graduação, Miriam e Irineu, sou grata pela disposição de sempre.

RESUMO

CASTELAN, F. P. **A influência da biodiversidade no entorno do cultivo sobre a expressão de proteínas de bananas produzidas no Vale do Ribeira**. 106p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

As interações entre as plantas cultivadas e os outros organismos do agroecossistema podem afetar as características dos alimentos, trazendo implicações que abrangem desde as condições socioeconômicas dos produtores até a qualidade nutricional e sensorial dos produtos agrícolas. No caso de agroecossistemas equilibrados, a conservação da biodiversidade na propriedade contribui para diminuir a dependência de insumos externos, principalmente para o controle de pragas e doenças. Nesse sentido a produção de bananas no Vale do Ribeira constitui um mosaico de agroecossistemas, que pressionam os maiores e mais conservados remanescentes florestais de Mata Atlântica. A banana é um fruto climatérico típico, que mostrou grande potencial para o presente estudo, primeiro por ter boa parte de seus processos bioquímicos parcialmente elucidados, segundo, por apresentar seu genoma sequenciado e, terceiro, por ser um cultivo que permeia as áreas de Mata Atlântica do Vale do Ribeira. A perspectiva de análise do Proteoma *label-free* do fruto foi escolhida por sua ampla capacidade de compreensão de respostas biológicas, especialmente em delineamentos experimentais inéditos como esse, onde não é possível fazer grandes especulações acerca da resposta esperada. Dessa forma, inserido a um projeto de objetivo mais amplo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da biodiversidade atlântica no entorno do agroecossistema sobre a expressão de proteínas das bananas, considerando os aspectos físico-químicos, fisiológicos e bioquímicos, de modo a estimar as vias metabólicas influenciadas por esta condição ambiental. O projeto foi desenvolvido a partir da comparação de duas áreas comerciais de bananicultura que possuem idade e tratos culturais idênticos, sendo que a única diferença é que uma delas encontra-se cercada exclusivamente pelo monocultivo de bananeiras (parcela Controle) e a outra possui 60% do perímetro adjacente a um fragmento de Mata Atlântica (parcela Biodiversidade). Foi utilizada uma estratégia holística, contemplando diversos fatores do ambiente (fertilidade do solo e aspectos climáticos), da fisiologia da bananeira (diagnose foliar e infestação por doenças) e da banana (aspectos de qualidade, comportamento pós-colheita e proteoma da polpa). Os resultados mostram que as plantas da parcela biodiversidade apresentaram menor Índice de Severidade de Sigatoka Negra e produziram frutos com maior vida verde. Em relação ao Proteoma, as vias do Ciclo do ácido cítrico, do Metabolismo do piruvato e da Alanina, aspartato e glutamato foram as mais alteradas entre os frutos das duas parcelas, sinalizando uma maior tendência na síntese de ácidos graxos nos frutos da parcela Biodiversidade, que parece ter sido desviada para a síntese de aminoácidos nos frutos da parcela Controle. Algumas evidências reunidas sugerem que a presença da biodiversidade da Mata Atlântica no entorno do agroecossistema favorece o restabelecimento da homeostase vegetal, trazendo efeitos benéficos para o cultivo e para o fruto.

Palavras-chave: Banana, Biodiversidade, Fisiologia Vegetal, Proteoma.

ABSTRACT

CASTELAN, F. P. **Influence of biodiversity surrounding the banana crop on protein expression of banana fruits produced on Vale do Ribeira, Brazil.** 106p. Thesis (Food Science Ph.D.) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2014.

Food quality is affected by crop and other agroecosystem organism interaction. These are a broad and diverse field of study, with unclear central issues, implying since socioeconomic condition of the producer, up to food quality, in terms of nutritional and sensorial issues. In this sense, banana production on Vale do Ribeira represents an agroecosystem mosaic, among the hugest and most conserved remaining Atlantic forest. Banana is a climacteric fruit with great potential for this study, firstly because its biochemical processes has been partially clarified, secondly, because its genome is already sequenced and, finally, because its cultivation area is surrounded by Atlantic forest areas from Vale do Ribeira. Proteomic *label-free* has been chosen, because of its great capability to understand biological response, especially in unprecedented experimental approaches, in which expectations cannot be done. Thereby, inserted on a broader project, the aim of this work was to evaluate the influence of Atlantic forest biodiversity surrounding the agroecosystem on protein expression of banana fruit, considering physic-chemical, physiological and biochemical aspects, in order to highlight metabolic pathways influenced by this environmental condition. The development of this project is based on the comparison of two banana commercial plots, with similar age and cultural practices, being the only difference between plots the presence of an Atlantic forest remanant on 60% of the Biodiversity plot, while the Control plot is exclusively surrounded by banana crop. It has been adopted an holistic approach, including several environmental factors (soil fertility and climatic factors), crop physiology factors (foliar diagnosis and disease severity) and banana fruit (quality attributes, post-harvest behavior and pulp proteome). Results revealed a reduction on disease severity and a longer fruit greenlife, which represents the time available to transport and marketing, for plants of the Biodiversity plot. The Proteome has shown alterations on metabolic pathways, as Citric acid cycle, Piruvate metabolism and Alanine, aspartate and glutamate metabolism, suggesting a greater tendency on fatty acid biosynthesis on fruits from Biodiversity plots, whereas fruits from Control plot seems to enhance amino acid biosynthesis. Some evidence suggest that the Atlantic forest surrounding the agroecosystem can be helpful to plant homeostasis, with benefits to the crop and fruit.

Keywords: Banana, Biodiversity, Plant Physiology, Proteome.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	08
1.1.	Importância e perspectivas da bananicultura brasileira.....	08
1.2.	Vale do Ribeira e a devastação da Mata Atlântica.....	12
1.3.	Serviços ecossistêmicos e a biodiversidade no entorno de áreas cultivadas.....	14
1.4.	Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos da banana.....	17
1.5.	Fatores pré-colheita que influenciam o fruto.....	20
1.5.1.	Maturidade Fisiológica e vida verde da banana.....	21
1.5.2.	Sigatoka Negra e o processo de amadurecimento do fruto.....	22
1.5.3.	Sistemas de Produção e a qualidade da banana.....	23
1.5.4.	A aplicação da proteômica na compreensão de fenômenos biológicos.....	25
2.	OBJETIVOS.....	28
2.1.	Objetivo Geral.....	28
2.2.	Objetivos específicos.....	28
3.	MATERIAL.....	29
3.1.	Frutos.....	29
3.2.	Folhas.....	29
4.	MÉTODOS.....	30
4.1.	Métodos utilizados no experimento de campo.....	30
4.1.1.	Seleção das parcelas experimentais.....	30
4.1.2.	Descrição das parcelas experimentais.....	31
4.1.3.	Caracterização do fragmento florestal de Mata Atlântica.....	33
4.1.4.	Monitoramento das parcelas experimentais.....	33
4.1.4.1.	Solos e nutrição de plantas.....	33
4.1.4.2.	Aspectos meteorológicos.....	35
4.1.4.3.	Severidade de Sigatoka Negra.....	37
4.1.5.	Amostragens.....	38
4.1.5.1.	Amostras de frutos.....	38
4.1.5.2.	Amostras de folhas.....	40
4.2.	Caracterização das amostras.....	41
4.2.1.	Peso e tamanho dos frutos.....	41
4.2.2.	Respiração e produção endógena de etileno.....	41
4.2.3.	Evolução da cor da casca ao longo do amadurecimento.....	42

4.2.4. Evolução da firmeza da polpa ao longo do amadurecimento.....	42
4.3. Análises Bioquímicas e Biomoleculares.....	43
4.3.1. Amido e açúcares solúveis.....	43
4.3.2. Compostos fenólicos solúveis totais.....	43
4.3.3. Proteoma.....	44
4.3.3.1. Extração das proteínas e remoção dos detergentes.....	44
4.3.3.2. Remoção de detergentes, digestão, e purificação dos extratos.....	45
4.3.3.3. Sequenciamento e identificação das proteínas.....	45
4.3.3.4. Análise Estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Caracterização das parcelas experimentais.....	47
5.1.1. Características edáficas e nutricionais do cultivo.....	47
5.1.2. Características climáticas.....	51
5.1.3. Severidade de Sigatoka Negra.....	54
5.2. Caracterização das amostras.....	57
5.2.1. Tamanho, produção de etileno e vida verde.....	57
5.2.2. Evolução da coloração da casca e amaciamento da polpa.....	61
5.3. Análises Bioquímicas e Biomoleculares.....	62
5.3.1. Metabolismo de Carboidratos.....	62
5.3.2 Compostos fenólicos totais na polpa, casca do fruto e folhas da planta.....	63
5.3.3. Proteoma da polpa da banana.....	64
5.3.3.1. Identificação de proteínas relevantes.....	64
5.3.3.2. Funções das proteínas e vias metabólicas alteradas.....	72
6. DISCUSSÃO.....	85
7. CONCLUSÕES.....	89
8. PERSPECTIVAS.....	90
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância e perspectivas da bananicultura brasileira

A bananeira (*Musa spp.*) é originária do continente Asiático sendo, atualmente, explorada na maioria dos países tropicais. Seu fruto é amplamente consumido, rico em nutrientes e de perfume característico. Apreciada por pessoas de todas as classes sociais, sua importância é aumentada pelo fato de ser parte da alimentação básica para populações de baixa renda em muitos países. A bananeira é considerada planta de cultivo permanente, de crescimento rápido e que permite colheita o ano todo.

A bananeira é originária da região do sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental (Robinson e Saúton, 2010). Não por acaso, esta região abriga os três maiores produtores mundiais atuais desta fruta: Índia, China e Filipinas, respectivamente (tabela 1). Entretanto, os líderes no mercado internacional estão localizados na América Latina: Equador, Costa Rica e Colômbia, sendo esta região favorecida pela proximidade aos maiores centros consumidores, bem como detentora dos maiores índices de produtividade (FAOSTAT, 2010).

O Brasil ocupa o quinto lugar em produção e o segundo lugar em área plantada, produzindo mais de 7 milhões de toneladas anuais (tabela 1), com menos de um terço da produtividade média da Costa Rica (46,1 contra 14,6 ton/ha) (FAOSTAT, 2012). Embora esteja entre os maiores produtores mundiais, a exportação de bananas não é o principal destino da produção nacional (menos de 0,3%), sendo sua participação inexpressiva no mercado internacional (16º lugar, em quantidade exportada) (FAOSTAT, 2010). Dessa forma, a produção é praticamente toda destinada ao mercado interno na forma de fruta fresca e, em menor proporção, de produtos industrializados.

Tabela 1. Área cultivada, produtividade e produção anual da bananicultura nos cinco maiores produtores mundiais, em valores aproximados

	Área	Produtividade	Produção anual
	1000 ha	ton/ha	10 ⁶ ton
1. Índia	721	34,5	24,9
2. China	400	26,3	10,8
3. Filipinas	454	20,3	9,2
4. Equador	211	33,2	7,0
5. Brasil	481	14,3	6,9

Adaptado de FAOSTAT, 2012

Dentre os estados brasileiros, Bahia e São Paulo disputam a primeira posição, sendo que a Bahia dispõe de maior área cultivada (76 contra 60 mil ha) e São Paulo de maior produtividade (22 contra 16,6 ton/ha), ambos com produção anual próxima a 1,2 milhões de ton (IBGE, 2011). Porém, a maior produtividade está no Rio Grande do Norte (IBGE, 2011), onde concentra-se a bananicultura de mais alta tecnologia do país.

A produção paulista concentra-se na região sudeste do estado: Vale do Ribeira e Litoral Sul, sendo a Região Administrativa de Registro a maior produtora isolada, com mais de 800 mil ton anuais e 31 mil ha (IEA, 2011). Entre os principais municípios produtores estão: Miracatu, Cajati, Sete Barras, Eldorado, Jacupiranga, Registro e Itariri.

O Vale do Ribeira possui cerca de 4000 produtores de banana, grande parte pequenos produtores, de baixo poder aquisitivo, que tem na cultura da banana sua fonte exclusiva de renda (França, 2005), sendo que 99% dos agricultores possuem uma área inferior a 20 ha (Fundação Banco do Brasil, 2010). Isso mostra que esse cultivo é importante na fixação de agricultores familiares no campo e geração de emprego e renda (Nomura et al., 2010). Nesta região, existem diferentes perfis de produtores, em termos de variedade cultivada, tamanho de propriedade, nível de investimentos e tecnologia.

Atualmente os produtores de banana enfrentam uma doença presente em praticamente todas as áreas produtoras: a Sigatoka Negra (*M. fijiensis* Morelet), uma

doença agressiva que promove aumento continuado na utilização de fungicidas na região. As bananas de mesa que são, de forma geral, as mais exportadas, são muito suscetíveis a este patógeno (Jones, 2000).

Em relação ao controle da S. Negra, devido ao clima subtropical, a pressão do fungo é reduzida quando comparada à região equatorial, tornando suficientes de 10 a 18 aplicações anuais para o controle da doença, dependendo do perfil do produtor. Esta frequência pode ultrapassar a marca de 60 aplicações anuais nas condições tropicais, em países como Equador, Costa Rica e Colômbia (comunicação pessoal). Desde a primeira detecção deste fungo no Equador, a frequência de aplicações tem aumentado dramaticamente, levando agricultores a converter suas plantações para o manejo orgânico, sendo que em 2007 já existiam mais de 5 mil ha de banana orgânica certificada e muitas mais em processo de transição (Jimenez et al., 2007).

A indústria de alimentos apresenta demanda crescente de produtos diferenciados, principalmente quando se trata de produtos agropecuários. Alguns sintomas do mundo moderno como o aquecimento global, o esgotamento dos recursos hídricos e o aumento pronunciado de doenças mutagênicas têm levado ao questionamento dos sistemas produtivos de maneira global. Isso se reflete no mercado internacional, pelo crescimento acelerado no comércio de produtos cultivados sem ou com reduzida quantidade de agrotóxicos, bem como no desenvolvimento e fortalecimento de eventos internacionais sobre o Meio Ambiente (Convenção da Diversidade Biológica, Rio +20, Fórum Mundial das Águas, Conferência Mundial das Mudanças Climáticas etc.).

O apelo a produtos agropecuários diferenciados representa a principal porta de entrada aos grandes mercados, sendo este relacionado à sustentabilidade na cadeia produtiva do alimento ou a fatores nutricionais do mesmo. A exemplo de bananas comercializadas no mercado internacional com apelo voltado para redução de insumos e preservação do meio ambiente (figura 1), tem-se as *Ecobananas* e as bananas orgânicas *BananaLink*, a primeira certificada pela redução na utilização de agroquímicos e a segunda, pelo plantio orgânico às vezes aliado ao consorciamento com outras espécies.

Figura 1. Ecobananas e bananas orgânicas BananaLink. Produtos vendidos com o diferencial de redução na utilização de agroquímicos e consorciamento com outras espécies. Fonte: site das empresas Pacific Coast 'Wax Tip' Eco Bananas e BananaLink.

Da mesma forma, a preservação de biomas naturais em propriedades agrícolas está recentemente sendo introduzida na valoração de produtos agrícolas sofisticados. Este é o caso da produção de vinho nos entornos do bioma Mediterrâneo, que ultrapassa a bacia europeia e está presente em outras localidades de latitude e clima similares, formando o chamado “New World Mediterranean” (NWM), situado no Chile, África do Sul, Austrália, Baja California (México) e California (EUA), sendo a viticultura e a produção de vinho bastante difundidos em todas essas localidades (Viers et al., 2012). Cientistas de diferentes nacionalidades se uniram para avaliar de que forma o cultivo da uva nessas regiões pode ser benéfico, do ponto de vista da conservação deste importante e biodiverso bioma mundial. A ideia é promover a sustentabilidade das práticas agrícolas, favorecer a conservação deste bioma e associar a preservação desta biodiversidade à qualidade do vinho e sua diferenciação no mercado, compartilhando as experiências obtidas em cada região (Williams e Viers, 2011). É uma experiência bem sucedida e o termo “*Vinecology*”, criado pelos cientistas citados, já alcançou o mercado de vinhos.

O caso da produção de vinho associada a conservação do bioma do Mediterrâneo é bem diferente da produção de bananas na Mata Atlântica. Mas em ambos os casos, o cultivo foi expressivo no histórico de ocupação e degradação do bioma e, em ambos os casos, a conservação da biodiversidade, dos ecossistemas e seus serviços dependem do manejo dessas áreas agrícolas. Assim, embora em diferente magnitude, o presente trabalho comparte do objetivo de contribuir para o

entendimento de serviços ecossistêmicos prestados por um bioma em um cultivo, mas, neste caso, é voltado para o estudo do produto, a banana.

1.2. Vale do Ribeira e a devastação da Mata Atlântica

Com apenas 8,5% de remanescentes bem conservados, de seus 1,3 milhão de quilômetros quadrados originais, a Mata Atlântica abriga 35% de biodiversidade vegetal brasileira o que supera a diversidade vegetal da América do Norte e da Europa (S.O.S. Mata Atlântica, MMA).

O Vale do Ribeira abrange boa parte dos escassos remanescentes atuais, cumprindo importante papel na preservação deste bioma (Figura 2). Originalmente se estendia por todo o litoral brasileiro, com a maior biodiversidade por hectare entre as florestas tropicais, devido à sua larga distribuição geográfica e, consequentemente, ampla variação edafoclimática. Este bioma forma um complexo e exuberante conjunto de ecossistemas de grande importância ecológica, reconhecido nacional e internacionalmente no meio científico. É também, um dos biomas mais ameaçados do mundo devido às constantes agressões ou ameaças de destruição dos habitats nas suas variadas tipologias e ecossistemas associados, sendo considerado entre os seis hotspots mais importantes do mundo (Myers et al., 2000).

Figura 2. Domínio original da Mata Atlântica e seus ecossistemas remanescentes, inseridos no Vale do Ribeira (S.O.S. Mata Atlântica)

Dentro desse contexto, se insere o local de desenvolvimento deste trabalho, localizado no bairro rural de Guapiruvu, município de Sete Barras. Esta cidade possui aproximadamente 14 mil habitantes e suas principais atividades econômicas são agrícolas, com destaque para a produção de banana e palmito pupunha. Cerca de 70% do município é representado por remanescentes florestais (S.O.S. Mata Atlântica) pertencentes ao Parque Estadual Intervales, Parque Estadual Carlos Botelho e Área de Proteção Ambiental Serra do Mar, o que mostra a importância ecológica desta região (Melo et al., 2009).

O Guapiruvu é um dos bairros rurais tradicionais do município e possui um histórico de pequenos agricultores, que habitam esta região desde antes do século XIX. Atualmente a exploração predatória do palmito juçara (*Euterpe edulis*), o cultivo da pupunha (*Bactris gasipaes*) e a produção de banana são as principais atividades econômicas do bairro. Além destas atividades, há aproximadamente nove anos, alguns agricultores iniciaram a implantação de sistemas agroflorestais, sendo que hoje existem exemplos de produtores que sobrevivem deste sistema de produção (Melo et al., 2009). No entanto, a grande maioria dos bananicultores segue o modelo convencional de produção, baseado na utilização de insumos agroquímicos, principal causa do aumento do custo de produção da banana.

Além disso, em 2007, foi firmado um convênio entre a ESALQ (“Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz”) e o INCRA (Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária) para a criação do Programa de Pesquisa para Desenvolvimento de Assentamentos Rurais e Agricultura Familiar (PP-DARAF), que busca aliar o desenvolvimento regional à preservação da Mata Atlântica, disponibilizando assistência técnica para a implantação de sistemas agrícolas sustentáveis, com destaque para sistemas agroflorestais.

Todo esse histórico torna este assentamento um exuberante laboratório natural no que toca as relações bananeira e biodiversidade. A problemática do controle da Sigatoka Negra, exposta no item anterior, possui a utilização de serviços ecossistêmicos prestados pela biodiversidade como sua melhor alternativa de controle sustentável desta doença, devido à utilização crescente de fungicidas. A eficiência de sistemas

agroflorestais no controle desta doença já foi reportada em alguns trabalhos (Favreto et al., 2007; Vivan, 2002; Garcez e Rosa, 2007).

Além disso, o controle sustentável desta doença tem consequências positivas sobre o lucro do agricultor, já que a comparação de um sistema convencional e um agroflorestal mostrou que a diminuição da produtividade do sistema agroflorestal é superada pela diminuição nos custos de produção. Enquanto o rendimento do sistema convencional foi 4,5 vezes maior que no agroflorestal, o custo de produção foi 45 vezes superior para o convencional. Assim, a renda líquida gerada pelo sistema agroflorestal foi aproximadamente 38 % maior que a do sistema convencional (Melo et al., 2009). Isto se deve aos insumos necessários para o sistema convencional, tais como, óleo mineral, sulfato de amônio, adubo e à contratação de mão de obra. No sistema agroflorestal, os custos de produção se restringem à aquisição de ferramentas de trabalho.

Assim, os fatos expostos retratam a realidade tratada no presente trabalho, dando suporte a justificativa do mesmo no que toca a contribuição do entendimento do papel da biodiversidade nas complexas relações com o cultivo e, principalmente, seu reflexo no fruto. Além de ser um local ideal para a obtenção de amostras passíveis de avaliar como a presença da biodiversidade pode interferir na banana, objeto de estudo deste trabalho.

1.3. Serviços ecossistêmicos e a biodiversidade no entorno de áreas cultivadas

Serviços ambientais ou ecossistêmicos são os benefícios obtidos pelo homem a partir do funcionamento dos ecossistemas, de forma direta, como alimentos, água, madeira etc., ou indireta, como a regulação da erosão, polinização, sequestro de carbono e o controle de pragas e doenças agrícolas (*World Resources Institute*).

Biodiversidade se refere à variação dos organismos vivos de todos os ecossistemas e complexos ecológicos (CBD- *Convention of Biological Diversity*) e pode estar relacionada a quatro níveis de organização: gene, espécie, habitat e ecossistema (Hermy e Cornelys, 2000). Nos últimos anos, a tentativa de elucidar os efeitos que a biodiversidade incorre nos ecossistemas, seu funcionamento e serviços, tem sido expressiva na literatura científica. Os resultados ainda inconsistentes tornam esse

campo incerto e dinâmico, mas já disposto de uma evidência clara do papel chave da biodiversidade na provisão de serviços dos ecossistemas e do entendimento que grandes perdas de biodiversidade levam ao comprometimento desses serviços (Balvanera et al., 2006). Além disso, a promoção da agrobiodiversidade aumenta a resiliência de sistemas agrícolas a perturbações, reforçando a segurança alimentar frente a mudanças climáticas e escassez de recursos (Frison, Cherfas e Hodgkin, 2011).

Desse modo, uma perspectiva mais abrangente do componente vegetal de um agroecossistema deve ser entendida como um mosaico de áreas de cultivos anuais e perenes, fragmentos florestais, pastagens, campos em pousio, pomares, várzeas, campos abandonados (capoeiras) e plantações de árvores. Esse complexo de habitats ricos em biodiversidade deve proporcionar o intercâmbio de comunidades de organismos (herbívoros, predadores, parasitóides e decompositores de matéria orgânica), materiais (água, sedimentos do solo, pólen, sementes e matéria orgânica) e energia (ciclagem de nutrientes) (revisado em Altieri, Silva e Nicholls, 2003).

Em relação à dinâmica de insetos do agroecossistema, a influência da vegetação do entorno parte da seguinte premissa: a heterogeneidade de espécies vegetais determina as interações herbívoro-planta que, por sua vez, influenciam na população de predadores e parasitóides, bem como de seus hospedeiros e presas. Isso implica no padrão do movimento de pragas e inimigos naturais entre os componentes da vegetação das paisagens agrícolas, sendo que, grandes populações de pragas migram em massa de hospedeiros alternativos das vizinhanças para monoculturas recém estabelecidas, devido a sua maior vulnerabilidade (Altieri, Silva e Nicholls, 2003).

A proximidade de agroecossistemas a ecossistemas naturais conservados pode ser determinante na manutenção do equilíbrio ambiental dos mesmos. Por exemplo, um estudo mostrou que existe uma relação direta entre a diversidade e a abundância de populações de espécies de mariposas nativas com a distância de um remanescente florestal do sudoeste costa riquenho (Ricketts et al., 2001).

Da mesma forma, a utilização de serviços ecossistêmicos em agroecossistemas foi experimentada com sucesso em comunidades seringueiras da Reserva Chico Mendes, no Acre. O sistema conhecido como Ilhas de Alta Produtividade (IAP) surgiu

como uma alternativa ao extrativismo de seringais nativos no Acre, propondo o plantio de pequenas áreas de seringueira (*Hevea brasiliensis*), espaçadas entre si e rodeadas pela biodiversidade da floresta nativa. Os entornos de floresta funcionam como uma estratégia para impedir a disseminação do fungo causador do Mal das Folhas (*Microcyclus ulei*), principal problema fitossanitário deste cultivo na região. Nestas IAPs, o plantio oriundo da seleção de árvores superiores em uma população natural de seringueira consagrou o aumento da produtividade das colocações (em até 67%) a partir do adensamento nos roçados (Kageyama et al., 2002).

O conceito de IAPs também foi experimentalmente praticado com tomateiros em Apiaí, cidade de localização privilegiada entre importantes fragmentos de Mata Atlântica (Tomas, 2010). Neste estudo, tomateiros cultivados em IAPs tiveram menor incidência de pragas e doenças que cultivos convencionais, totalizando uma redução de 80% do custo de produção.

Nos dois casos citados acima, a utilização da floresta como redutora da pressão de pragas e doenças foi realizada em locais tradicionalmente produtores de seringueira e tomate. Isso mostra que, ainda que a pressão de pragas e doenças da bananeira seja extremamente alta no Vale do Ribeira, é possível que os benefícios trazidos pela floresta presente no entorno do agroecossistema possam superar esta pressão, possibilitando uma redução drástica ou a não utilização de agroquímicos. Nesse contexto, a Sigatoka Negra entra como o principal evento a ser monitorado, pois, além de ser a principal doença da bananeira, esta é causada por um fungo (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), cuja principal forma de disseminação é dada pelo vento e facilitada pelo plantio em extensão (Stover, 1980; Craenem, 1998).

Como já citado, a biodiversidade já mostrou efeitos na redução da severidade de S. Negra, como ocorre nos sistemas agroflorestais, com reduzida luminosidade do sistema (Favreto et al., 2007; Vivan, 2002; Garcez e Rosa, 2007). Isto se deve à necessidade da luz no processo de produção e ativação da toxina deste fungo. Esta toxina, conhecida como cercosporina, tem ação fotossensibilizadora, que gera espécies ativas de oxigênio, causando peroxidação dos tecidos, sendo prejudicial não só aos vegetais, mas quase todos os tipos de organismos vivos (Daub e Ehrenshaft, 2000).

A preservação de fragmentos florestais no entorno de parcelas cultiváveis promove, ademais dos efeitos da biodiversidade, outros efeitos relacionados à proteção do cultivo na forma de quebra-vento. Os efeitos proporcionados por este tipo de tecnologia estão ligados à diminuição da velocidade dos ventos, à diminuição da evapotranspiração potencial, à manutenção da umidade e temperatura do solo e do ar, bem como a redução de danos físicos causados pelo vento (Burke et al., 1998).

Assim, a condição ambiental de um cultivo está diretamente relacionada com a vegetação do entorno do mesmo e, ainda que os estudos existentes sejam mais voltados à dinâmica das pragas e doenças, é possível que a mudança na condição ambiental influencie também na fisiologia do cultivo, sendo refletida na qualidade do alimento. Dentro desse contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos voltados para a compreensão das relações existentes entre a biodiversidade e os cultivos agrícolas, bem como os potenciais benefícios investigados da perspectiva dos frutos.

1.4. Aspectos Fisiológicos e Bioquímicos da banana

Como todo fruto climatérico típico, a qualidade da banana a ser consumida é determinada por um conjunto de eventos bioquímicos que ocorrem no fruto ao longo do processo de amadurecimento, sinalizados pelo aumento pronunciado na produção endógena de etileno (Barry e Giovannoni, 2007). Estes eventos incluem mudanças na coloração e textura da casca e do fruto, síntese de compostos voláteis que compõe o aroma e o adoçamento do fruto pela degradação do amido a açúcares solúveis, entre outros (Seymour, Taylor e Tucker, 1993).

A banana acumula de 12 a 30% de amido durante o seu desenvolvimento, dependendo da cultivar (Mota et al., 1997; Soares et al., 2011), que é degradado parcial ou inteiramente durante o amadurecimento, com acúmulo de sacarose, frutose e glicose. A sacarose é o açúcar solúvel predominante perfazendo cerca de 80% do total de açúcares (Cordenunsi & Lajolo, 1995; Mota et al., 1997; Soares et al., 2011). Bananas do tipo *plantain*, como a Terra (AAB) e Figo (ABB), chegam ao final do amadurecimento com grande parte (~15%) do amido ainda não degradado, de maneira que devem ser processados antes do consumo. Bananas do tipo “sobremesa” como a Nanicão (AAA) e

Prata (AAB), têm quando maduras, ao redor de 1% de amido remanescente e cerca de 18% de açúcares solúveis (Mota et al., 1997; Agopian et al., 2008). A degradação do amido é responsável não apenas pelo adoçamento do fruto, mas algumas evidências colocam este na posição de evento chave também para o amaciamento da polpa (Shiga et al., 2011).

As α -amilases (E.C 3.2.1.1) e β -amilases (E.C 3.2.1.2) participam da degradação hidrolítica do amido e estão presentes durante todo o amadurecimento dos frutos de banana (Bassinello, Cordenunsi e Lajolo, 2002; Soares, 2009; Peroni, 2007). A α -amilase é conhecida por ser a enzima responsável pelo início do processo de degradação do grânulo de amido, atuando aleatoriamente nas cadeias de amilose e amilopectina, produzindo uma miríade de glicanos de diferentes tamanhos (Beck e Ziegler, 1989). Apesar de estar presente em todas as fases de amadurecimento da banana, não se sabe ainda se é a enzima responsável pelo início da degradação do amido da banana. A β -amilase tem atividade aumentada no climatério da banana, de forma coincidente com o aumento de etileno e o período de degradação do amido (Purgatto et al., 2001; Nascimento et al., 2006). A degradação do amido que prescindiria do início da degradação promovido pela α -amilase depende da presença das GWD (Diquinase de glucano-água - *Glucan-water dikinase*) e PWD (Diquinase de fosfato-água – *Phosphate-water dikinase*), que fosforilam os carbonos 6 e 3 das moléculas de glicose da amilopectina, permitindo que a cadeia se “abra” e a β -amilase atue. Esta via parece atuar na degradação do amido da banana já que este é fosforilado nas posições mencionadas e já foi detectada a presença da GWD e PWD ligadas aos grânulos de amido (dados ainda não publicados).

A β -amilase hidrolisa ligações α -(1-4) dos polímeros que compõe o amido (amilose e amilopectina), removendo sucessivas unidades de β -maltose a partir dos terminais não-redutores. As amido-fosforilases (E.C 2.4.1.1) atuam tanto no sentido da síntese do amido quanto no sentido da degradação. Estas enzimas podem adicionar ou remover moléculas de glicose-1-fosfato nos polímeros de glicose. Durante a síntese e a degradação do amido na banana, as diferentes formas das amido-fosforilases modulam sua atividade dando indícios da sua importância nestas fases (Mota et al., 2002). Foram identificados dois tipos de amido-fosforilases comuns nos vegetais superiores: um deles,

a amido-fosforilase 1 (PHO1), é a forma plastidial que, por sua localização, acredita-se estar mais relacionada com a síntese do amido. A PHO1 tem maior afinidade por substratos com cadeias simples e pequenas. A amido-fosforilase 2 (PHO2) é a forma citosólica que tem maior afinidade por substratos de cadeias grandes com alto grau de polimerização (Albrecht et al., 2001; Schupp e Ziegler 2004). Mota et al. (2002) encontraram maior acúmulo da fosforilase 2 em relação a fosforilase 1 durante o amadurecimento da banana cv. Nanicão.

Além destas enzimas, alguns reguladores parecem exercer papel fundamental na ocorrência do amadurecimento da banana. Ainda que o aumento na produção de etileno esteja diretamente associado com o início do amadurecimento, outros reguladores parecem estar também envolvidos com este processo. Este é o caso do ácido indol-3-acético (AIA), cuja diminuição nos níveis livres parece estar correlacionada com o disparo do amadurecimento da banana (Purgatto et al., 2002). Bananas infiltradas com este fitormônio tiveram alguns eventos ligados ao amadurecimento atrasados, como a degradação do amido e a síntese da sacarose, que ocorreu após o pico da respiração (7 dias de atraso em relação ao controle), (Purgatto et al., 2001). Neste trabalho, foi investigada também a atividade de algumas enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos e a β -amilase teve atraso no aumento de atividade e do nível de transcritos, indicando seu envolvimento no desarranjo provocado pelo AIA no metabolismo de carboidratos. Foi constatado também que a infestação da planta pela S. Negra parece influenciar os níveis de AIA no fruto verde (Saraiva et al., 2013). Como consequência da doença, os frutos apresentam menor vida verde e, conseqüentemente, menores níveis de AIA no estágio verde.

A síntese de compostos voláteis é também um evento de extrema importância para a formação do *flavor* do fruto maduro. A síntese de compostos voláteis na banana tem início três dias após o pico da produção endógena de etileno e envolve a formação de terpenos, aldeídos, cetonas, álcoois e ésteres (Facundo et al., 2012). Em geral, os voláteis são formados a partir da via metabólica dos ácidos graxos e derivados, fenólicos e terpenos, porém, pode ocorrer degradação enzimática e auto-oxidação de metabólitos primários e secundários, como lipídeos, amino ácidos, glicosinolatos e fenólicos (Lars et al., 2007).

Além disso, apesar da banana não ser considerada uma boa fonte de compostos bioativos, compostos fenólicos já foram detectados e seus teores mostram ampla variação ao longo do amadurecimento. Na polpa, a galocatequina e a epicatequina são os fenólicos mais abundantes da cultivar Nanicão, sendo os teores encontrados no fruto maduro maiores que nos frutos verdes, o que não foi observado nas outras cultivares analisadas (Bennet et al., 2010). Quando avaliados a partir de frações da parede celular da polpa, a fração insolúvel apresenta mais alta capacidade antioxidante que a fração solúvel e derivados do ácido hidroxí-cinâmico foram os fenólicos mais abundantes em ambas as frações, ausentes de antocianinas e antocianidinas (Bennet et al., 2010). Quando avaliados em estágios intermediários, compostos fenólicos totais aumentam fortemente no estágio amarelo com pedúnculo verde e amarelo sem manchas e voltam a decair no início da senescência (amarelo com manchas pretas), sendo que a cultivar FLHORBAN 920 (grupo AAA, resistente às Sigatokas Negra e Amarela) apresenta teores três vezes superiores de fenólicos totais, quando comparados à Grande Naine (grupo AAA, subgrupo Cavendish) (Bugaud et al., 2014).

Assim, a banana apresenta uma complexa dinâmica metabólica associada ao processo de amadurecimento e senescência. Por isso, como o objetivo deste trabalho é focado na resposta do fruto à determinada condição ambiental, optou-se por trabalhar com o fruto verde, quando o metabolismo está o mais próximo possível do fruto ligado à planta mãe e a expressão de genes relativos ao amadurecimento ainda não foi disparada.

1.5. Fatores pré-colheita que influenciam o fruto

A qualidade final da banana é resultante de cuidados desde o cultivo da bananeira no campo até a chegada do produto aos consumidores. Dentre os principais fatores determinantes na qualidade da banana, destaca-se o ponto de colheita, condições de crescimento da planta e armazenamento do fruto, cuidados no manuseio do cacho e fatores bióticos, como o ataque de pragas e doenças.

1.5.1. Maturidade Fisiológica e vida verde da banana

O grau de maturação fisiológica dos frutos no momento da colheita é extremamente determinante na qualidade final da banana. Visando uma padronização do ponto de colheita em função da quantidade de energia solar absorvida pelas plantas, foi desenvolvido o conceito de Idade Fisiológica. Esta é medida por meio da soma de temperaturas médias diárias, a uma temperatura base de 14 °C. Esta variável é expressa em graus dia – GD (degree day) e a maturidade fisiológica do fruto é alcançada aos 600 GD (Chillet et al., 2006), quando os frutos apresentam a capacidade de amadurecer, se retirados de sua planta mãe.

Quando o enchimento dos frutos não é dificultado por estresses durante seu desenvolvimento, bananas Cavendish (cv. Grande Naine, nas condições tropicais das Antilhas Francesas) colhidas a 900 GD, alcançam o diâmetro comercial e uma vida-verde suficiente para atingir o mercado importador (Ganry e Meyer, 1975).

A vida verde corresponde ao período de tempo existente entre a colheita da banana e o início do processo natural de amadurecimento, via síntese de etileno endógeno (Peacock e Blake, 1970). A importância deste parâmetro na cadeia da banana é que ele representa o tempo disponível de transporte para que a banana alcance os mercados varejistas ainda em estado verde, já que o amadurecimento é realizado artificialmente com etileno ou acetileno em câmaras de climatização (Marriott, 1980).

A idade fisiológica da banana no momento da colheita é extremamente determinante na duração da vida verde. Estes parâmetros estão intimamente correlacionados por um modelo exponencial negativo, ou seja, quanto mais avançada a idade fisiológica da fruta no momento da colheita, menor a vida-verde (Jullien, 2008).

A colheita de bananas no Brasil, é normalmente realizada pelo diâmetro, quando este alcança o diâmetro referência $\frac{3}{4}$ cheio, caracterizado pela perda de “quinas” nos frutos. No entanto, este parâmetro não garante que frutos de diferentes plantas estejam na mesma idade fisiológica, especialmente em condições subtropicais, com a presença de uma estação fria durante o ano. Por conta disso, neste trabalho foi utilizado o cálculo da idade fisiológica descrito acima, a fim de padronizar o ponto de colheita das bananeiras selecionadas para o estudo.

1.5.2. Sigatoka Negra e o processo de amadurecimento do fruto

A ocorrência de estresses bióticos no cultivo pode ter consequências diretas no comportamento pós-colheita do fruto. A exemplo disto, a Sigatoka Negra merece atenção, já que está presente em todos os bananais do país e, embora seja uma doença foliar, é bastante conhecida por causar problemas na qualidade da banana.

No ano de 1972, em Honduras, foi feita a primeira detecção da Sigatoka Negra, atualmente classificada, na sua fase perfeita, como *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, 1969 e na imperfeita como *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, 1976 (Moreira, 1999). A primeira detecção no Brasil foi em 1998, no estado do Amazonas, no estado de São Paulo isso ocorreu em 2004.

A maior parte da infecção ocasionada pela Sigatoka Negra começa com os esporos sendo transportados pelo vento e depositados nas folhas jovens da bananeira. Estes germinam em duas a três horas, se houver disponibilidade de água. Os tubos germinativos, em seguida, crescem epifiticamente por alguns dias (2-3 dias para *M. fijiensis* Morelet e 4-6 dias para *M. musicola*) antes de sua penetração na folha via estômato. Esta penetração ocorre devido a uma resposta dependente de água, por meio da formação de um apressório ou estomatopódio através do estômato (Meredith, 1970; Stover, 1980).

O sintoma desta doença inicia-se com um ponto levemente clorótico entre as nervuras secundárias das folhas novas. Há evolução para estrias e posteriormente para manchas necróticas, elípticas e alongadas, que em estágio avançado são circundadas por um halo amarelo, com o centro deprimido e de coloração acinzentada (Matos et al., 2001). Quando o ataque é severo, as lesões se unem, provocando necrose completa da folha.

Entre os danos causados estão a redução de tecido fotossinteticamente ativo que, em ataques severos, leva a redução no peso dos frutos e cachos (Ramsey, Daniells e Anderson, 1990; Moreira, 1999; Castelan et al., 2012), bem como a redução da vida verde e o amadurecimento precoce antes da colheita (Meredith, 1970; Borges et al., 1998; Chillet et al., 2009; Castelan et al., 2012). Além de acelerado, o processo de amadurecimento apresenta aumento da intensidade respiratória e da produção

endógena de etileno, indicando um desarranjo no comportamento pós-colheita do fruto causado pela doença (Castelan et al., 2012). Entre os principais desarranjos: diferenças em relação aos conteúdos de carboidratos (amido e açúcares solúveis) e atividade das enzimas que degradam o amido e diferenças em relação aos compostos fenólicos totais e fito hormônios como o ácido indol acético e ácido abcísico (Saraiva et al, 2013). Além disso, outros parâmetros de qualidade também foram identificados por serem alterados pela infestação desta doença, este é o caso da coloração da polpa (Chillet et al., 2014) e da sensibilidade do fruto a podridão de coroa (Ewané et al., 2013).

Assim, as mudanças que ocorrem na banana durante o amadurecimento dependem da qualidade do fruto pré-climatérico a ser colhido, que por sua vez depende dos tratos culturais e condições fitossanitárias do cultivo. Sob a perspectiva do amadurecimento do fruto, o desenvolvimento deste representa um histórico de estresses bióticos e abióticos ao qual o fruto está submetido e que deve ter reflexos nos mais diferentes atributos do fruto.

1.5.3. Sistemas de Produção e a qualidade da banana

Os estudos conduzidos até o momento permitem afirmar que mudanças nos sistemas de produção ou em condições ambientais influenciam a planta e, conseqüentemente, o fruto colhido. Em relação a biodiversidade, raros estudos avaliam seu efeito a partir da perspectiva do fruto, sendo Neelam et al (2008) uma das exceções. No entanto, outros aspectos do sistema de produção agroecológico já foram investigados a partir do fruto.

Muitos estudos já foram realizados no sentido de comparar alimentos obtidos pelos sistemas de cultivo convencional e orgânico em relação ao seu valor nutricional. No entanto, poucos chegaram a conclusões científicas válidas, com exceção do conteúdo de nitrato, teor de matéria seca, vitamina C e alguns antioxidantes (Bourn e Prescott, 2002).

Bourn e Prescott (2002) alertam sobre os tipos de estudos realizados para a comparação nutricional entre alimentos orgânicos e convencionais. Eles advertem que a maior parte dos estudos é desenhada para avaliação de um trato cultural específico

ou, ainda, são avaliados alimentos orgânicos e convencionais comprados no mercado varejista, o que não permite nenhuma conclusão válida entre estes sistemas.

Alguns resultados de trabalhos considerados corretos em termos experimentais dentro da produção orgânica são listados a seguir: (1) hortaliças oriundas de um mesmo lote de sementes e ponto de colheita comercial padronizado, em que as orgânicas tiveram maior capacidade antioxidante (Arbos et al., 2009); (2) tomates orgânicos tiveram maiores teores de vitamina C, carotenóides, além de maiores níveis entre a maioria dos polifenóis (Caris-Veyrat et al., 2004); (3) ameixas orgânicas tiveram maiores teores de minerais (potássio, zinco e magnésio), vitaminas (vitamina C, β - caroteno, α - e γ - tocoferol) e maiores teores de ácidos fenólicos (cafeico, ferúlico e clorogênico) e flavonóides (miricetina e kaempferol) que as convencionais, resultando em um maior conteúdo de fenólicos totais (Lombardi-Boccia et al., 2004). Neste último estudo, ambos os sistemas de produção foram conduzidos na mesma propriedade (600 m de distância entre parcelas), sendo que o sistema orgânico foi conduzido em três diferentes tipos de manejo do solo: descoberto, solo coberto com leguminosa e solo com cobertura vegetal natural, onde este último apresentou as maiores diferenças do sistema convencional nos parâmetros citados.

Estes trabalhos podem ser considerados indicativos de que o sistema de produção orgânico promoveu uma melhora do sistema de defesa antioxidante da planta, que provavelmente está ligado a uma proteção do fruto contra danos, já que o mesmo foi cultivado na ausência de pesticidas (Carbonaro et al., 2002).

Em batatas, o cultivo orgânico promoveu um aumento na expressão de proteínas relacionadas a resposta ao estresse, o que foi atribuído a maior solubilidade e disponibilidade de Nitrogênio aplicado no cultivo convencional, refletido em maiores níveis de Nitrogênio encontrados nas batatas cultivadas convencionalmente (Lehesranta et al., 2007).

Em uma análise de metadados mais recente (Brandt et al., 2014), foi constatado que a disponibilidade aumentada do Nitrogênio, característica da adubação química realizada em sistemas convencionais, reduz o acúmulo de metabólitos secundários e vitamina C, sendo que nos alimentos orgânicos, o conteúdo de metabólitos secundários encontrado foi 12% maior ($p < 0,0001$). Isto parece estar relacionado a um mecanismo de compensação entre o metabolismo primário e secundário, em que a alta

disponibilidade de nutrientes promove o crescimento às custas de recursos utilizados na síntese de compostos de defesa (Muller et al., 2013 e suas referências).

Portanto, da mesma forma que o sistema de produção pode influenciar na bioquímica do fruto, a manutenção de fragmentos florestais no entorno das parcelas cultivadas pode promover efeito semelhante, já que a diversificação do sistema é prática usualmente associada ao sistema orgânico.

1.5.4. A aplicação da proteômica na compreensão de fenômenos biológicos

Uma vez que o Proteoma reflete os processos que ocorre em um sistema biológico, como a planta e seus produtos, o seu entendimento traz uma visão ampla e sistemática dos processos metabólicos que acontecem, o que pode ajudar a decifrar como os vegetais reagem sob diferentes condições de crescimento e pós-colheita (Esteve et al., 2013). Isso acontece porque as proteínas representam os efetores da expressão gênica, provendo pistas sobre a ativação e a desativação de determinadas vias metabólicas, sendo muito eficaz na elucidação de processos como o desenvolvimento e o amadurecimento de frutos (Toledo et al., 2012; Palma et al., 2011).

Inúmeros trabalhos se propuseram a analisar o proteoma de diferentes tecidos da bananeira, seja para a investigação da adaptação dos genótipos a estresses bióticos (Lu et al., 2013; Li et al., 2013) e abióticos (Carpentier et al., 2007; Vanhove et al., 2012), de processos como o amadurecimento (Toledo et al., 2012), entre outros (Samyn et al., 2006; Zhang, Feng e Zhang et al., 2012). A banana já teve o sequenciamento do genoma da variedade diplóide Pahang (*Musa acuminata*, AA) descrito, o que trouxe grande avanço na identificação de genes de importância agrônômica, em uma planta cujo melhoramento é particularmente desafiador (D'Hont et al., 2012).

No entanto, são escassos os trabalhos que utilizam dessas ferramentas da genômica funcional para avaliar o efeito da biodiversidade nos cultivos e seus produtos. Ainda assim, o estudo de práticas agrícolas sustentáveis tem ganhado importância, em um mundo que está se tornando consciente dos efeitos nocivos da utilização de produtos químicos sintéticos na agricultura (Matoo e Abdul-Baki, 2006). Neste sentido, o estudo da resposta do tomateiro em consequência do plantio na entressafra e utilização da palhada de ervilhaca peluda (*Vicia villosa* Roth) vem sendo bastante

explorado, já que esta prática possibilitou significativo aumento da produtividade do tomate, quando comparado a uma cobertura com polietileno preto (Teadsdale e Abdul-Baki, 1997).

O plantio direto do tomateiro sob a palhada de ervilhaca peluda promove o atraso da senescência das folhas e aumenta sua resistência às doenças, levando a maior longevidade da planta (Kumar et al., 2004; Matoo e Abdul-Baki, 2006). As bases moleculares que parecem explicar este fenômeno são: (1) o atraso da senescência parece estar associado à manutenção de níveis altos e estáveis de transcritos e proteínas de rubisco e a forma citosólica da glutamina sintetase (Matoo e Abdul-Baki, 2006), já que a senescência resulta da rápida degradação dessas proteínas, que são utilizadas para desenvolvimento de novos tecidos (Matoo e Abdul-Baki, 2006); (2) a resistência a doenças, aparentemente está relacionada à decomposição da palhada de ervilhaca, que favorece a planta numa maior eficiência de utilização e mobilização de N e C, alterando o padrão de expressão de genes e proteínas como a quitinase básica e a osmotina, promovendo a defesa contra doenças (Kumar et al., 2004).

Ainda em relação à resposta do tomateiro cultivado sob a cobertura morta de ervilhaca, outro trabalho foi realizado, visando o fruto, utilizando uma cultivar não transgênica (556AZ) e uma transgênica (579HO). A transgênica acumula maiores quantidades de poliaminas (espermidina e espermina), tem maior valor nutricional e possui vida mais longa na planta. As duas cultivares foram selecionadas para estudar o papel das poliaminas na expressão gênica e ambas obtiveram melhor desempenho, em termos de produtividade, no cultivo sob a cobertura de ervilhaca. Em relação ao perfil metabólico, os tomates transgênicos cultivados em plástico preto apresentaram perfis metabólicos semelhantes aos tomates não transgênicos cultivados na cobertura de ervilhaca, indicando que esta prática ativa as mesmas vias metabólicas induzidas pela introdução do transgene (Neelam, et al., 2008).

A grande diferença destes trabalhos em relação aos demais disponíveis na literatura é a utilização de ferramentas da genômica funcional que podem fornecer caminhos para compreender os sistemas biológicos. Como Kumar et al (2004) enfatizaram, estudos deste tipo fornecem a legitimidade científica das vantagens dos

sistemas alternativos de produção, aumentando a confiabilidade para que estas práticas sejam adotadas.

Vale ressaltar que a prática agrícola estudada nos artigos citados não é a mesma do que a testada no presente trabalho, já que esta inclui o incremento de uma espécie vegetal (diferente da cultivada) plantada de maneira sequencial dentro do agroecossistema. O presente trabalho visa estudar o efeito da biodiversidade natural presente no entorno do agroecossistema durante o período de cultivo. Embora este trabalho não venha, por si só, chegar a este nível de entendimento acerca dos efeitos da biodiversidade na presente abordagem (biodiversidade nativa no entorno de cultivos), este pode iniciar os passos para compreender de que maneira a biodiversidade natural no entorno pode favorecer os cultivos e seus produtos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é verificar se a presença de um fragmento florestal no entorno do agroecossistema da bananeira pode alterar o padrão de expressão de proteínas do fruto, a fim de contribuir para o entendimento das vias metabólicas alteradas por esta condição ambiental.

2.2. Objetivos específicos

- Selecionar parcelas experimentais similares, cuja única diferença esteja relacionada com a biodiversidade no agroecossistema.
- Caracterizar as parcelas experimentais em relação a fatores bióticos e abióticos do agroecossistema, tais como: severidade de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), monitoramento de Broca da bananeira (*Cosmopolitus sordidus*), fertilidade e classificação do solo, nutrição mineral de plantas (diagnose foliar), temperatura, umidade relativa e radiação solar (global e PAR), além da caracterização do fragmento florestal.
- Obter amostras de frutos e folhas da bananeira de maneira criteriosa, para que a única diferença entre as amostras esteja relacionada com a influência da biodiversidade no ambiente de cultivo.
- Caracterizar os frutos ao longo do amadurecimento, a fim de evidenciar possíveis diferenças entre as amostras desencadeadas pelo processo de amadurecimento do fruto.
- Verificar as proteínas diferentemente expressas entre as amostras, visando a identificação de vias metabólicas diferentemente ativadas pela proximidade com a biodiversidade da Mata Atlântica.

3. MATERIAL

3.1. Frutos

Frutos de banana (*Musa acuminata*, grupo AAA, cultivar Nanicão) obtidos em duas parcelas experimentais, referentes aos dois tratamentos: Biodiversidade e Controle. A parcela Biodiversidade apresenta 60% de seu perímetro limítrofe a um fragmento remanescente de Mata Atlântica e a Controle 200 m de raio com a presença exclusiva do monocultivo de bananeira. Os frutos foram obtidos de pencas posicionadas no centro do cacho, com idade fisiológica conhecida, próxima ao ponto de colheita comercial da região.

3.2. Folhas

As folhas foram coletadas nas mesmas plantas amostradas para a colheita de frutos, no momento da colheita.

4. MÉTODOS

4.1. Métodos utilizados no experimento de campo

4.1.1. Seleção das parcelas experimentais

Para a avaliação da influência da biodiversidade sobre aspectos da banana, foram realizadas buscas de parcelas experimentais em bananais potenciais na região do assentamento “Alves, Pereira e Teixeira”, localizado em áreas de transição dos Parques Estaduais Intervales e Carlos Botelho, no município de Sete Barras, São Paulo. Esta região foi escolhida devido à forte presença da Mata Atlântica e seu alto grau de conservação em uma região agrícola marcada pelo cultivo da bananeira, das cultivares Nanicao (AAA) e Prata (AAB).

Há alguns anos, alguns agricultores familiares deste assentamento adotaram o manejo de espécies arbóreas dentro do agroecossistema de banana, a fim de implantar um Sistema Agroflorestal, que consiste no plantio concomitante ou sequencial de espécies arbóreas com outras culturas anuais e perenes (Kabashima, et. al., 2009). Como o objetivo do trabalho é avaliar a influência da biodiversidade na qualidade e fisiologia de frutos e folhas, inicialmente implantamos um ensaio visando a comparação de um sistema agroflorestal com um monocultivo (figura 3), baseado em três tratamentos: agroflorestal, convencional sombreado (50% sombreamento artificial com sombrite, semelhante à luminosidade média da agrofloresta, estimada com luxímetro) e convencional pleno sol. Entretanto, verificamos que as diferenças entre as parcelas estudadas superavam a presença da biodiversidade (espaçamento, época de plantio, uso de agroquímicos etc) e a ocorrência de múltiplas variáveis poderia dificultar e até inviabilizar a interpretação dos resultados. Posteriormente, selecionamos uma área de monocultivo sem a utilização de agroquímicos, cercado em 100% do perímetro por um fragmento florestal de Mata Atlântica, ou seja, uma autêntica Ilha de Alta Produtividade (IAP). Esta IAP seria comparada com um monocultivo convencional implantado na mesma época, o mesmo utilizado na situação anterior (figura 3). Mas o problema de múltiplas variáveis permaneceria, já que além da biodiversidade, as parcelas se diferiam pelos tratos culturais: agroecológicos e convencionais.

Assim, definimos que a melhor possibilidade de avaliar os efeitos da biodiversidade seria a seleção de parcelas experimentais idênticas em relação aos tratos culturais, mas com a biodiversidade da Mata Atlântica nos arredores de uma das parcelas. Esta parcela simula isoladamente o efeito da biodiversidade no sistema de Ilhas de Alta Produtividade, que utiliza o plantio agroecológico de pequenas parcelas de monocultivo cercadas pela biodiversidade florestal (Kageyama et al., 2002; Tomas, 2010).

Figura 3. Localização geográfica das áreas selecionadas nos experimentos iniciais: SAF (Sistema Agroflorestal), IAP (Ilha de Alta Produtividade) e Convencional (sombreado e pleno sol). Fotos aéreas retiradas da base de dados do Incra –SP; escala 1:100000.

Foram utilizados os seguintes critérios na seleção das parcelas: (1) proximidade e fronteira com o fragmento florestal (uma parcela próxima e outra distante), (2) época de implantação das áreas e os históricos de tratos culturais, que deveriam ser iguais, (3) uniformidade do relevo, uniformidade do cultivo (altura das plantas, espessura do pseudocaule, espaçamento, etc.).

4.1.2. Descrição das parcelas experimentais

Foram selecionadas duas parcelas experimentais de cultivo convencional de bananeira (cultivar Nanicão): uma das parcelas, denominada “Biodiversidade” (B) apresenta 60% de seu perímetro limítrofe a um fragmento de Mata Atlântica. A outra parcela, “Controle” (C), está plenamente inserida em uma extensa área de produção de

banana, tendo o mínimo de 200 m de raio com a presença exclusiva do monocultivo convencional da banana (Figuras 4 e 5). As coordenadas geográficas referentes ao centro das parcelas experimentais são: **B** - Latitude 24°17'22.91"S Longitude 48° 6'24.72"O; **C** - Latitude 24°17'26.30"S Longitude 48° 6'17.90"O. As duas parcelas apresentam relevo plano e uma área de aproximadamente 0,4 ha, com cerca de 500 plantas em cada uma.

Figura 4. Foto Aérea referente às parcelas Biodiversidade - B e Controle - C. Fonte: Base de dados do Incra – SP; escala 1:50000.

Figura 5. Vista da parcela Biodiversidade a partir do carreador, com visualização do fragmento florestal ao fundo.

O manejo cultural foi o mesmo entre as parcelas, semelhante ao normalmente praticado na região, com a aplicação de adubo químico três vezes ao ano (300 g por vez, NPK 14-7-28), pulverização de inseticida (piretróides) nos cachos novos, aplicação com “Lurdinha” de inseticida (carbofuran) nas plantas colhidas, pulverização de fungicidas sistêmicos (triazóis combinados com estrobirulinas, 10 a 12 vezes por ano) nas folhas aplicadas por avião.

4.1.3. Caracterização do fragmento florestal de Mata Atlântica

A parcela biodiversidade apresenta 60% de seu perímetro cercado por um fragmento florestal de Mata Atlântica, pertencente ao Parque Estadual Intervales. A fim de caracterizar a biodiversidade existente no fragmento, foram determinados os índices de diversidade de Shannon e de Simpson (Gliessman, 1998). Para tanto, foram selecionados 5 pontos de coleta, com 1 m² cada um, onde foi feita a coleta de todas as espécies vegetais. Esta análise foi realizada pelo Eng. Agrônomo Fábio Leonardo Tomas e os resultados são encontrados no anexo I do presente trabalho.

4.1.4. Monitoramento das parcelas experimentais

Ao longo de todo o experimento de campo, as parcelas experimentais foram monitoradas em relação a diversos fatores bióticos e abióticos. Primeiro, para avaliar quais desses fatores poderiam ser influenciados pela proximidade com a biodiversidade. Além disso, a caracterização de alguns desses fatores também foi essencial para certificar-se de que a presença do fragmento florestal é realmente a única diferença ambiental entre as parcelas.

4.1.4.1. Solos e nutrição de plantas

Amostras de solo foram coletadas em cada parcela, sendo que cada amostra representa uma mistura de solos coletados em 5 pontos diferentes. A coleta foi realizada pela equipe do Núcleo de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável (NADS) da UEM

(Universidade Estadual de Maringá): prof. Dr. José Ozinal Alves Sena, Eng. Agrônomo Rafael Granzoli Caldas e Maria Dias. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Agroquímica e Meio-Ambiente da UEM (Universidade Estadual de Maringá), onde foram realizadas as análises de macro e micronutrientes, bem como a determinação da classificação textural. Foram utilizados os seguintes extratores: Cloreto de Potássio para Cálcio, Magnésio e Alumínio; Cloreto de Bário a quente para Boro; Acetato de Amônio-Ácido Acético para Enxofre; Mehlich 1 para Fósforo, Potássio, Cobre, Ferro, Manganês, Sódio e Zinco.

As amostras foliares foram coletadas segundo o protocolo da EMBRAPA (Borges, 2004) para amostragem foliar de bananeira. Foram coletadas 5 amostras em cada parcela, sendo que cada amostra representa uma bananeira. Para cada parcela, foi determinado um valor médio (triplicata analítica) para cada elemento analisado. As amostras foliares foram transportadas em sacos de papel acomodados em caixa térmica com gelo até o Laboratório de Agroquímica e Meio-Ambiente, da Universidade Estadual de Maringá, onde foram analisadas. Vale ressaltar que essas amostras foliares foram coletadas com a finalidade de diagnose foliar, a fim de verificar a existência de níveis de deficiência ou toxidez nas parcelas. Durante a colheita de frutos, também foi realizada a coleta de amostras foliares para todas as plantas amostradas, para realização de análises que posteriormente se julgasse necessárias à medida que os resultados fossem sendo obtidos, como o Proteoma da folha, por exemplo (análise descrita no item 5.1.1).

Os teores de Potássio, Magnésio, Cobre, Ferro, Manganês e Zinco foram obtidos nas folhas por espectrometria de absorção atômica em amostra digerida por solução nitro-perclórica. Fósforo e Enxofre total, foram analisados por espectrofotometria UV-Vis em amostra digerida por solução nitro-perclórica. Boro total foi analisado por espectrofotometria UV-Vis em amostra incinerada com extração do Boro mediante o ácido clorídrico e Nitrogênio total, foi analisado por Kjeldahl.

4.1.4.2. Aspectos meteorológicos

A temperatura (°C) e a Umidade Relativa (UR%) das parcelas foram monitoradas durante todo o experimento de campo. Foram instaladas microestações meteorológicas, que captam e armazenam valores de temperatura e umidade relativa a cada hora (figura 6).

A luminosidade foi medida no início do experimento, utilizando um luxímetro (TESTO - 545), com a sonda presa a uma haste e o auxílio de uma escada. Foram realizadas sete medidas acima de cada planta, sendo coletado o valor médio entre elas, calculado pelo próprio aparelho. Foram medidas 5 plantas em cada parcela, em um dia ensolarado, sem a presença de nuvens.

Para estimar a radiação luminosa diariamente ao longo do período do experimento, a radiação global e fotossinteticamente ativa (PAR - *Photosynthetically-active radiation*) foram monitoradas com a instalação de dois sensores: S-LIB-M003 e S-LIA-M003 (*Onset - HOBO® dataloggers*), capazes de medir a intensidade luminosa global e PAR, respectivamente (figura 7). Estes foram instalados em tripé apropriado à altura das bananeiras e acoplados a um *datalogger* associado ao software HOBOWare®.

Figura 6. Monitoramento de temperatura e umidade relativa: captação e armazenamento de temperatura e umidade relativa a cada hora.

sensores (radiação PAR e global)

placa de captação de energia solar

armazenamento de dados
(*datalogger*)

tripé de apoio

Figura 7. Monitoramento da radiação solar (global e PAR) instalados em campo: sensores, armazenamento de dados (*datalogger*), painel solar alojados em tripé de apoio.

4.1.4.3. Severidade de Sigatoka Negra

A avaliação de severidade da Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) foi realizada no dia da antese (momento da marcação da bananeira) e no dia da colheita, de forma a estimar o desenvolvimento da doença ao longo do enchimento dos frutos. Esta avaliação é baseada na estimativa da porcentagem de tecido foliar necrosado de todas as folhas das plantas, a partir de uma escala de aproximação (figura 8) (Stover, 1971, modificado por Gahul, 1993). Embora apenas dois pontos de análise de Sigatoka não sejam aparentemente suficientes para mostrar o desenvolvimento da doença ao longo do enchimento dos frutos, trabalhos anteriores mostram que este desenvolvimento ocorre de maneira linear e proporcional ao tempo que o cacho leva para completar o seu desenvolvimento (Castelan et al., 2013).

Figura 8. Escala de notas utilizada na estimativa de tecido necrosado (Stover, 1971 modificado por Gauhl et al 1993).

Com esta coleta de dados, foi possível determinar os seguintes parâmetros de Sigatoka Negra: evolução da severidade da doença ao longo do enchimento dos frutos e IFSN (Índice de Folhas Sem Necrose), que se refere à porcentagem de folhas que não apresentam necrose. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *Origins 8.0*, em que foi utilizada a seguinte sequência de testes: (1) Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk, $p < 0,05$); (2) Homogeneidade das variâncias (Levene, $p > 0,05$) e (3) ANOVA *one way* (Tukey, $p < 0,05$).

4.1.5. Amostragens

4.1.5.1. Amostras de frutos

O momento da colheita é determinante na qualidade da banana, bem como em seus aspectos bioquímicos e biomoleculares. Para certificar-se que todas as amostras de banana fossem colhidas no mesmo ponto, utilizou-se o conceito de Idade Fisiológica, baseado na somatória de temperaturas médias diárias, subtraídas de uma temperatura base de 14 °C (Ganry e Meyer, 1975). Por isso, as plantas foram selecionadas no momento do florescimento, estágio conhecido como dedos horizontais, momento pelo qual se iniciou a contagem da soma de temperaturas (figura 10). A partir daí, a idade fisiológica do cacho foi estimada somando-se a Temperatura média diária (média aritmética de 24 valores) subtraída de 14 °C (Temperatura base para cv Nanicão), dia após dia, até que a Idade Fisiológica atingisse 915 GD, momento em que foi realizada a colheita. Vale ressaltar que as plantas colhidas em uma mesma data nas duas parcelas também foram marcadas na mesma data.

Figura 10. Momento do florescimento, estágio conhecido como “dedos horizontais” (*horizontal finger flowering stage*), quando a última penca aberta do cacho é a primeira penca a apresentar flores femininas (“dedos grandes” que originam os frutos) juntamente com as masculinas (“dedos pequenos” que não originam frutos e normalmente são retirados da inflorescência).

Ao longo de 21 meses foram realizadas visitas a cada três semanas a fim de selecionar e marcar plantas no momento do florescimento. Aproximadamente 100 plantas foram marcadas em cada parcela, entre de abril de 2012 até dezembro de 2013, de acordo com a disponibilidade de plantas neste estádio nos dias de visita. Diversas colheitas foram realizadas, sempre quando o número de plantas em cada parcela foi igual ou superior a três. Estas foram usadas para otimizações do método de amostragem bem como para coleção de amostras, que deve ter uma quantidade estatisticamente representativa da condição ambiental, ao mesmo tempo com um número de amostras factível de ser armazenado e analisado. Ao final, foram obtidas quatro amostragens consideradas adequadas aos nossos padrões de exigência previamente estabelecidos e já descritos: duas de inverno (repetidas em dois anos subsequentes) e duas de primavera (repetidas no mesmo ano), conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2. Amostragens de campo, repetições e período entre florescimento e colheita

Amostragens	Repetição	Período	PFC (dias)
Inverno	1	8/5/2012 a 9/10/2012	154
	2	26/4/2013 a 22/10/2013	179
Primavera	1	11/09/2012 a 21/12/2012	101
	2	23/10/2012 a 21/01/2013	90

PFC = período entre florescimento e colheita.

A denominação das amostragens de inverno e primavera foram utilizadas para facilitar a descrição das repetições de campo. Embora o PFC possa ultrapassar o período de sua respectiva estação, a nomenclatura foi dada de acordo com a estação predominante durante o PFC.

Para a análise dos frutos, no presente trabalho foram utilizadas as amostras obtidas na amostragem de inverno em anos subsequentes (2012 e 2013), sendo a amostragem de Primavera reservada para o desenvolvimento de outros projetos vinculados a este trabalho. Após a colheita, as amostras foram encaminhadas ao laboratório, onde foi realizado o tratamento fitossanitário (tiabendazol, 250 mg/L, imersão por 4 min, de acordo com Sponholz et al., 2004) e o armazenamento em

câmaras incubadoras tipo B.O.D. (Eletrolab®) a 20 °C para monitoramento do processo natural de amadurecimento. As amostras foram congeladas e armazenadas (Nitrogênio líquido e ultrafreezer a -80 °C) periodicamente, de acordo com variações na produção de etileno endógeno, até o início da senescência dos frutos (figura 11).

Figura 11. Procedimento para a caracterização e obtenção de amostras de polpa de banana ao longo do amadurecimento natural. *análises referentes a outros projetos ligados a este.

4.1.5.2. Amostras de folhas

As amostras de folhas para realização do Proteoma foram obtidas nas mesmas plantas amostradas para a coleta de frutos, logo após a colheita dos mesmos, para que a retirada das folhas não influenciasse o enchimento dos frutos. Foi utilizada a terceira folha da planta (por ordem de emissão) na qual foi retirada uma porção central, como ilustra a figura 12 (Borges, 2004).

Figura 12. Coleta de amostras foliares: Terceira folha por ordem de emissão, região central da folha, descartando-se a nervura central.

Após a coleta das folhas, as amostras foram embaladas separadamente em saco de papel (uma amostra para cada planta) e transportadas para o laboratório em caixa térmica com gelo. No laboratório, as amostras de folha foram lavadas em água corrente, secas com papel toalha, fatiadas e instantaneamente congeladas em Nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.2. Caracterização das amostras

4.2.1. Peso e tamanho dos frutos

Para medir o peso, o diâmetro e o comprimento dos frutos, foram selecionados no primeiro dia após a colheita, três frutos externos centrais de cada uma das duas pencas de cada planta (total 6 frutos por planta). O cuidado de selecionar sempre frutos externos centrais foi tomado para evitar a variação de peso e tamanho dentro de uma mesma penca na comparação entre os tratamentos. O peso foi medido em balança semi-analítica. O diâmetro foi determinado na região central do fruto, utilizando paquímetro digital (*Starrett* série 799). O comprimento foi medido com uma fita métrica, na região interna do fruto, desde a cicatriz do pedúnculo até o umbigo do fruto.

4.2.2. Respiração e produção endógena de etileno

Para determinação da produção de CO_2 e C_2H_4 , três frutos para cada planta eram diariamente selecionados e armazenados em recipientes de vidro (1,4 L)

hermeticamente fechados por aproximadamente 1 h. Esses frascos eram adaptados com septo de borracha para facilitar a coleta de amostra do headspace (1 mL para o CO₂ e 10 mL para o etileno). Os gases foram analisados por cromatografia gasosa (*Hewlett Packard GC- 6890*), equipado com coluna HP-PLOT-Q (30 m x 0,53 mm x 40 µm), acoplado aos detectores de ionização em chama (FID - etileno) e condutividade térmica (TCD – CO₂), utilizando Hélio como gás de arraste. Os resultados foram expressos em µL de etileno.Kg de fruta⁻¹.h⁻¹ e mg de CO₂.Kg de fruta⁻¹.h⁻¹.

4.2.3. Evolução da cor da casca ao longo do amadurecimento

A coloração da casca dos frutos foi medida periodicamente (a cada 2 dias no período pré climatérico e diariamente a partir do disparo do amadurecimento) utilizando um colorímetro Color Quest XE (*HunterLab*®) ligado a um computador equipado com software (*Easy Match QC*). A determinação da coloração de cada fruto foi realizada pela média de seis medidas dos parâmetros L*, a* e b*, seguido do cálculo do ângulo Hue, pela fórmula $^{\circ}h = \tan^{-1}\left(\frac{a^*}{b^*}\right)$

4.2.4. Evolução da firmeza da polpa ao longo do amadurecimento

O decréscimo da firmeza da polpa que ocorre durante o amadurecimento caracteriza o amaciamento do fruto. A firmeza da polpa foi avaliada quase diariamente ao longo do amadurecimento (a cada 2 dias no período pré-climatérico e diariamente a partir do disparo do amadurecimento), utilizando um penetrômetro TA.XT2i (*Stable Micro Systems*®), provido de uma probe cilíndrica (3mm diâmetro), ligado a um computador com software apropriado (*Texture Exponent 32*). Para isso, foi utilizada uma fatia de banana de 1 cm de espessura, onde foram realizadas 3 perfurações em velocidade constante, até a profundidade máxima de 0,6 cm. O resultado foi expresso em Newtons e corresponde à força necessária para que a probe penetre a polpa do fruto.

4.3. Análises Bioquímicas e Biomoleculares

4.3.1. Amido e açúcares solúveis

A determinação de amido foi realizada segundo adaptação da metodologia de Arêas e Lajolo (1981). Aproximadamente 500 mg de polpa de banana (triturada em Nitrogênio líquido e armazenada a -80°C) foi homogeneizada em 4 mL de NaOH (0,5 M), em seguida, neutralizada com ácido acético (0,5 M) e transferida para balão volumétrico de 25 mL, ajustando-se o volume com água destilada. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL desta solução foi utilizada para precipitar o amido com 4 mL de etanol absoluto. Após a centrifugação (12000 *g* por 15 min) e descarte do sobrenadante, o pellet foi cuidadosamente lavado com etanol (80% v/v) duas vezes e o etanol evaporado a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspenso em 1 mL de solução de amiloglicosidase (EC 3.2.1.3, 28 U/mL, pH 4,8) e incubado a 37°C , para realização da hidrólise enzimática. Ao final de 2 h, foi adicionado 100 μL de ácido perclórico para parar a reação (0,6 M). A glicose resultante foi quantificada via sistema glicose oxidase peroxidase – ABTS, utilizando glicose como padrão (Bergmeyer, 1974). Os resultados foram expressos em g/100g de amido na polpa (triplicata analítica).

Os açúcares solúveis foram extraídos a partir de 100 mg da polpa da banana, utilizando 0,5 mL de etanol (80% v/v) sob agitação (450 rpm) a quente (80°C) durante 15 min, seguida de centrifugação (10000 rpm por 15 min). Este processo foi repetido três vezes, os sobrenadantes recolhidos em balão volumétrico e o volume ajustado para 2 mL com etanol (80% v/v). Uma alíquota de 1 mL deste extrato teve seu conteúdo de etanol evaporado em sistema *speedvac* e o volume reconstituído com água deionizada. Os açúcares solúveis foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (*Dionex-DX500* equipado com coluna Carbowax PA1, ambos da *Thermo Scientific*®), utilizando um detector de pulso amperométrico, em corrida isocrática com fluxo de 1 mL/min de NaOH (18 mM).

4.3.2. Compostos fenólicos solúveis totais

Os compostos fenólicos foram determinados segundo o protocolo de Swain e Hills (1959), utilizando água destilada, homogeneização em turrax e o reagente Folin-

Ciocalteu, seguido de banho-maria (37 °C / 30 min), adição de solução saturada de Na₂CO₃ (mesma proporção do reagente de Folin-Ciocalteu) e leitura em espectrofotômetro (765 nm), usando curva padrão de ácido gálico em metanol.

4.3.3. Proteoma

A análise do Proteoma foi realizada pela *facility* do CEFAP (Centro de Facilidades de Apoio a Pesquisa), laboratório vinculado ao Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-USP). Os extratos proteicos foram encaminhados ao laboratório do CEFAP, localizado no ICB IV (Instituto de Ciências Biomédicas, prédio IV), no campus da capital. Neste laboratório, foram realizadas as etapas de quantificação, digestão, purificação, sequenciamento e identificação das proteínas.

4.3.3.1. Extração das proteínas e remoção dos detergentes

A extração das proteínas foi realizada em fenol, utilizando protocolo baseado na metodologia de Carpentier et al., (2005), com modificações. À polpa de banana (1 g) pulverizada com o auxílio de nitrogênio líquido, em almofariz, foi adicionado 5 mL de tampão de extração gelado (50 mM de Tris-HCl pH 8,5; 5 mM de EDTA; 100 mM de KCl, 30% de sacarose; adicionados de 1% de benzamidina e 1% de DTT na hora do uso). Após agitação por 30 s em vórtex, foi adicionado de 5 mL de Fenol tamponado com Tris-HCl pH 8 (Sigma), agitado por 15 min a 4°C, e centrifugado a 6000 g, por 15 min a 4 °C. Após a centrifugação, a fase fenólica (superior) foi coletada e transferida para um novo tubo. Após dois ciclos de extração, a solução fenólica contendo as proteínas foi precipitada overnight, a -20 °C, com a adição de 25 mL de etanol com 100 mM de acetato de amônio (Sigma). Posteriormente, foi centrifugada (16.000 g, por 30 min, a 4 °C), e os sobrenadantes foram descartados. O precipitado foi lavado com acetona gelada com 0,2% DTT e seco em capela por 30 min. O precipitado seco foi ressuspensão em 1 mL de tampão de ressuspensão (7M de uréia, 2M de tiouréia, 0,4% de Triton X-100 e 1% de DTT) a temperatura ambiente. após a remoção dos detergentes, realizadas, de acordo com a recomendação da própria facility.

4.3.3.2. Remoção de detergentes, digestão, e purificação dos extratos

A remoção de detergentes foi realizada com adição de 10 mM de NaCl em acetona a -20 °C overnight, seguido de centrifugação (15 min a 15000 g). Os extratos foram quantificados com auxílio do kit BCA Protein Assay Kit – Pierce (Thermo Scientific®). Após a precipitação das proteínas (1 M NH_4HCO_3), estas foram ressuspensas (8 M ureia, 100 mM NH_4HCO_3 , 1 M DTT) e incubadas sob agitação (100 rpm) a 56 °C por 30 min. Após resfriamento da amostra, foi adicionado 5 μL de Iodoacetamida (200 mM) e mantido por mais 30 min a temperatura ambiente, no escuro. Posteriormente, foi adicionado 2 μL DTT (1 M) e 90 μL de tampão para digestão (50 mM NH_4HCO_3 , 10% acetonitrila), seguido do tampão de tripsina (1:50). A reação ocorreu durante 16 h a 37 °C e foi interrompida pela adição de ácido fórmico (10%) até pH 3. A dessalinização foi realizada com zip-tip (Milipore), de acordo com as informações do fabricante.

4.3.3.3. Sequenciamento e identificação das proteínas.

Os extratos dessalinizados (10 μL) foram injetados em um EASY-nLC (Cromatografia Líquida), equipado com duas colunas EASY Column (analítica: 10cm, ID75 μm , 3 μm , C18, Thermo Scientific; trap: 2cm, ID100 μm , 5 μm , C18, -Thermo Scientific) acoplado a espectrômetro de massas LTQ-Orbitrap - Velos (Thermo Scientific). Os peptídeos foram eluídos usando um gradiente linear 0 – 60% de tampão B (0,1% acetonitrila em ácido fórmico) a um fluxo de 300 nL/min. O equipamento foi operado em modo de aquisição DDA (data acquisition mode), com 2,9 kV de polaridade positiva e 1,5 kV de negativa e os espectros foram obtidos a 35 eV de energia de colisão. Os 20 íons precursores mais intensos foram selecionados pela fragmentação pelo CID (Collision Induced Dissociation). As proteínas foram estimadas com base na área abaixo da curva (AUC) do íon precursor, calculado pelo software Proteome Discoverer 1.3, através do algoritmo SEQUEST (Thermo Fisher), utilizando módulo de detecção definido em 20 ppm e um filtro *peptide confidence*, com uma taxa de falso positivo (FDR, *false discovery rate*) de 1%. As proteínas consideradas para análise tinham, no mínimo, 3 peptídeos identificados e detecção em, pelo menos, três (das quatro) replicatas biológicas. A abundância das proteínas foi normalizada por meio da divisão pela mediana das abundâncias de cada replicata biológica.

4.3.3.4. Análise Estatística

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para cada uma das proteínas consideradas confiáveis. Ao final desta etapa, obteve-se quatro grupos de proteínas: (1) exclusivas Controle - proteína identificada em apenas uma ou nenhuma das replicatas das amostras Biodiversidade e em, pelo menos três, das replicatas biológicas do Controle; (2) exclusivas Biodiversidade proteína identificada em apenas uma ou nenhuma das replicatas das amostras Controle e em, pelo menos três, das replicatas biológicas do Biodiversidade); (3) proteínas com abundância significativamente diferente entre as amostras ($p < 0,05$); proteínas com abundância diferente, mas não significativa - selecionadas pela razão C/B (foldchange). A razão C/B (foldchange) foi calculado pela divisão da média da abundância da proteína na quadruplicata do tratamento Controle pela média no tratamento Biodiversidade. Foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA), segundo o coeficiente de correlação de Pearson, utilizando a abundância normalizada das proteínas significativas ($p < 0,05$), sendo a estimativa dos dados faltantes dada pelo vizinho mais próximo. Todos os métodos estatísticos empregados foram realizadas com auxílio do XLStat, versão 2014.5.01.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das parcelas experimentais

5.1.1. Características edáficas e nutricionais do cultivo

Um dos controles realizados para assegurar que as possíveis diferenças encontradas nos frutos oriundos dessas parcelas seriam decorrentes somente da presença ou ausência da biodiversidade no entorno, foi a análise do solo e a diagnose foliar das plantas. Inicialmente, é possível afirmar que as duas parcelas estão inseridas em um Latossolo Amarelo Distrófico, frequentemente encontrado no Vale do Ribeira (Teixeira, Zambrosi e Neto, 2007; Teixeira, Rajj e Neto, 2008; Miranda et al., 2009). Além disso, ambas parcelas possuem solos com a mesma classificação textural: à profundidade de 0-20 cm, ambas parcelas possuem textura franco-argilo-siltosa, bem como o horizonte B de textura franca.

Posteriormente, foram realizadas análises de solo e foliares com a finalidade de verificar se as parcelas experimentais também eram semelhantes em relação à disponibilidade de nutrientes no solo e ao estado nutricional das plantas.

Em relação ao teor de nutrientes nas folhas, não foram encontradas diferenças entre as parcelas, para nenhum nutriente analisado. Para verificar se existe possibilidade de deficiência ou toxidez de algum elemento, foram utilizadas duas publicações para comparação: um comunicado técnico da EMBRAPA, que mostra as faixas adequadas de nutrientes foliares para a bananeira (Borges e Oliveira, 2006) e uma publicação que mostra o teor médio de nutrientes no tecido foliar de bananais de alta e baixa produtividade no estado de São Paulo, para cultivares do subgrupo Cavendish (Teixeira, Zambrosi e Neto, 2007).

Após a comparação entre os teores de nutrientes foliares obtidos e o esperado segundo as publicações citadas, observa-se que todos os nutrientes apresentam concentrações dentro das faixas esperadas. Exceto o Boro (B) e o Ferro (Fe). No caso do B, teores acima de 30 g/kg podem ser considerados tóxicos nas plantas com cachos já emitidos (Borges e Oliveira, 2006), concentração próxima às encontradas nas parcelas experimentais (31,44 e 28,75 mg/kg, para Biodiversidade e Controle, respectivamente).

Porém, como as amostras foliares foram coletadas no momento da emissão do pendão (antes da abertura das flores/pencas), acredita-se que após a emissão completa dos cachos, os teores de B devem ser menores, já que a deficiência deste nutriente causa o atrofiamento dos mesmos (Borges e Oliveira, 2006), indicando a importância deste elemento durante o processo de formação do cacho. No caso do Fe, este elemento apresenta-se um pouco abaixo do mínimo das faixas adequadas para o cultivo, que é 80 mg/kg (Borges e Oliveira, 2006) e o encontrado nas parcelas foi 48,8 e 68,3 (para Biodiversidade e Controle, respectivamente – tabela 3). Porém, além dos valores estarem relativamente próximos do mínimo, os teores de Fe no solo são considerados baixos para o cultivo da bananeira quando inferiores a 18 mg/dm³ (Borges e Oliveira, 2006) e a análise de solo das parcelas (tabela 3) mostrou que este nutriente está superior a esta marca (ao redor de 160 para ambas parcelas).

Em relação à quantidade de nutrientes encontradas no solo das parcelas experimentais, algumas observações devem ser feitas. O Potássio (K) apresenta-se em concentração três vezes maior na parcela Biodiversidade, à profundidade 0-20 cm (Tabela 3). No entanto, esta diferença não é observada no estado nutricional das plantas, na medida que o teor de K nas folhas é semelhante entre as parcelas (tabela 4). Outro macronutriente também foi encontrado em quantidades superiores (2X) na parcela Biodiversidade, em relação a Controle: o Fósforo (P). Apesar disso, este elemento foi encontrado em quantidades semelhantes nas análises foliares das duas parcelas (tabela 4) e acima do nível normalmente encontrado nos bananais paulistas (Teixeira, Zambrosi e Neto, 2007). Isto pode indicar limitações na extração do P nas análises de solo, já que este nutriente apresenta grandes variações de acordo com o método de extração empregado (Schlindwein, 2003; Miranda et al., 2002), além de ser um nutriente normalmente não limitante no Vale do Ribeira e o menos demandado nas formulações de adubo para bananais desta região. Além disso, a análise de solo (tabela 3) evidenciou diferenças entre as duas parcelas nos teores de dois micronutrientes: Manganês (Mn) e Zinco (Zn). No entanto, a análise foliar mostrou concentrações semelhantes entre as parcelas, além de valores dentro dos padrões encontrados para estes nutrientes (Teixeira, Zembroni e Neto, 2007), indicando que a diferença encontrada no solo não foi refletida no estado nutricional do cultivo. É importante

salientar a limitação na comparação entre nutrientes realizada aqui, já que uma única análise de solo (coletado em 5 pontos diferentes) foi realizada em cada parcela, nos moldes da análise de solo para fins de fertilidade, representando o estado nutricional médio a que as plantas estão submetidas. Por esta razão, não foi empregado nenhum teste estatístico nesses dados. Isso explica, pelo menos em parte, a diferença encontrada para os nutrientes P, K, Mn e Zn na análise de solo e não apontada pela diagnose nutricional.

Vale ressaltar que o diagnóstico foliar baseado na avaliação de níveis críticos de elementos separadamente requer cuidado, pois possíveis variações de ambiente (Teixeira, Zambrosi e Neto, 2007) e interação entre nutrientes (Borges, 2004) são ignoradas, sendo que atualmente, critérios mais especializados para diagnose foliar foram desenvolvidos, como as normas DRIS, nas quais são utilizadas relações entre as concentrações dos nutrientes para interpretar os resultados da análise (Teixeira, Zambrosi e Neto, 2007). Como o propósito dessas análises é de exclusivamente evidenciar possíveis diferenças entre as parcelas, acreditamos que a avaliação do nível crítico seja suficiente.

Tabela 3. Análise de solo de macro e micronutrientes das parcelas Biodiversidade e Controle

cmol dm ⁻³					mg dm ⁻³	g dm ⁻³	pH		profundidade de amostragem	
	H ⁺ + Al ³⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	P	C	H ₂ O	CaCl ₂	
Biodiversidade	2,65	0,00	6,00	2,17	0,62	5,47	14,22	5,84	5,41	0-20 cm
Controle	2,61	0,00	5,66	2,05	0,23	2,53	10,51	6,05	5,86	
Biodiversidade	2,79	0,80	2,50	1,03	0,21	2,37	7,20	5,48	4,81	20-40 cm
Controle	2,95	0,55	1,65	1,00	0,10	2,00	5,25	5,86	5,10	
mg dm ⁻³										
	Fe	Cu	Mn	Zn	B	S				
Biodiversidade	155,50	7,29	15,79	1,89	0,60	25,52	0-20 cm			
Controle	167,10	5,63	126,50	5,82	0,53	33,05				
Biodiversidade	218,20	4,68	72,39	1,68	0,41	44,38	20-40 cm			
Controle	223,60	2,85	49,16	1,71	0,68	105,76				

Tabela 4. Análise Foliar realizada nas plantas das parcelas Biodiversidade e Controle

g kg⁻¹						
	Mg	Ca	K	N	P	S
Biodiversidade	3,48 ± 0,36	6,57 ± 4,18	25,03 ± 4,49	24,6 ± 2	11,92 ± 2,05	11,57 ± 6,81
Controle	3,52 ± 1,23	11,05 ± 4,36	23,87 ± 2,11	30,17 ± 3,47	10,04 ± 1,18	10,27 ± 4,23
mg kg⁻¹						
	Fe	Cu	Mn	Zn	B	
Biodiversidade	48,83 ± 7,53	8,4 ± 2,52	579,4 ± 248,34	11,03 ± 1,85	31,44 ± 2,38	
Controle	68,73 ± 15,11	9,6 ± 3,58	622,1 ± 251,49	10,23 ± 2,12	28,75 ± 3,62	

Não houve diferença significativa (p<0,05) entre as amostras Biodiversidade e Controle para nenhum nutriente analisado.

Assim, é possível afirmar que as parcelas selecionadas para o presente estudo não apresentam diferenças expressivas no que diz respeito ao solo e ao estado nutricional do cultivo, sendo que as possíveis diferenças encontradas nos frutos oriundos dessas parcelas não devem ser decorrentes das diferenças nutricionais do solo.

5.1.2. Características climáticas

A avaliação das características climáticas das parcelas experimentais é determinante para se inferir sobre o efeito potencial da biodiversidade no entorno sobre o microclima do cultivo. Como a temperatura, a umidade e a radiação fotossinteticamente ativa (PAR) são fatores cruciais, principalmente, na fisiologia do cultivo e na disseminação de doenças como a Sigatoka Negra, estes fatores foram monitorados ao longo do experimento.

Para isso, foram instaladas sondas de captação de temperatura e umidade no interior das parcelas experimentais, que captam e armazenam valores a cada hora. A figura 13 mostra o comportamento da temperatura das sondas instaladas nas parcelas experimentais. A partir desses valores, foi calculada a média da temperatura e da umidade relativa durante cada estação do ano, ao longo de um ano durante o experimento (tabela 5).

Figura 13. Temperatura medida a cada hora nas parcelas Biodiversidade (verde) e Controle (vermelho) ao longo de um ano (2012/2013), para cada estação do ano.

Tabela 5. Comparação das médias de temperatura e umidade por estação do ano

		Temperatura (°C)	Umidade (%)
Primavera	Biodiversidade	23,0 ± 4,8	90,2 ± 15,0
	Controle	23,1 ± 5,0	88,8 ± 15,6
Verão	Biodiversidade	24,6 ± 3,8	93,9 ± 11,5
	Controle	24,8 ± 4,0	92,5 ± 13,1
Outono	Biodiversidade	20,8 ± 4,0	94,4 ± 11,7
	Controle	20,9 ± 4,0	93,7 ± 12,3
Inverno	Biodiversidade	18,0 ± 5,1	93,9 ± 13,5
	Controle	18,0 ± 5,1	93,3 ± 14,0

Valores correspondem a média ± desvio padrão dos valores médios diários para cada período

A luminosidade também foi estimada de duas maneiras diferentes: (1) no início do experimento, foram realizadas inúmeras medidas acima de algumas bananeiras de cada parcela. A luminosidade incidente nas bananeiras de ambas parcelas foi semelhante quanto a sua intensidade, analisada com um luxímetro. Este resultado é fruto de um dia de análise somente, porém as medidas coletadas nas duas parcelas foram próximas a 50 mil lux, variando entre 40 e 55 mil lux. No dia da análise o dia estava ensolarado, sem a presença de nuvens.

Além disso, durante a condução do experimento, foram instalados sensores de radiação PAR e global nas duas parcelas. A intenção desses sensores é estimar de maneira contínua a luminosidade das parcelas, visando encontrar diferenças, por exemplo, em uma possível ocorrência de sombra ocasionada pelo fragmento florestal em algum momento do dia. Dessa forma, um dia para cada estação do ano foi selecionado para avaliação da radiação solar incidente nas parcelas (figura 14). Os dados de radiação global completos para as quatro estações do ano se encontram no anexo I deste material.

Figura 14. Radiação global e PAR (*Photossintetically Active Radiation*) incidente nas parcelas Biodiversidade (verde) e Controle (vermelho) referente a um dia de cada estação do ano.

A variação existente ao longo do dia é consequência da ocorrência de nuvens e pode variar minimamente entre as parcelas. No entanto, fica claro que não há ocorrência de sombra na parcela Biodiversidade, já que o sol nascente e poente ocorre

concomitantemente nas duas parcelas e estes seriam momentos críticos em que poderia haver sombreamento por parte do fragmento florestal.

Assim, em relação às condições climáticas, especificamente temperatura, umidade e radiação PAR, não foi observada qualquer diferença entre as parcelas. Ainda que a presença de um fragmento florestal e, a biodiversidade propriamente dita, possam inferir no cultivo através de alterações no microclima, o objetivo aqui é avaliar a interação da biodiversidade com o cultivo, o que seria dificultado por uma alteração muito brusca no microclima. O efeito de uma ocorrência de sombreamento, por exemplo, seria específico para a geografia das parcelas em questão, não sendo representado em outras localidades.

5.1.3. Severidade de Sigatoka Negra

É esperado que a presença do fragmento florestal tenha efeitos benéficos no que se refere a ocorrência de pragas e doenças, em decorrência dos serviços ecossistêmicos prestados pela biodiversidade. Em relação às pragas, o aumento da biodiversidade vegetal no entorno do cultivo deve aumentar a diversidade de insetos herbívoros que, por sua vez, influencia a diversidade de insetos predadores e parasitóides, entre os quais estão os inimigos naturais de pragas de cultivos agrícolas (Alltieri, Silva e Nicchols, 2003). Já em relação à Sigatoka Negra, como o principal meio de disseminação desta doença são esporos carregados pelo vento (Meredith, 1970; Stover, 1980), espera-se que a presença do componente florestal represente uma diminuição na fonte de inóculo a ser dispersado, já que a parcela Controle encontra-se rodeada por monocultivo de banana em 100% de seu perímetro.

A Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) representa um dos principais problemas fitossanitários do cultivo da bananeira no Brasil, sendo esta uma doença fúngica que ataca as folhas, mas apresenta danos indiretos relacionados à qualidade da banana: (1) encurtamento da vida verde (Castelan et al., 2012; Chillet et al., 2009); (2) alteração da coloração da polpa (Chillet et al., 2014), (3) aumento da sensibilidade à podridão de coroa (Ewané et al., 2012); (4) desarranjo no metabolismo de carboidratos e reguladores vegetais (Saraiva et al., 2013).

De modo geral, as plantas localizadas na parcela rodeada de monocultivo (Controle) apresentaram maior nível de severidade de Sigatoka Negra tanto no florescimento quanto na colheita, sendo esta diferença acentuada após o período de enchimento dos frutos (figura 14). Isto já era esperado, pois no momento da emissão do cacho da bananeira, a emissão de folhas é cessada, sendo os fotoassimilados mobilizados para o enchimento dos frutos. Em consequência disso, a renovação das folhas é interrompida, sendo que as folhas existentes na planta no momento do florescimento, são as mesmas que estarão na hora da colheita, ficando expostas à infecção da Sigatoka durante todo o período de enchimento. Por isso, o índice de severidade medido no momento da colheita é sempre maior que no momento da floração.

Para avaliar se o efeito da biodiversidade na diminuição da severidade de Sigatoka Negra foi significativo, as plantas das amostragens de inverno e primavera foram agrupadas por repetições de campo, a fim de minimizar as variações decorrentes de variações climáticas (figura 15). Os resultados indicam que as plantas da parcela controle apresentam maior severidade de Sigatoka Negra em todas as repetições de campo, tanto no momento do florescimento, quanto da colheita. No entanto, essa diferença só foi significativa no momento da colheita, quando a diferença entre as parcelas foi maior.

Figura 15. Índice de Severidade de Sigatoka Negra (IS) medido no momento do florescimento (A) e da colheita (B) nas plantas da parcela Biodiversidade (verde) e Controle (vermelho). Barras correspondem ao erro padrão (n=5 ou 6); *a* e *b* representam diferenças significativas entre as amostras, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

A presença do componente florestal no entorno da parcela cultivada diminuiu significativamente a pressão de Sigatoka Negra nas plantas. A partir daí, faz-se necessária a avaliação de quais fatores relacionados à presença da biodiversidade devem estar influenciando na severidade desta doença. Além disso, é possível observar uma maior uniformidade na severidade das plantas da parcela Biodiversidade, que possui índices muito semelhantes entre as repetições da amostragem de inverno (1 e 2) e primavera (3 e 4), mesmo que tenham sido realizadas em anos subsequentes, como é o caso da amostragem de inverno.

Nos trabalhos que mostram um efeito positivo de Sistemas Agroflorestais na redução da infecção de S. Negra, este efeito é normalmente atribuído à diminuição da luminosidade no sistema, característica do sistema agroflorestal, que desfavorece a condição ambiental apropriada para o desenvolvimento do fungo (Favreto et al., 2007; Vivan, 2002; Garcez e Rosa, 2007). Embora neste ensaio a presença da biodiversidade ocorra no entorno e não no interior da parcela, seria possível argumentar acerca da influência na luminosidade incidente na parcela, não necessariamente na intensidade (como nos SAFs), mas na quantidade de horas de insolação, provocado por um possível sombreamento desta parcela. Por isso, a confirmação da ausência deste efeito, adquirida com os sensores de radiação global e PAR foi importante para descartar esta hipótese. Isso porque a luz tem influência chave na ação da Sigatoka Negra, pois sua

toxina (cercosporina) tem efeito fotossensibilizador, cuja propriedade é a ativação da toxina através da exposição à luz (Daub e Ehrenshaft, 2000). Dessa forma, a luz seria a primeira especulação a ser feita, como um efeito da biodiversidade possível de reduzir o impacto da Sigatoka Negra.

Uma outra explicação também está relacionada à disseminação do fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. A dispersão deste fungo começa pela liberação dos ascósporos na região da necrose, os quais são transportados pelo vento para tecido foliar sadio onde reiniciam o processo de infecção (Meredith, 1970; Stover, 1980; Craenem, 1998). Neste sentido, os 200 m de raio de monocultivo de banana representam grande fonte de inócuo para a parcela Controle. Além disso, a vegetação presente ao redor da parcela Biodiversidade pode funcionar como um quebra-vento, diminuindo o principal fator ambiental responsável pelo transporte dos ascósporos e disseminação da doença: o vento (Churchill, 2011; Crainem, 1998; Stover, 1980).

O presente estudo não permitirá definir quais, dos fatores mencionados, são individualmente importantes redutores da pressão da Sigatoka Negra e a relevância de cada um. Até porque, possivelmente, este efeito decorre de um conjunto de fatores, os quais são exteriores ao foco deste trabalho: a avaliação do fruto. No entanto, este trabalho deve contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares do fruto que podem ser influenciados por este conjunto de fatores, como reflexo da resposta da planta, podendo contribuir na identificação das vias metabólicas que podem ser alteradas por esta condição ambiental.

5.2. Caracterização das amostras

5.2.1. Tamanho, produção de etileno e vida verde

O tamanho é um importante atributo da banana na medida em que é utilizado para classificação dos frutos na CEAGESP, como é o caso do comprimento. A proximidade da floresta com o agroecossistema parece não influenciar o peso, o diâmetro e o comprimento dos frutos (tabela 6).

Tabela 6. Diâmetro, comprimento e peso dos frutos por amostragem de campo

	Primavera		Inverno	
	Controle	Biodiversidade	Controle	Biodiversidade
Diâmetro (mm)	38,8 ± 4,1	38,3 ± 3,9	35,4 ± 2,3	36,2 ± 1,3
Comprimento (cm)	17,4 ± 1,0	17,1 ± 1,5	15,4 ± 0,7	15,6 ± 1,1
Peso (g)	182,8 ± 21,9	176,1 ± 19,7	176,4 ± 29,2	167,1 ± 23,5

Valores correspondem à média ± desvio padrão (n=5 ou 6)

Além do tamanho, a disponibilidade de tempo para transporte e comercialização do fruto representa outro importante atributo de qualidade. Este parâmetro é medido através da vida verde, que representa o número de dias entre a colheita e o início do amadurecimento natural do fruto que, neste trabalho, foi determinado pelo aumento da produção endógena de etileno. O etileno é conhecido por participar de muitos processos biológicos em plantas, que incluem o amadurecimento de frutos, abscisão, senescência e respostas a estresses bióticos e abióticos (Khan et al., 2006).

O amadurecimento de frutos se refere ao processo ao qual os frutos se tornam atrativos ao consumo, este ocorre entre o final do desenvolvimento e o início da senescência do fruto e seu início é sinalizado pelo etileno, que dispara irreversivelmente diversas modificações bioquímicas que culminam na conversão de amido em açúcares, modificações no pH, desenvolvimento de aroma, degradação da clorofila, síntese de carotenoides e flavonoides, bem como o amaciamento do fruto (Nath et al., 2006).

Neste estudo, todas as frutas colhidas foram monitoradas diariamente e individualmente: cada amostra se refere a uma planta. Esta análise é importante para avaliar o momento do disparo do etileno e para avaliar possíveis diferenças decorrentes do entorno com a floresta, já que este é um hormônio chave para os frutos climatéricos. Assim, a figura 16 mostra o comportamento da respiração e da produção de etileno durante o período pré-climatérico, climatérico e pós-climatérico dos frutos de cada planta colhida na repetição 1 da amostragem de inverno. Já a figura 17 mostra a aparência dos frutos ao longo do amadurecimento. É possível afirmar que frutos de diferentes plantas colhidos nas parcelas Biodiversidade e Controle apresentaram uma marcada diferença no padrão temporal da produção de etileno, sendo os frutos da parcela Controle os mais precoces no disparo da produção deste hormônio.

Para avaliar se esta diferença no padrão da produção de etileno foi significativa, o dia do disparo na produção de etileno, atribuído ao dia que a produção de etileno supera a concentração de $1 \mu\text{L}$ de etileno. $\text{Kg fruta}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Castelan et al., 2012) bem como a produção máxima de etileno durante o amadurecimento foram reunidos na tabela 7. Além disso, nesse contexto se define a vida verde, caracterizada pelo número de dias existentes entre a colheita e o início do amadurecimento natural do fruto (Peacock e Blake, 1970), parâmetro determinante na disponibilidade de tempo para o transporte do fruto para que este alcance o mercado ainda verde (tabela 7).

É notável que a vida verde foi significativamente superior nos frutos da parcela Biodiversidade, sendo aproximadamente 40% maior, em ambas repetições da amostragem de inverno. Além disso, somente na segunda repetição, a produção máxima de etileno foi significativamente superior para os frutos da parcela Controle. Poderia ser levantada a hipótese de que a maior infestação de Sigatoka Negra nas plantas da parcela Controle seriam o fator causador da menor vida verde encontrada nos frutos desta parcela, já que a Sigatoka Negra foi fator causador de redução da vida verde de bananas produzidas nesta região (Castelan et al., 2012). No entanto, neste artigo, foram comparadas parcelas sem controle de Sigatoka Negra (SI aprox. 70% na colheita) com parcelas controladas (SI = 34% na colheita), ou seja, uma diferença de severidade de doença muito maior do que a encontrada aqui (27 x 49% nas parcelas Biodiversidade e Controle, respectivamente). A comparação entre a severidade de doença no trabalho citado e a encontrada neste estudo deve ser feita com cuidado, pois no artigo, as plantas foram colhidas com 700 GD, ou seja, 200 GD antes das plantas deste estudo. Isso indica que o estado fitossanitário das plantas do artigo eram ainda mais severos do que as das plantas avaliadas aqui, embora a diferença observada na vida verde seja similar. No presente estudo, é evidente que a Sigatoka pode ter contribuído para esta redução, mas é provável que outro mecanismo metabólico também esteja influenciando este “atraso” no amadurecimento, principalmente pelas evidências descritas mais adiante.

Figura 16. Respiração (linhas vermelhas) e produção de etileno (linhas azuis) das bananas ao longo do amadurecimento. Etileno foi medido em $\mu\text{L.Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e Respiração em $\text{mg CO}_2. \text{Kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Cada gráfico representa o comportamento pós-colheita de frutos de uma planta da primeira repetição de inverno.

Tabela 7. Vida verde, produção máxima e dia do pico de etileno

		Vida verde	Etileno máximo	Dia do pico
Rep. 1	Controle	$7,3 \pm 2,1 *$	$2,8 \pm 0,8$	$9,8 \pm 1,1 *$
	Biodiversidade	$12,5 \pm 1,0$	$3,25 \pm 0,9$	$16,0 \pm 1,7$
Rep. 2	Controle	$10,8 \pm 2,0 *$	$5,0 \pm 0,5 *$	$13,4 \pm 2,2 *$
	Biodiversidade	$17,6 \pm 0,9$	$2,9 \pm 0,6$	$18,8 \pm 1,1$

Dados referentes às duas repetições da amostragem de inverno e correspondem a média $\pm$ desvio padrão ($n = 5$ ou 6); * representam diferenças significativas entre os tratamentos (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

Figura 17. Modificações na aparência dos frutos das parcelas Biodiversidade e Controle ao longo do amadurecimento. A escala branca corresponde a 10 cm.

5.2.2. Evolução da coloração da casca e amaciamento da polpa

As mudanças que ocorrem na cor da casca e na firmeza da polpa são marcantes na qualidade final do fruto e representam eventos bioquímicos importantes regulados durante o amadurecimento. A perda de firmeza ou o amaciamento do fruto é um dos processos do amadurecimento mais estudados, já que o descontrole deste processo pode gerar grandes perdas na pós-colheita de frutos. Esta normalmente é associada à desestruturação de componentes da parede celular, entre os principais, pectina, celulose e hemicelulose, localizados em uma matriz de glicanos e glicoproteínas (Nath et al., 2006). No caso da banana, este processo parece estar mais intimamente correlacionado à degradação do amido em açúcares solúveis, do que em mudanças na parede celular, embora esta não se possa ser descartada a neste processo (Shiga et al., 2011).

No presente estudo, a firmeza da polpa foi monitorada diariamente em frutos de todas as plantas avaliadas, na segunda repetição da amostragem de inverno (figuras 19 e 20). Os resultados indicam que os frutos oriundos da parcela Controle perderam firmeza na polpa precocemente em relação aos frutos da Biodiversidade. Estes resultados corroboram o perfil de etileno, que evidencia a mesma diferença temporal entre os grupos. Isto já era esperado, já que este processo também é regulado pelo disparo no etileno.

Figura 19. Evolução da coloração da casca pela estimativa do ângulo Hue (°) durante o amadurecimento das bananas das parcelas Biodiversidade e Controle. Cada gráfico representa o comportamento pós-colheita de frutos de uma planta da primeira repetição de inverno

Figura 20. Firmeza da polpa durante o amadurecimento dos frutos dos grupos Controle e Biodiversidade. Cada gráfico representa o comportamento pós-colheita de frutos de uma planta da primeira repetição de inverno

5.3. Análises Bioquímicas e Biomoleculares

5.3.1. Metabolismo de Carboidratos

Outro importante evento que ocorre durante o amadurecimento da banana e está diretamente associado a diferentes atributos de qualidade do fruto é a degradação de amido em açúcares solúveis. Este é determinante no adoçamento da fruta madura, bem como no amaciamento da polpa (Seymour, 1996; Shiga et al., 2011). A mesma

diferença temporal existente no disparo dos eventos do amadurecimento foi, evidentemente, observada também no perfil de carboidratos (figura 21). Além disso, outra questão fica evidente: a maior sincronia e homogeneidade nos perfis de degradação de amido e síntese de açúcares solúveis, que também foi observado no perfil respiratório do fruto e na infestação de Sigatoka Negra das plantas.

Figura 21. Perfil de degradação de amido (linhas vermelhas) e síntese de açúcares solúveis (linhas azuis) da repetição 1 da amostragem de inverno. Amido e açúcares solúveis foram medidos em g/100 g. Cada gráfico representa o comportamento pós-colheita de frutos de uma planta da primeira repetição de inverno

5.3.2 Compostos fenólicos totais na polpa, casca do fruto e folhas da planta

Os compostos fenólicos solúveis totais (FST) foram determinados na polpa e na casca dos frutos obtidos em ambas parcelas, uma vez que estes compostos são normalmente associados a defesa vegetal. Os resultados indicam não haver diferenças significativas no teor de FST na casca e na polpa entre os tratamentos, embora tenha sido observado um teor 27% maior de FST na polpa das frutas produzidas próxima ao fragmento florestal (tabela 8).

Tabela 8. Compostos fenólicos solúveis totais

	Polpa	Casca
Controle	0,37 ± 0,08	0,45 ± 0,10
Biodiversidade	0,47 ± 0,17	0,46 ± 0,15

Dados referentes à segunda repetição da amostragem de inverno e representam a média ± desvio padrão (n=5). Fenólicos foram medidos em mg/g.

Castro-Alves (2014) analisou os teores de FST nas folhas das bananeiras amostradas neste experimento de campo (repetição 1 de inverno). Foi encontrado um teor de FST significativamente maior (aproximadamente 50%) nas folhas das bananeiras próximas ao fragmento florestal, o qual foi relacionado, entre outras coisas, à resposta da planta a uma diferente população de insetos, microorganismos e outros organismos associados a proximidade com o fragmento florestal, que podem induzir diferentes mecanismos de defesa nas bananeiras, refletindo na composição de fenólicos das folhas.

5.3.3. Proteoma da polpa da banana

5.3.3.1. Identificação de proteínas relevantes

Foram identificadas 1936 proteínas, das quais 822 foram consideradas confiáveis (exclusão descrita no item 5.4.3). Deste total de proteínas consideradas confiáveis, 12 são exclusivas do grupo controle, 30 são exclusivas do grupo biodiversidade e 817 são comuns aos dois grupos, dentre as últimas, 38 proteínas tiveram a expressão significativamente diferente entre os grupos ($p < 0,05$) (figura 22).

Figura 22. Diagrama de Venn demonstrando a distribuição das proteínas identificadas na análise. Do total de 822 proteínas, 12 são exclusivas ao grupo controle e 7 exclusivas ao Biodiversidade. Das proteínas comuns aos dois grupos, 32 apresentaram diferença significativa na expressão entre os grupos ($p < 0,05$).

Visando identificar diferenças entre os proteomas das amostras dos grupos Biodiversidade e Controle, a abundância normalizada das proteínas diferentemente expressas foi utilizada como variáveis em uma Análise de Componentes Principais (PCA), baseada no coeficiente de correlação de Pearson (figura 23). Nesta análise, as duas componentes principais juntas (F1 e F2) explicaram 73% da variação entre as amostras. O gráfico mostra claramente que a componente F1, responsável por quase 63% da variabilidade entre as amostras, separou completamente as amostras do grupo Controle e Biodiversidade.

Figura 23. Análise de componentes principais (Pearson) das proteínas diferentemente expressas entre amostras das parcelas Biodiversidade (verde) e Controle (vermelho) das repetições de campo 1 (triângulos) e 2 (círculos). Verde = Biodiversidade; vermelho = Controle. Triângulos = repetição de campo 1; círculos = repetição de campo 2, ambas das amostragens de inverno (2012-2013).

Além disso, fica evidente uma maior homogeneidade nas amostras da parcela Biodiversidade, já que foi possível observar o agrupamento das amostras de cada repetição de campo, até mesmo a sobreposição das amostras da repetição 1. Nota-se, ainda, que a componente F2 separou as amostras Biodiversidade exatamente de acordo com as repetições 1 e 2, conduzidas em anos subsequentes (2012/2013). Essa separação não foi observada nas amostras da parcela Controle, indicando que a heterogeneidade dessas amostras não permitiu a visualização do efeito do tempo. Essa homogeneidade é coerente com a alta sincronia observada em todos os parâmetros de caracterização dos frutos da parcela Biodiversidade.

Nesta análise, o posicionamento das observações (amostras) no plano é determinado por autovetores calculados a partir dos valores de abundância das proteínas, sendo que cada proteína tem determinada relevância no posicionamento das amostras em cada quadrante. Dessa forma, uma maneira matemática de selecionar as proteínas que mais contribuíram para a separação das amostras das parcelas Biodiversidade e Controle é a utilização destes autovetores, que medem a relação

multivariada entre a proteína e a componente F1, responsável sozinha pela separação dos dois grupos. Assim, as proteínas mais importantes na separação das amostras pela componente F1 foram destacadas nas tabelas 9 e 10.

Para ampliar o conjunto de proteínas analisadas, as proteínas significativamente expressas ($p < 0,05$) foram agrupadas com outras proteínas, selecionadas a partir da razão C/B (*fold change* = Média da abundância normalizada da proteína na quadruplicata do Controle / Biodiversidade) e do p calculado na ANOVA (tabelas 9 e 10). Para o aprofundamento da discussão sobre as proteínas, estas foram reunidas de acordo com a função e/ou via metabólica, sendo dada maior importância às proteínas significativamente expressas, especialmente aquelas apontadas pela PCA.

Tabela 9. Proteínas com expressão aumentada nos frutos colhidos na parcela Biodiversidade

No. Acesso	Descrição da sequência	PM (kDa)	pl (calc)	Similaridade (%)	C/B	AE	Código Enzima
M0RN39	subunidade C do fator de início da tradução eucariótica 3	79,9	5,14	90.7	-	excl.	-
M0RUW2	proteína 2g4 associada à proliferação	43,4	7,24	95.1	-	excl.	EC:3.4.11
M0TQC3	proteína porina da membrana mitocondrial externa 4	32,6	8,47	83.2	-	excl.	-
M0TTA7	fator de início da tradução eucariótica 5	44,1	5,66	73.9	-	excl.	-
M0TWV1	proteína ribossomal s I5	37,9	9,11	93.1	-	excl.	-
M0U3N1	cisteína desulfurase mitocondrial	26,9	6,42	55.1	-	excl.	-
Q6QUK8	quitinase ácida III	35,3	7,68	77.3	0,39	*	-
M0SSV2	isoforma 1 da ubiquitina hidrolase carboxi-terminal 12	131,3	6,02	95.1	0,41	*	EC:3.4
M0RKX7	proteína grpe mitocondrial	45,1	5,21	77.7	0,41	+	-
M0TSQ0	sacarose sintase 2	92,2	6,61	92.0	0,42	*	EC:2.4.1.13; EC:2.4.1
M0T6Q0	aleno óxido cloroplastidial	51,6	6,16	74.6	0,43	+	-
M0TA05	lipoxigenase	94,1	6,55	79.8	0,45	+	EC:1.13.11; EC:1.13.11.12
M0RQG7	ferritina cloroplastidial	30,7	6,52	83.6	0,50	++	EC:1.16.3.1; EC:1.16.3
M0RI85	isoforma 1 da ubiquitina hidrolase carboxi-terminal 12	130,5	5,81	94.1	0,51	*	EC:3.4
M0RYR4	subunidade 1 da 26s proteassomo regulatório não-ATPásico homólogo a	109,6	5,48	90.4	0,53	*	-
M0T4D8	isoforma 1 da coatomer subunidade beta2	112,2	5,05	94.0	0,55	+	-
M0SZJ0	inosina-5'-monofosfato dehidrogenase	52,2	6,11	86.0	0,56	++	EC:1.1.1.205
M0RMG4	enzima ativadora da ubiquitina 2 e1	119,2	5,21	90.4	0,56	*	-
M0SZQ4	componente e1 cloroplastidial da piruvato dehidrogenase subunidade alfa	100,8	8,10	88.3	0,57	*	EC:1.2.4.1
M0UA88	proteína regulatória de Nitrogênio homólogo P-II	27,9	10,14	85.5	0,57	*	-
M0RUJ0	componente e1 cloroplastidial da piruvato dehidrogenase subunidade alfa	46,9	6,29	88.7	0,58	*	EC:1.2.4.1
M0TP02	2-isopropilmalato sintase a	56,7	6,25	92.3	0,59	+	EC:2.3.3.13
M0S267	proteína relacionada a sec13	46,5	8,50	92.0	0,	t	-
M0SSW3	isoenzima piruvato quinase cloroplastidial	46,2	5,19	95.8	0,	+	EC:2.7.1.40
M0T502	isoforma 1 da enzima de ramificação do amido	96,8	6,02	83.9	0,61	**	EC:2.4.1.18

M0SMA0	subunidade c da próton tipo V ATPase	28,9	7,14	91.2	0,63	++	EC:3.6.1; EC:3.6.1.3; EC:3.6.1.15
F8TRV4	dehidrina cor410	26,2	5,05	62.8	0,65	t	-
M0RVC5	proteína ribossomal s l22	14,2	9,55	91.6	0,65	++	-
M0SPJ1	clatrina cadeia pesada 1	194,5	5,47	97.3	0,65	*	-
M0SY86	fator de alongação g cloroplastidial	79,6	6,73	85.2	0,65	*	EC:3.6.1; EC:3.6.1.15
M0RFF6	anexo nsf alfa solúvel	32,4	5,15	89.9	0,68	*	-
M0RQS3	codeinona redutase não-funcional 2 NADPH dependente	35,9	5,47	83.7	0,69	++	EC:2.3.1.170; EC:1.8.1.7
M0SWT1	clatrina cadeia pesada 1	193,4	5,40	97.0	0,69	*	-
M0TRN4	fosfoenolpyruvate carboxiquinase	75,1	7,05	91.1	0,69	+	EC:4.1.1; EC:4.1.1.49
M0S3C3	proteína bifuncional 2	31,3	7,84	92.9	0,70	+	EC:3.5.4.9; EC:1.5.1.5
M0U5G0	clatrina cadeia pesada 1	193,7	5,48	97.4	0,70	+	-
M0SC06	aspartato t-RNA citoplasmática	46,0	6,06	91.3	0,70	++	EC:6.1.1.12; EC:6.1.1
M0TFC3	enzima málica mitocondrial NAD dependente	69,8	6,81	91.2	0,71	+	EC:1.1.1.38; EC:1.1.1.39
M0TN57	subunidade alfa da importina 1b	58,6	5,52	93.5	0,71	t	-
M0SHD1	subunidade alfa da importina 1b	58,4	5,50	93.9	0,71	++	-
M0SSR4	provável subunidade beta da peptidase de processamento mitocondrial	58,2	6,44	90.5	0,72	++	EC:3.4.24
M0UBI1	polifenol cloroplastidial	52,1	7,17	68.5	0,73	+	-
M0UBI2	polifenol cloroplastidial	66,8	6,95	66.5	0,74	++	-
M0SE65	provável proteína cloroplastidial associada a lipídio e plastídio	34,4	5,43	81.5	0,75	**	-
M0RTD7	amido sintase cloroplastidial amiloplastidial	114,4	5,94	77.7	0,75	t	EC:2.4.1.21; EC:2.4.1

PM = Peso Molecular; pl = ponto isoelétrico; C/B = razão da média da abundância normalizada das amostras Controle / Biodiversidade (*fold change*); AE se refere ao resultado da análise estatística realizada (ANOVA): * = p<0,05; ** = p<0,001; ++ = 0,05<p<0,06; + = 0,06<p<0,1; t = proteína não significativa na ANOVA, mas significativa (p<0,05) no teste T (student); excl. = proteína exclusiva. Proteínas destacadas em verde foram as mais importantes na separação das amostras na análise de componentes principais figura 23).

Tabela 10. Proteínas com expressão aumentada nos frutos colhidos na parcela Controle

No. Acesso	Descrição da sequência	PM (kDa)	pI (calc)	Similaridade (%)	C/B	AE	Código Enzima
M0RLV9	subunidade mitocondrial da ATP sintase	17,2	4,96	95.85	C	excl.	-
M0RVA6	proteína ATP-citrato sintase cadeia alfa 2	46,6	5,73	95.7	C	excl.	EC:6.2.1.5; EC:2.3.3.8; EC:6.2.1
M0RX40	proteína não caracterizada (prevista: LOC103974859)	44,4	8,12	83.35	C	excl.	-
M0S5X3	alanina aminotransferase 2	52,9	6,47	91.8	C	excl.	-
M0SI57	quitinase 1	22,8	8,31	82.95	C	excl.	EC:3.2.1.14
M0SIV0	glutadiona cloroplastidial	,5	7,30	87.55	C	excl.	EC:1.8.1.7
M0SP93	quinona oxiredutase pig3	34,2	6,99	90.0	C	excl.	-
M0STS9	ferrodoxina - NADP cloroplastidial da raiz	42,4	8,15	89.65	C	excl.	EC:1.18.1; EC:1.18.1.2
M0SYD6	proteína não caracterizada (prevista: LOC103984910)	29,8	5,91	76.7	C	excl.	-
M0T8L0	isoforma x3 da miosina 9	217,9	4,78	77.9	C	excl.	-
M0TKU2	proteína relacionada a sec13	32,9	6,16	91.6	C	excl.	-
M0TXG8	proteína mitocondrial transportadora de malonil-acil	34,6	5,33	93.4	C	excl.	EC:2.3.1.85; EC:2.3.1.39; EC:2.3.1
C1JJS4	isoenzima catalase 2	40,5	7,69	81.75	1,22	*	EC:1.11.1.7; EC:1.11.1.6
M0T710	peroxidase p7	28,2	6,99	69.1	1,24	*	-
M0SM28	aspartato citoplasmática	46,0	8,37	94.15	1,25	+	EC:2.6.1.9; EC:2.6.1.57; EC:2.6.1.5; EC:2.6.1.1
M0TD54	proteína de ligação de selênio 1	52,9	6,24	91.95	1,29	*	-
M0T4I0	provável lactoil glutadiona cloroplastidial	41,1	7,77	87.25	1,31	+	EC:4.4.1.5
M0TYL3	dihidrolipolisina acetiltransferase residual componente de piruvato dehidrogenase mitocondrial	25,4	9,04	88.5	1,40	+	-
M0U539	NADH dehidrogenase	40,8	8,43	98.25	1,43	*	EC:1.6.99.5; EC:1.6.99.3; EC:1.6.5.3
M0S1C2	proteína não caracterizada	40,4	9,03	86.4	1,48	t	EC:2.3.1.85; EC:1.3.1.9
M0SC42	inibidor de pectinesterase ppe8b	42,8	5,16	68.95	1,50	+	-
A9QBM3	subunidade grande ribulose-bifosfato carboxilase oxigenase	52,9	6,48	98.55	1,53	t	EC:4.1.1.39
M0TJN2	subunidade 6b da 26s protease regulatória homóloga	54,3	8,31	94.7	1,55	*	EC:3.6.1; EC:3.6.1.3; EC:3.6.1.15; EC:3.6.4.3
M0T9Z8	sulfito redutase	70,7	8,15	89.5	1,55	*	EC:1.8.7.1

M0T5E9	ornitina cloroplastidial	41,4	7,85	92.3	1,55	+	EC:2.1.3.3
M0UAK2	proteína de ligação de ácido salicílico 2	29,1	5,64	78.0	1,61	t	
M0SUX9	malato glioxisomal	37,4	8,44	93.3	1,61	++	EC:1.1.1.37
M0UAK5	proteína de ligação de ácido salicílico 2	29,2	5,63	76.8	1,68	*	
M0SVN1	subunidade 6b da 26s protease regulatória homóloga	45,3	5,33	98.9	1,75	*	EC:3.6.1; EC:3.6.1.15
M0TU65	isoforma x3 da hexoquinase 1	64,5	8,24	90.2	1,91	*	EC:2.7.1.1
M0TR19	codeinona redutase não-funcional 2 NADPH dependente	122,1	5,88	83.9	2,06	*	EC:2.3.1.170; EC:1.8.1.7
A0MZ69	proteína relacionada patogenese 1	17,3	8,18	82.9	2,25	*	-
M0TW70	subunidade alfa da peptidase de processamento mitocondrial	54,7	6,21	89.45	2,75	**	EC:3.4.24
M0SL40	proteína da família cupin	38,4	5,08	64.65	2,87	++	-
M0RYT7	proteína da família acil	10,1	5,52	95.95	3,79	t	-

PM = Peso Molecular; pl = ponto isoelétrico; C/B = razão da média da abundância normalizada das amostras Controle / Biodiversidade (*fold change*); AE se refere ao resultado da análise estatística realizada (ANOVA): * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,001$; + = $0,06 < p < 0,1$; ++ = $0,05 < p < 0,06$; t = proteína não significativa na ANOVA, mas significativa ($p < 0,05$) no teste T (student); excl. = proteína exclusiva. Proteínas destacadas em vermelho foram as mais importantes na separação das amostras na análise de componentes principais figura 23).

5.3.3.2. Funções das proteínas e vias metabólicas alteradas

Via da ubiquitina-proteossomo

Esta conservada via participa da reciclagem e recrutamento de novas proteínas, cumprindo papel importante na regulação de diferentes processos biológicos nas plantas (Ingvaridsen et al., 2001). Quatro proteínas com expressão aumentada nas amostras da parcela Biodiversidade (M0SSV2, M0RMG4, M0RYR4, M0RI85) foram associadas a essa via, sendo que a isoforma 1 da ubiquitina hidrolase carboxi-terminal 12 já foi detectada em frutos de banana, sendo sua expressão inversamente proporcional à idade fisiológica e à susceptibilidade do fruto à podridão de coroa (Lassois et al., 2011), bem como em folhas de pessegueiros e macieiras (Wang et al., 2014; Rubio et al., 2015). Além disso, a subunidade 6b da 26S protease regulatória homóloga foi associada a duas sequências com expressão aumentada nas amostras da parcela Controle (M0SVN1 e M0TJN2), juntamente com a subunidade alfa da peptidase de processamento mitocondrial (M0TW70), todas elas significativas e com razão C/B maior que 1,5. As 26S proteases regulatórias são proteínas não-lisossomais e dependentes de ATP, que estão envolvidas na degradação de proteínas constitutivas de vida curta e também na degradação condicional de proteínas regulatórias relacionadas a diferentes processos metabólicos (Veeranagamallaiah et al., 2008). O aumento de expressão desta subunidade foi correlacionado com estresse salino em plântulas de painço (Veeranagamallaiah et al., 2008), deficiência de Potássio em seedlings de *arabidopsis* (Kang et al., 2004) e estresse por excesso de luz em algas fotossintetizantes (Heinrich et al., 2012). Outra proteína do complexo 26S proteassomal também foi identificada, mas com expressão aumentada nas amostras da parcela Biodiversidade: a subunidade 1 da 26s proteassomo regulatório não-ATPásico homólogo a, esta difere da outra por ser independente de ATP. Esta última teve a expressão aumentada em plantas de arroz submetidas à infecção fúngica (*Rhizoctonia solani*), sendo que na variedade resistente, o aumento na expressão foi maior do que na cultivar susceptível (Lee et al., 2006). Já a subunidade alfa da peptidase de processamento mitocondrial, de expressão significativamente ($p < 0,001$) maior nos frutos da parcela Controle, remove o terminal-N de proteínas importadas para a mitocôndria, sendo que o estresse pelo frio no tomate induziu a expressão desta proteína, juntamente com a 26s protease regulatória ATP

dependente (Vega-García et al., 2010), cujo aumento de expressão também foi significativamente superior para os frutos da parcela Controle. Como esta via participa de muitos processos celulares, não é possível obter muitas pistas a respeito das vias metabólicas alteradas nos frutos, em decorrência do entorno do agroecossistema com a biodiversidade da Mata Atlântica.

Metabolismo e biossíntese de ácidos graxos

Cinco sequências com expressão aumentada nos frutos da parcela Biodiversidade foram associadas a biossíntese de ácidos graxos em frutos, dentre as significativas ($p < 0,05$):

- componente e1 cloroplastidial da piruvato desidrogenase – esta enzima parece ser importante já que foi associada a duas sequências com expressão significativa entre os tratamentos, além de sua relevância apontada pela PCA. Esta enzima faz parte de uma grande estrutura multienzimática (complexo piruvato desidrogenase) que catalisa a descarboxilação oxidativa do piruvato (realizada pela componente em questão), juntamente com a acetilação redutiva da coenzima A. A sua localização é a intersecção de diversas vias metabólicas, representando importante local de regulação do metabolismo de Carbono (Johnston et al., 2000). Em frutos como coco e olivas, o aumento de transcritos e proteínas dessa enzima ocorreu nos estágios finais de desenvolvimento, sendo associados à síntese de ácidos graxos (Liang et al., 2014; Bianco et al., 2013). Já em frutos climatéricos como pêssegos, uma subunidade alfa desta proteína foi evidenciada como fator chave na lignificação do endocarpo de pêssegos avaliados durante o desenvolvimento, mostrando alta correlação ($R^2 = 0,94$) com o aumento da lignina deste tecido (Hu et al., 2011). Além disso, a subunidade beta dessa proteína já foi correlacionada com estresse vegetal: (1) diminuição na expressão e consequente redução de peso em plântulas de pepino sob estresse salino (Du et al., 2010); (2) expressão exclusiva em plantas de arroz inoculadas com um vírus que causa ananismo, comparado a plantas saudáveis (Xu et al., 2013); (3) aumento na expressão em folhas de macieira inoculadas com o fungo *Diplocarpon mali* (Li et al., 2014).

- provável proteína cloroplastidial associada a lipídio e plastídio – outra enzima com expressão significativa entre os tratamentos ($p < 0,001$), também conhecida como

PAP. As PAPs estão envolvidas no armazenamento de carotenoides nos cromoplastos de frutas, embora já tenham sido identificadas em folhas de diversas espécies, sendo sua expressão induzida sobre o estresse ambiental (Rey et al., 2000). Estas são proteínas homólogas às fibrilinas e às CHRC (*carotenoid associated protein*), que participam do sequestro de carotenoides durante o dramático acúmulo destes compostos, que ocorre em processos como desenvolvimento de flores e amadurecimento de frutos, processos conhecidos como cromoplastogênese (Leitner-Dagan et al., 2006). Mutantes transgênicos de tabaco sob estresse luminoso, com expressão aumentada da fibrilina (proteína homóloga à PAP), apresentaram cloroplastos com maior número de plastoglôbulos nas folhas e pétalas com leucoplastos apresentando maior número de plastoglôbulos aglomerados (Rey et al., 2000). Em algas verdes, essa proteína está fortemente associada a gotículas de lipídio do tipo bC (β -carotene-rich plastoglobuli), que são pequenas organelas presentes no interior dos cloroplastos, que aumentam em tamanho e número sob estresse. Estas organelas estão envolvidas na resistência ao estresse, transporte de metabólitos e regulação de transporte de elétrons na fotossíntese (Davidi et al., 2015). Em tomates avaliados durante o amadurecimento, esta proteína teve sua expressão aumentada a partir do mature green até o breaker, quando houve a expressão máxima, que foi mantida até o final do amadurecimento (Bian et al., 2011). No entanto, baseados em evidências da literatura que detectaram essas proteínas em outros tecidos não cromoplastogênicos (corpos lipídicos e na superfície de plastogrânulos de cloroplastos), Leitner-Dagan et al. (2006) argumentam que isto sugere o envolvimento dessas proteínas não somente no acúmulo de carotenoides, mas também no sequestro geral de substâncias hidrofóbicas. Eles concluem que o sequestro de substâncias hidrofóbicas deve ser essencial para a sobrevivência da planta sob estresse, já que as PAP podem ser induzidas por diferentes tipos de estresse, como osmótico, oxidativo e luminoso.

Além disso, outras três sequências positivamente reguladas nas amostras da Biodiversidade parecem importantes nesse contexto, uma vez que apresentam a razão $C/B < 0,66$, embora não tenham sido significativas ($0,06 < p < 0,1$): a aleno óxido cloroplastidial, a lipoxigenase e a isoenzima piruvato quinase cloroplastidial. A aleno óxido é uma proteína essencial na via de biossíntese do ácido Jasmônico, sendo que

artemísias transgênicas com aumento de expressão da aleno óxido sintase (cujo produto é aleno óxido e os precursores, ácidos graxos) mostraram aumento significativo nos níveis de metil jasmonato e de artemisinina (Lu et al., 2011). Já em arroz sob estresse biótico, o aumento nos níveis de metil jasmonato foram observados concomitantemente ao aumento na expressão da aleno óxido (Rienmann et al., 2013). Da mesma forma, as lipoxigenases catalisam a oxidação de ácidos graxos polinsaturados produzindo hidroperóxidos, além de serem metabolizadas em oxilipinas biologicamente ativas, como o ácido jasmônico, envolvido na via de resposta a estresse biótico e abiótico pela sinalização de aldeídos voláteis de seis Carbonos: hexanal e hexenal, compostos associados aos voláteis de folhas verdes – GLV *green leaf volatiles*, assim descritos pela associação de seu aroma ao aroma de grama recém-cortada (Vogt et al., 2013).

A produção desses GLV é extremamente relacionada a estresse biótico, como infecção fúngica e ataque de herbívoros (Shiojiri et al., 2006) e abióticos, como o dano mecânico (Bate et al., 1998). Esses compostos são conhecidos por atuar como sinalizadores de ferimentos, induzindo respostas de defesa moderada em plantas, relativas ao metil jasmonato em ambos níveis fisiológico e molecular (Bate et al., 1998). Curiosamente oito compostos voláteis de seis Carbonos, entre eles o hexanal, o 2-hexenal e seus derivados, foram encontrados com exclusividade na polpa dos frutos maduros da parcela Biodiversidade (Calháu, 2014).

Além destas enzimas, a isoenzima piruvato quinase participa da regulação entre açúcares e ácidos orgânicos na via glicolítica, catalisando a retirada irreversível de um grupo fosfato de um fosfoenolpiruvato, produzindo ATP e piruvato. Esta enzima parece controlar o fluxo glicolítico a partir de hexose-fosfato para piruvato, além de ter conexões com o balanço de ABA/GA e estresse oxidativo (revisado em Qin et al., 2013). Alguns trabalhos mostram o envolvimento desta enzima com a biossíntese de ácidos graxos em sementes de *arabidopsis* (Andre et al. 2007; revisado em Qin et al., 2013).

Vale ressaltar que duas das proteínas citadas para o metabolismo de ácidos graxos (piruvato desidrogenase e piruvato quinase), juntamente com a 2-isopropilmalato, a enzima málica mitocondrial NAD dependente e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, todas com expressão aumentada nos frutos obtidos na parcela

Biodiversidade, estas últimas não significativas ($0,06 < p < 0,1$), participam da mesma via: a do Metabolismo do Piruvato (figura 24).

Biossíntese e metabolismo de aminoácidos

Quatro proteínas com aumento de expressão na parcela Controle, duas significativas, uma exclusiva e uma “quase significativa” ($0,05 < p < 0,06$), foram associadas ao metabolismo e à biossíntese de aminoácidos. Juntas, estas foram associadas a nove diferentes vias relacionadas a aminoácidos, sendo que nenhuma destas vias foi associada a nenhuma das proteínas com aumento de expressão nos frutos da parcela Biodiversidade, tais como (Keegpathways):

- Biossíntese da Lisina
- Metabolismo de Arginina e Prolina
- Metabolismo de Fenilalanina
- Metabolismo da Tirosina
- Metabolismo de Triptofano
- Metabolismo de Alanina, Aspartato e Glutamato
- Metabolismo de Histidina
- Metabolismo de Cisteína e Metionina
- Biossíntese de Fenilalanina, tirosina e triptofano

Duas destas proteínas merecem atenção: a aspartato citoplasmática e a alanina aminotransferase 2, já que apresentam função de transaminases, catalisando a transferência reversível do grupamento amino para um ácido carboxílico, reação chave na síntese de aminoácidos, como é o caso observado na via de Metabolismo da Alanina, Aspartato e Glutamato (figura 25). Este é o contexto da assimilação de Nitrogênio, em que o glutamato exerce papel central no metabolismo de aminoácidos, já que é o doador do grupamento α -amino para a síntese de outros aminoácidos, pela ação de uma variedade de multi-específicas transaminases ou aminotransferases. A transaminase em questão, alanina aminotransferase, faz a conversão do grupamento α -amino de um glutamato para um piruvato, formando alanina (Forde e Lea, 2007). A importância da síntese e do metabolismo de aminoácidos na identificação das vias diferentemente expressas entre os tratamentos foi ainda destacada pelos resultados obtidos no

metaboloma dos mesmos frutos avaliados neste trabalho, em projeto derivado deste experimento, que evidencia o acúmulo de quase todos os aminoácidos nos frutos da parcela Controle (Nascimento, 2015). Vale ressaltar que nenhuma das sequências estudadas com aumento de expressão nos frutos da parcela Biodiversidade foram associados a qualquer via relacionada a aminoácidos, exceto a via da Leucina (não associada às sequências do grupo Controle), que coincide com a biossíntese de éster de cadeia ramificada (Ong, Voo e Kumar et al., 2012). A esta última, foram associadas duas sequências com aumento de expressão nos frutos da parcela Biodiversidade: piruvato dehidrogenase e 2-isopropilmalato sintase.

Defesa contra patógenos

Seis sequências com aumento de expressão nos frutos da parcela Controle, significativo em quatro delas, foram relacionadas com proteínas relacionadas à defesa vegetal. Dentre estas, a proteína relacionada patogenese 1 (PR1), a peroxidase p7 e a quitinase 1, as duas primeiras com expressão significativamente diferentes ($p < 0,05$) e a terceira exclusiva, são associadas aos genes relacionados a patogênese (PR – *Pathogenesis-related*). Genes que codificam PR foram estudados em diferentes plantas e a expressão desses genes é induzida com o ataque de patógenos e insetos, embora alguns desses genes tenham sido reportados por serem ativados durante o crescimento e desenvolvimento vegetal. Proteínas associadas a estes genes são classificadas em 17 famílias, entre elas: β -1,3-glucanases (PR-2), quitinases (PR-3, -4, -8 e -11), proteínas do tipo osmotina com taumatina (PR-5), inibidores de proteinases (PR-6), endoproteinases (PR7), peroxidases (PR9), proteínas tipo ribonuclease (PR-10), defensinas (PR-12), tioninas (PR-13), proteínas transferidoras de lipídeo (PR-14), etc. A regulação da expressão dessas proteínas é conhecida por ser controlada pela sinalização de diversas moléculas, como ABA, ácido jasmônico e ácido salicílico (revisados em Kesari et al., 2010 e Tang et al., 2013).

- proteína relacionada a patogênese 1 - com expressão significativamente maior, razão C/B = 2,25 e com relevância apontada pela PCA, a PR1 é a PR mais abundante em plantas, chegando a aumentar sua expressão em 10.000 vezes em tecidos infectados, alcançando até 1-2% do total de proteínas da folha, sendo a expressão de seu gene um

indicador da ativação da resposta de defesa da planta (Buchel e Linthorst, 1999). Em bananas, transcritos da PR1 no fruto tiveram sua expressão associada ao amadurecimento, induzida e antecipada pela aplicação com etileno (mesmo quando associado a outros reguladores vegetais, como o metil jasmonato) e suprimida com a aplicação de 1-mcp antes da do etileno (Kesari et al., 2010; Tang et al., 2010). Além disso, em casca de banana inoculada com *Colletotrichum musae* (Anthracnose – podridão pós-colheita), o aumento de expressão da PR1 na casca foi maior no tecido mais próximo à necrose, sendo que a necrose foi suprimida e a expressão do gene da PR1 aumentada sob a aplicação de metil jasmonato e ácido salicílico (Tang et al., 2010; Tang et al., 2013). Em um destes trabalhos, um gene relativo à quitinase (*MaChi*) também foi estudado e apresentou comportamento oposto ao da PR1: expressão alta e estável durante o desenvolvimento do fruto, começando a cair no disparo do amadurecimento, justamente quando a expressão do gene da PR1 começa a aumentar. Isto sugere a participação da quitinase na defesa do fruto contra doenças durante o desenvolvimento do fruto (Tang et al., 2010), indicando que a PR1 possa estar relacionada com o desenvolvimento de microorganismos que colonizaram o fruto no campo, mas só apresentam atividade após o disparo do amadurecimento, quando a resistência do fruto verde parece ser diminuída (Toledo et al., 2012). Em arábida, a resposta à inoculação do patógeno *P. syringae* nas raízes é mediada pela via de defesa dependente do ácido salicílico (AS) e não do Metil jasmonato ou Etileno, através da ativação da proteína reguladora NPR1 e subsequente expressão de genes PR, incluindo o PR1 (Van der Mortel et al., 2012).

A peroxidase e a catalase apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos, embora tenham razão C/B próxima a 1,2. Ambas participam do metabolismo oxidativo na eliminação de peróxidos, hidroperóxidos e espécies reativas de oxigênio (Figueiroa-Yáñez et al., 2012; Wang et al., 2015), frequentemente relacionadas a estresses, especialmente associadas às vias do metil jasmonato e do ácido salicílico. A aplicação de metil jasmonato em pêssegos durante o desenvolvimento levou ao atraso no amadurecimento deste fruto, associado ao aumento da atividade dessas duas enzimas no momento da colheita (Zapata et al., 2014). Por outro lado, em frutos de banana, a atividade desta enzima parece diminuir ao longo do

amadurecimento do fruto, sendo que aplicação pós-colheita de ácido salicílico, com consequente atraso no amadurecimento do fruto, diminuiu a atividade dessas enzimas em relação a frutos não tratados.

O ácido salicílico media a Resposta Hipersensitiva (HR – hypersensitive response) e a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR- systemic acquired resistance) da planta contra o ataque de patógenos, através da inibição da catalase, que ocasiona o aumento intracelular dos níveis de H_2O_2 que, supostamente, atuaria como um segundo mensageiro na ativação e expressão de genes relacionados a defesa (Srivastava e Dwivedi, 2000). A HR se refere à morte apoptótica de células na região da entrada do patógeno, causando a necrose do tecido infectado. Geralmente o patógeno fica restrito às lesões, mas a resposta pode superar essa região, frequentemente desenvolvendo uma base ampla e duradoura de resistência secundária à infecção de patógenos, conhecida como SAR (Kumar e Klessig, 2003). Dentro desse contexto, outra enzima foi associada a duas sequências com aumento de expressão nas amostras da parcela Controle, ambas com $C/B > 1,5$ e uma delas significativa e destacada pela PCA: a proteína de ligação de ácido salicílico 2. Esta proteína pertence a uma ampla classe de hidrolases ligantes/estimulantes envolvidas na transdução de sinais de estresse mediados por hormônio e parece ser um receptor do ácido salicílico, indispensável à resposta imune da planta (Kumar e Klessig, 2003).

Interações simbióticas planta-microorganismos

Quatro sequências com aumento de expressão nos frutos produzidos próximo ao fragmento florestal, três delas significativas e com $C/B < 0,66$ e duas delas destacadas pela PCA, foram relacionadas com enzimas associadas aos mecanismos de interações não patogênicas de plantas com microorganismos: a quitinase ácida III e as clatrininas de cadeia pesada 1.

- quitinase ácida III – as quitinases são uma ampla família de proteínas encontradas em diversos sistemas biológicos, que tem a função de hidrolisar quitina, quitosano, lipoquitooligossacarídeos, peptídeoglicanos, arabinogalactanos e glicoproteínas contendo N-acetilglucosamina. Membro das proteínas PR, sua expressão é fortemente induzida não somente sob estresse biótico, mas também abióticos, como osmótico,

salino, baixas temperaturas, injúrias mecânicas e metais pesados (Grover, 2012). Plantas transgênicas com superexpressão de quitinases frequentemente apresentam aumento na resistência a doenças. Além disso, as quitinases também estão envolvidas nas interações entre células vegetais e fungos (ex. associações de micorrizas) e bactérias (associações de *Rhizobium* e leguminosas) (Grover, 2012). Em um estudo proteômico realizado com 2D-DIGE comparando a polpa de banana verde e da madura, constatou-se que no fruto pré-climatérico, a família das quitinases era a mais abundante, especialmente da classe III, sendo que a expressão dessas proteínas diminuiu no fruto maduro, em praticamente todas as sequências detectadas (Toledo et al., 2012). Em outro trabalho realizado com frutos de banana tratados ou não com metil jasmonato e ácido salicílico, foi encontrado aumento na expressão de diversos genes da família das quitinases, em especial da quitinase III, que teve sua expressão induzida pela aplicação de ambos reguladores vegetais, sendo associado a maior resistência do fruto à podridão pós-colheita (Tang et al., 2013). Outro trabalho evidenciou a importância de endoquitinases (chitinases da classe III) durante o processo de amadurecimento, em que seu gene teve máxima expressão concomitantemente ao pico de etileno, em frutos tratados com etileno ou amadurecidos naturalmente, em frutos tratados com 1-mcp a expressão desse gene foi maior no fruto verde (Liu et al., 2012). Diversos trabalhos evidenciaram aumento pronunciado na expressão do gene da quitinase III quando da colonização de micorrizas, aparentemente, o processo de simbiose e patogênese se iniciam de maneira similar, com diferentes evoluções, a partir da sinalização com quitinases. Estas apontam participação chave nessa interação, uma vez que estão envolvidas na degradação de elicitores responsáveis pela indução da resposta ao patógeno, processo que irá determinar na sinalização de uma interação patogênica ou simbiótica (Grover, 2012). Uma evidência de que a quitinase III está associada a relações simbióticas com as plantas é a detecção de transcritos desse gene exclusivamente em células de raiz de *Medicago trunculata* com a presença de nódulos jovens e maduros, ao contrário de células adjacentes sem a presença de nódulos, células em contato direto com hifas e células não colonizadas do córtex da raiz (Bonanomi et al., 2001). Assim, a literatura existente sobre essa proteína indica que o significativo aumento de expressão desta nos frutos da parcela Biodiversidade esteja relacionado à proteção do fruto verde (Toledo et al., 2012). Porém, o fato de ser o principal tipo de quitinase envolvida nessas

interações (Santos et al., 2008), aliado ao o fato de ser uma enzima chave na sinalização de interações simbióticas ou patogênicas, sugere que a importância desta enzima nos frutos da parcela Biodiversidade possa estar relacionado à microorganismos. Principalmente quando se leva em conta que a maior parte das proteínas relacionadas à defesa deste estudo foram encontradas com maior expressão nos frutos da parcela Controle.

- clatrininas de cadeia pesada 1 – As clatrininas representam a principal via de endocitose em plantas, uma vez que é a proteína mais abundante no exterior das vesículas formadas nesta via. Este processo consiste na invaginação de substâncias pela membrana plasmática e é determinante na percepção da presença de microorganismos e consequente ativação e sinalização de cascatas metabólicas, como a ativação da resistência basal, representando papel fundamental no “diálogo” molecular entre plantas e microorganismos (Leborgne-Castel, Adam e Bouhidel, 2010; Wang et al., 2015). Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA) e bactérias de solo do gênero *Rhizobium* são as principais espécies estudadas nas relações simbióticas entre microorganismos e plantas. FMA colonizam a raiz de mais de 90% das espécies vegetais, cumprindo importante papel na aquisição de água e fósforo para planta, em troca de carboidratos. Já as bactérias do gênero *Rhizobium* se associam às raízes de algumas leguminosas formando nódulos, os quais são responsáveis pela fixação do Nitrogênio atmosférico em amônia disponível para as plantas (Datta et al., 1999). Plantas transgênicas da leguminosa *Lotus japonicus*, que expressam um domínio negativo para a endossimbiose mediada pela clatrina de cadeia pesada 1, suprimiram a expressão de genes relacionados ao início do processo de nodulação, impedindo a infecção do *Mesorhizobium*, resultando em reduzida nodulação (Wang et al., 2015).

Figura 24. Via metabólica do Metabolismo do piruvato evidenciando as proteínas com maior expressão nos frutos das parcelas Biodiversidade (verde) e Controle (vermelho). Fonte: Keggpathways.

Figura 25. Via do Metabolismo da Alanina, aspartato e glutamato evidenciando as proteínas com maior expressão nos frutos das parcelas Biodiversidade (verde) e Controle (vermelho). Fonte: Keggpathways.

Figura 26. Via metabólica do ciclo do ácido cítrico (TCA) evidenciando as proteínas com maior expressão nos frutos das parcelas Biodiversidade (verde) e Controle (vermelho). Fonte: Keggpathways.

De modo geral, foi constatado que a presença da biodiversidade florestal da Mata Atlântica no entorno do agroecossistema promoveu benefícios à saúde do cultivo e à qualidade do fruto. A redução na severidade de Sigatoka Negra das plantas da parcela Biodiversidade, aliada a frutos mais homogêneos e com maior vida verde são indícios de que a manutenção de fragmentos florestais na propriedade agrícola pode ser financeiramente vantajosa, uma vez que o controle desta doença costuma ocupar a maior fatia dos custos de produção convencional. Além disso, a sincronia e uniformidade observada nas plantas e frutos desta parcela facilitaria a aplicação de ferramentas para a colheita de frutos padronizados, com maior disponibilidade de tempo para amadurecer, trazendo claras vantagens econômicas e comerciais para o agricultor.

A partir disso, a análise do Proteoma do fruto deve nos trazer pistas metabólicas da consequência para o fruto desta interação da planta com a biodiversidade no entorno. De fato, a análise do Proteoma indica diferenças na expressão de proteínas chaves de algumas vias, sugerindo a existência de um desvio metabólico entre os frutos das diferentes parcelas.

Em relação às proteínas relacionadas ao metabolismo primário, a análise do Proteoma sugere uma tendência de proteínas mais voltadas para a respiração e síntese de aminoácidos nos frutos da parcela Controle. Esta hipótese parte da maior expressão de enzimas relacionadas à biossíntese e metabolismo de aminoácidos, principalmente transaminases, que são centrais na assimilação e no metabolismo de aminoácidos da planta (Forde e Lea, 2007), mais claramente visualizado na via da Alanina, aspartato e glutamato (figura 25). Quatro sequências com maior expressão no grupo Controle foram associadas ao metabolismo e biossíntese de aminoácidos em nove diferentes vias metabólicas (página 76), o que sugere que estas quatro sequências apresentam papel central no metabolismo destes compostos. Além disso, o ciclo do ácido cítrico também tem participação fundamental neste processo, já que fornece esqueletos de carbono para a síntese de aminoácidos (O'Leary e Plaxton, 2011) e a alteração desta via nos frutos da parcela Controle também parece favorecer a síntese destes compostos (figura 26). Esse resultado é coerente com o comportamento respiratório do fruto pré-climatérico observado nessas parcelas (figura 16) e com o acúmulo de aminoácidos detectados por Nascimento (2015), que analisou os metabólitos nas mesmas amostras. Já nos da Biodiversidade, as proteínas sinalizam para um outro direcionamento metabólico, que sugere a mobilização do piruvato para a síntese de outros compostos, como ácidos graxos. Esta evidência parte do importante e significativo aumento observado em duas enzimas piruvato dehidrogenases (ec. 1.2.4.1) nos frutos da parcela Biodiversidade, sendo esta uma enzima chave na intersecção de diferentes vias que regulam o metabolismo de Carbono (Johnston et al., 2000), além de ter sido relacionada à síntese de ácidos graxos em frutos (Liang et al., 2014; Bianco et al., 2013). Esta, juntamente com outras enzimas, destaca a importância da via do Metabolismo do piruvato nesse contexto,

sugerindo a mobilização deste para outras vias como a da Leucina e dos ácidos graxos (figura 24). Além disso, esta hipótese é reforçada pelo aumento de expressão de outras proteínas intimamente relacionadas a síntese de ácidos graxos, como a PAP ($p < 0,05$), a lipoxigenase e a aleno óxido, sendo que nenhuma das proteínas com aumento de expressão nos frutos da parcela Controle foi correlacionada com a síntese ou metabolismo desses compostos. Ainda que a nível especulativo, uma maior tendência na síntese de ácidos graxos nos frutos da parcela Biodiversidade, poderia ser correlacionada com o aparecimento de voláteis de seis Carbonos exclusivamente nos frutos maduros desta parcela (Calháu, 2014), já que os ácidos graxos são os precursores e a lipoxigenase, a enzima chave na biossíntese desses compostos (Shiojiri et al., 2006).

Além disso, a condição ambiental avaliada neste trabalho parece ter influenciado também a expressão de proteínas relacionadas à defesa. Nos frutos da parcela Controle, seis sequências associadas a proteínas de defesa mostraram aumento de expressão, quatro delas significativo ($p < 0,05$) e com relevância apontada pela PCA. O sistema imune das plantas conta com mecanismos sofisticados e complexos, que são responsáveis por mediar a interação de plantas e microorganismos mesmo quando esta é simbiótica. Dessa forma, esse complexo sistema de reconhecimento e resposta do vegetal à entrada de microorganismos pode ser dividido em quatro fases distintas que lançam mão de diferentes vias metabólicas para atuar, sendo a primeira delas comum a todos os tipos de interações, patogênicas ou não (Jones e Dangl, 2006). Nesse cenário, o processo de endocitose é determinante no reconhecimento de microorganismos e no desencadeamento de cascatas metabólicas como a SAR e a HR (Leborgne-Castel, Adam e Bouhidel, 2010; Wang et al., 2015). Nos frutos obtidos na parcela Controle, além da PR1 que é uma proteína estritamente relacionada a patógeno, duas sequências foram associadas a proteína de ligação de ácido salicílico 2, essenciais à sinalização do ácido salicílico que, por sua vez, está diretamente relacionado à cascata de sinalização da SAR e da HR (Kumar e Klessig, 2003).

Os fatos acima mencionados indicam que as plantas da parcela Controle podem ter desencadeado uma cascata metabólica por meio da sinalização do ácido salicílico, que resultaria nos fenômenos observados nos frutos, tais como, uma resposta direta de defesa combinada a uma alteração do metabolismo primário (associada a um “aumento” da respiração e da síntese de aminoácidos). Biologicamente, esta resposta sistêmica poderia representar um “aviso” de que as condições estão desfavoráveis à planta ou simplesmente que a homeostase vegetal foi perturbada. Esta resposta sistêmica poderia ser decorrente da infestação da Sigatoka Negra ou qualquer outro tipo de estresse oculto decorrente da presença exclusiva do monocultivo no entorno da parcela.

Alguns indícios apontam para que essa resposta sistêmica não seja, exclusivamente, uma resposta ao estresse biótico causado pela Sigatoka Negra. A primeira delas está relacionada com trabalhos anteriores que mostram uma forte relação das Sigatokas com a redução na vida verde do fruto. Consta que nesses trabalhos foram avaliadas plantas cultivadas sem o controle da doença, que atingiu níveis altíssimos de severidade, incomparáveis aos encontrados no presente estudo. Como a diferença observada na vida verde foi semelhante entre o trabalho anterior e este, seria plausível a existência de outro mecanismo atuando para que isso aconteça. Além disso, existe um envolvimento claro do efeito observado no presente trabalho com o metabolismo de aminoácidos, o que nos levou a questionar outros efeitos potencialmente resultantes da condição ambiental avaliada no trabalho.

De toda maneira, neste momento já é possível afirmar que, embora a proposição inicial do trabalho fosse avaliar os efeitos proporcionados pela proximidade com a biodiversidade, os resultados apontam para um efeito ocasionado pela presença exclusiva do monocultivo no entorno do agroecossistema, uma vez que: (1) o habitat de qualquer planta está associado a ecossistemas naturais, consequentemente, um ambiente complexo com ampla diversidade de plantas, animais e microorganismos; (2) as plantas da parcela Biodiversidade parecem estar mais próximas da homeostase vegetal, já que apresentam uma homogeneidade e uma sincronia surpreendente entre todos os parâmetros analisados.

Assim, a partir dessa premissa, é possível sobrepor todos os fenômenos observados nas plantas e frutos da parcela Controle aos descritos por Chaboussou no livro “Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos” (2006). Nesta publicação, numerosas evidências são reunidas para provar a teoria da trofobiose, a qual questiona profundamente o papel do sistema de defesa vegetal na resistência dos cultivos. Esta teoria invoca que a susceptibilidade de plantas a patógenos e pragas está relacionada a um acúmulo de substâncias solúveis nos tecidos, especialmente açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos, sendo que a resistência da planta seria consequência de uma baixa quantidade dessas substâncias. O acúmulo de substâncias solúveis, segundo a teoria, é decorrente de desordens fisiológicas consequentes da utilização de agroquímicos, principalmente o adubo nitrogenado. Por outro lado, plantas resistentes apresentam maior tendência na síntese de carbono de reserva (amido), proteínas e consequente acúmulo de compostos fenólicos, o que configura uma dieta desfavorável a insetos e microorganismos (Hasime Tokeshi, comunicação pessoal). No entanto, como admitir que o efeito fisiológico observado nas plantas e frutos da parcela Controle seja semelhante ao descrito por Chaboussou, se ambas parcelas tiveram o mesmo manejo cultural? Bem, este trabalho se propôs a avaliar os efeitos causados por uma condição ambiental, mas nunca teve a pretensão de elucidar de que maneira este efeito acontece. Assim mesmo, é possível especular que o microbioma vegetal e

do solo representariam fortes candidatos a explicar este efeito, na medida que: (1) a literatura mostra que a inclusão de uma espécie vegetal no monocultivo promoveu benefícios como maior resistência a doenças e o atraso na senescência de folhas e frutos, efeito que foi associado ao enriquecimento do microbioma do solo (Kumar et al., 2004; Matoo et al., 2006); (2) os frutos da parcela Biodiversidade apresentam maior expressão de proteínas relacionadas ao reconhecimento e sinalização de interações simbióticas de plantas e microorganismos; (3) evidências de microorganismos simbiontes que promovem a desintoxicação por agroquímicos, como a bactéria endossimbionte *Burkholderia* (Werren, 2012); (4) há uma expectativa crescente quanto ao papel do microbioma nos sistemas biológicos, cujas interações parecem ser extremamente complexas e estão longe de ser esclarecidas.

Assim, a partir de uma perspectiva abrangente, as evidências que apontam para um estado fisiológico de estresse vegetal, observado nas plantas e frutos da parcela Controle são: (1) a maior infestação de *S. Negra*, (2) a menor vida-verde, (3) a alteração na respiração pré-climatérica, (4) o menor teor de compostos fenólicos nas folhas (5) a maior expressão de proteínas relacionadas à síntese de aminoácidos, (6) o acúmulo de aminoácidos nos frutos e (7) maior expressão de proteínas relacionadas à defesa. Dentro dessa lógica, a proximidade com o fragmento florestal parece ter amenizado os efeitos do monocultivo convencional em extensão, semelhante a um efeito tamponante dos efeitos causados pelo sistema de cultivo convencional, capaz de favorecer o equilíbrio no agroecossistema e, conseqüentemente, na planta e no fruto.

6. CONCLUSÕES

A avaliação da influência da biodiversidade florestal no entorno do agroecossistema mostrou benefícios para o cultivo e para o fruto. No entanto, a avaliação holística dos resultados evidencia que o efeito observado se assemelha a um estado fisiológico de estresse das plantas da parcela Controle, em comparação às plantas mais saudáveis e frutos mais homogêneos obtidos na parcela Biodiversidade. Portanto, a manutenção de fragmentos florestais em áreas agrícolas mostrou-se favorável ao estabelecimento do equilíbrio do agroecossistema e da resistência da planta, trazendo benefícios importantes frente à necessidade de uma agricultura mais saudável, com menor utilização de agroquímicos e alinhada à preservação de biomas naturais. O efeito reportado aqui é surpreendente na medida em que se refere a biodiversidade no entorno do agroecossistema, o que mostra o enorme potencial do incremento da agrobiodiversidade em paisagens agrícolas, que poderia trazer benefícios ainda maiores se inserida à área de cultivo.

7. PERSPECTIVAS

A partir desses resultados, muitas estratégias podem ser traçadas com a finalidade de confirmar as novas hipóteses levantadas. Inicialmente, algumas técnicas poderiam ser utilizadas para que as pistas aqui levantadas se tornem mais consistentes, entre elas: (1) aprofundamento bibliográfico e integração do Proteoma com o Metaboloma; (2) a utilização de técnicas mais direcionadas (abordagem *target*) para a confirmação de proteínas chave; (3) alguns ensaios bioquímicos, como a análise de aminoácidos e alguns reguladores chave, em todos os tecidos coletados (folhas, casca e polpa). Por fim, uma abordagem voltada para os microorganismos endofíticos e de solo poderia ser empregada com a finalidade de explicar de que maneira a biodiversidade de ecossistemas naturais promove esses benefícios aos agroecossistemas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT T.; KOCH, A.; LODE, A.; GREVE, B.; SCHNEIDER-MERGENER, J.; STEUP, M. Plastidic (Pho1-type) phosphorylase isoforms in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants: expression analyses and immunochemical characterization. *Planta*. v. 213, p. 602-13, 2001.

ALTIERI, M. A., SILVA, E. N., NICHOLLS, C. I. 2003. O papel da Biodiversidade no Manejo de Pragas. Holos, ISBN: 85-86699-38-1; 226 p.

AGOPIAN, R. G.; SOARES, C. A.; PURGATTO, E.; CORDENUNSI, B. R.; LAJOLO, F. M. 2008. Identification of fructooligosaccharides in different banana cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, v. 56, p. 3305-3310.

ANDRE, C.; FROEHLICH, J. E.; MOLLA, R.; BENNING, C. A Heteromeric Plastidic Pyruvate Kinase Complex Involved in Seed Oil Biosynthesis in Arabidopsis. *American Society of Plant Biologists*, v. 19, p. 2006-2022, 2007.

ARBOS, K. A.; FREITAS, R. J. S.; STERZ, S. C.; DORNAS, M. F. 2009. Influência dos sistemas de cultivo orgânico e convencional na atividade antioxidante de hortaliças. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 27, n.1, p. 53-58.

ARÊAS, J.A.G.; LAJOLO, F.M. 1981. Starch transformation during banana ripening: I – the phosphorylase and phosphatase behavior in *Musa acuminata*. *J. Food Biochem.* v. 5, p. 19-37.

ARIURA, G.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. 2009. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell and Physiology*, v. 50, p. 911-923.

BALVANERA, P., PFISTERER, A. B., BUCHMANN, N., HE, J. S., NAKASHIZUKA, T., RAFFAELLI, D., SCHMID, B. 2006. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecology Letters*, v. 9, p. 1146–1156.

BASSINELLO, P.Z.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Amylolytic activity in fruits: comparison of different substrates and methods using banana as model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 50, p.5781-5786, 2002.

BATE, N. J.; ROTHSTEIN, S.; J. C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *The Plant Journal* (1998) 16(5), 561–569.

BECK, E.; ZIEGLER, P. Biosynthesis and degradations of starch in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* v.40, p.95-117, 1989.

BENNETT, R. N.; SHIGA, T. M.; HASSIMOTTO, N. M. A.; ROSA, E. A. S.; LAJOLO, F. M. e CORDENUNSI, B. R. Phenolics and Antioxidant Properties of Fruit Pulp and Cell Wall Fractions of Postharvest Banana (*Musa acuminata* Juss.) Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, p. 7991–8003, 2010.

BERGMEYER, H. U. *Methods of enzymatic analysis*. 2 ed. Springer: New York, 1974. p. 1205-1212.

BIAN, W.; BARSAN, C.; EGEA, I.; PURGATTO, E.; CHERVIN, C.; ZOUINE, M.; LATCH, A.; BOUZAYEN, PECH, J. C. Metabolic and Molecular Events Occurring during Chromoplast Biogenesis. *Journal of Botany*, v. 167, p. 60-79, 2011.

BIANCO, L.; ALAGNA, F.; BALDONI, L.; FINNIE, C.; SVENSSON, B.; PERROTA, G. Proteome Regulation during *Olea europaea* Fruit Development. *PLoS ONE*, v. 8:1, 2013.

BONANOMI, A.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T.; SALZER, P. Local Induction of a Mycorrhiza-Specific Class III Chitinase Gene in Cortical Root Cells of *Medicago truncatula* Containing Developing or Mature Arbuscules. *Plant biol.* v. 3, p. 194-200, 2001.

BORGES, A. L. Interação entre Nutrientes em Bananeira. *Boletim Banana em Foco*, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, n.55, 2004.

BORGES, A. L.; OLIVEIRA, A. M. G. Avaliação do estado nutricional da bananeira – diagnose visual. *Comunicado Técnico EMBRAPA* ISSN. 1809-502X, v. 117, 7 p. 2006.

BOURN, D.; PRESCOTT, J. 2002. A Comparison of the Nutritional Value, Sensory Qualities, and Food Safety of Organically and Conventionally Produced Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 42, p. 1–34.

BUCHER, A.S., H.J.M. LINTHORST, 1999. PR-1: A group of plant proteins induced upon pathogen infection. In: *Pathogenesis-related proteins in plants*. Eds. S.K. Datta, S. Muthukrishnan, CRC Press LLC, Boca Raton, 21-47.

BUGAUD, C.; OCRISSE, G.; SALMON, F.; RINALDO, D. Bruise susceptibility of banana peel in relation to genotype and post-climacteric storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, v. 87, p. 113–119, 2014.

BURKE, S. 1998. Windbreaks. Practical Farming series. Inkata Press.

BRANDT, K.; ŚREDNICKA-TOBER, T.; BARANSKI, M.; SANDERSON, R.; LEIFERT, C.; SEAL, C. 2014. Methods for Comparing Data across Differently Designed Agronomic Studies: Examples of Different Meta-analysis Methods Used to Compare Relative Composition of Plant Foods Grown Using Organic or Conventional Production Methods and a Protocol for a Systematic Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 7173–7180.

CALHAU, M. F. N. S. A influência da proximidade da biodiversidade da Mata Atlântica no perfil de compostos voláteis de bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) produzidas no Vale do Ribeira-SP. 155 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2014.

CARBONARO, M.; MATTERA, M.; NICOLI, S.; BERGAMO, P.; CAPPELLONI, M. Modulation of Antioxidant Compounds in Organic vs Conventional Fruit (Peach, *Prunus persica* L., and Pear, *Pyrus communis* L.). *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 5458-5462.

CARIS-VEYRAT, C; PHE AMIOT, M. J.; TYSSANDIER, V.; GRASSELLY, D.; BURET, M.; GUILLAND, M. J. C.; BOUTELOUP-DEMANGE, C.; BOREL, P. 2004. Influence of Organic versus Conventional Agricultural Practice on the Antioxidant Microconstituent Content of Tomatoes and Derived Purees; Consequences on Antioxidant Plasma Status in Humans. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 6503-6509.

CARPENTIER, S. C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extraction from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, v. 5, p. 2497-2507, 2005.

CARPENTIER SC, WITTERS E, LAUKENS K, VAN ONCKELEN H, SWENNEN R, PANIS B. Banana (*Musa spp.*) as a model to study the meristem proteome: acclimation to osmotic stress. *Proteomics*, v. 7, p. 92–105, 2007.

CASTELAN, F. P.; SARAIVA, L.A.; LANGE, F.; CORDENUNSI, B. R.; CHILLET, M. Effects of Black leaf streak disease and Sigatoka disease on fruit quality and maturation process of bananas produced on subtropical conditions of southern Brazil. *Crop Prot.*, v. 35, p. 127-131, 2012.

CASTRO-ALVES, V. C. O efeito da proximidade do fragmento florestal de Mata Atlântica sobre a área de cultivo no amadurecimento de bananas (*Musa acuminata* AAA cv. Nanicão) e nos compostos fenólicos das folhas de bananeiras. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2013.

CHABOUSSOU, F. 2006. Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos: novas bases de uma prevenção contra doenças: a teoria da Trofobiose. *Expressão Popular*, ISBN 85-873694-93-2, 320 p.

CHILLET, M.; ABADIE, C.; HUBERT, O.; CHILIN-CHARLES, Y. DE LAPEYRE DE BELLAIRE, L. Sigatoka disease reduces the greenlife of bananas. *Crop Prot.*, v. 28, p. 41-45, 2009.

CHILLET M., CASTELAN F.P., ABADIE C., HUBERT O., CHILIN-CHARLES Y., DE LAPEYRE DE BELLAIRE L. Effect of different levels of Sigatoka disease severity on banana pulp colour and early ripening. *Canadian journal of plant pathology*, v. 36, p. 48-53, 2014.

CHILLET, M.; HUBERT, O.; RIVES, M. J.; DE LAPEYRE DE BELLAIRE, L. Effects of the Physiological Age of Bananas on Their Susceptibility to Wound Anthracnose Due to *Colletotrichum musae*. *Fruits*, v. 90, n. 9, p. 1181-1185, 2006.

CHURCHILL, A. C. L. 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, v. 12, n. 4, p. 307–328.

CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening - Sucrose synthase and sucrose-phosphate synthase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, p.347-351, 1995.

CRAENEN, K. 1998. Black Sigatoka Disease of bananas and plantains – a reference manual. International Institute of Tropical Agriculture, ISBN: 978-131-156-1; p.

DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. Pathogenesis-Related Proteins in Plants. CRC Press, ISBN 9780849306976, 304 p, 1999.

DAUB, M. E., EHRENSHAFT, M. 2000. THE PHOTOACTIVATED CERCOSPORA TOXIN CERCOSPORIN: Contributions to plant disease and fundamental biology. Annu. Rev. Phytopathol., v. 38, p. 461-490.

DAVIDI, L.; LEVIN, Y.; BEN-DOR, S.; PICK, U. Proteome Analysis of Cytoplasmatic and Plastidic b-Carotene Lipid Droplets in *Dunaliella bardawil*. Plant Physiology, v. 167, p. 60–79, 2015.

D'HONT A, DENOEUDE F, AURY J-M et al. The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. Nature, v. 488, p. 213–217, 2012.

DU, C.; FAN, H.; GUO, S.; TEZUKA, T.; LI, J. Proteomic analysis of cucumber seedling roots subjected to salt stress. Phytochemistry, v. 71, p. 1450–1459, 2010.

ESTEVE, C.; D'AMATO, A.; MARINA, M. L.; GARCIA, M. C.; RIGHETTI, P. G. In-depth proteomic analysis of banana (*Musa spp.*) fruit with combinatorial peptide ligand libraries. Electrophoresis, v. 34, p. 207-214, 2013.

EWANÉ, C. A.; CHILLET, M.; CASTELAN, F.; BROSTAU, Y.; LASSOIS, L.; ESSOH NGANDO, J.; HUBERT, O.; CHILIN-CHARLES, Y.; LEPOIVRE, P.; LAPEYRE DE BELLAIRE, L. Impact of the extension of black leaf streak disease on banana susceptibility to post-harvest diseases. Fruits, v. 68, p. 351-365, 2013.

FAVRETO, R., MODEL, N. S., TONETTO, A. 2007. Sigatoka Negra, fatores de ambiente e sistemas agroflorestais em bananais do Rio Grande do Sul, Brasil. Pesq. Agrop. Gaúcha, Porto Alegre, v.13, n.1-2, p.95-104.

FIGUEIROA-YÁÑEZ, L.; CANO-SOSA, J.; CASTAÑO, E.; ARROYO-HERRERA, A.; CAAMAL-VELAZQUEZ, J. H.; SANCHEZ-TEYER, F.; LOPEZ-GÓMEZ, R.; SANTOS-BRIONES, C. D. L.; RODRÍGUEZ-ZAPATA. Phylogenetic relationships and expression in response to low temperature of a catalase gene in banana (*Musa acuminata* cv. "Grand Nain") fruit. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 109, p. 429-438. 2012.

FORDE, B. G.; LEA, P. J. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. Journal of Experimental Botany, . 58, p. 2339–2358, 2007.

FRANÇA, A. M. 2005. Vale do Ribeira (SP): Proposições econômicas, sociais, políticas e ambientais para o crescimento e desenvolvimento sustentável dos municípios da região administrativa de Registro. PUC-SP, São Paulo, 323 p.

FRISON, E. A.; CHERFAS, J.; HODGKIN, T. 2011. Agricultural Biodiversity Is Essential for a Sustainable Improvement in Food and Nutrition Security. *Sustainability*, v. 3, p. 238-253.

GANRY, J.; MEYER, J.P. Recherche d'une loi d'action de la température sur la croissance des fruits du bananier. *Fruits*, v. 30, p. 375–392, 1975.

GARCEZ, D., ROSA, L. F. S. 2007. O Sistema Agroflorestal e as alternativas para a fruticultura Rio-Grandense. *Rev. Bras. Agroecologia*, v.2, n.1, p. 471-474.

GAUHL, F., PASBERG-GAUHL, F., VUYLSTEKE, D., ORTIZ, R. Multilocal evaluation of black sigatoka resistance in banana and plantain. IITA, Ibadan, Nigeria IITA. Reaserch Guide, 47. 59 p. 1993.

GLIESSMAN, S.R. *Agroecology: Ecological Processes in Sustainable Agriculture*. Ann Arbor Press, Chelsea, MI, ISBN 1-57504-043-3, 1998.

GROVER, A. Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 31, p. 57–73, 2012.

HEINRICH, S.; VALENTIN, K.; FRICKENHAUS, S.; JOHN, U.; WIENCKE, C. Transcriptomic Analysis of Acclimation to Temperature and Light Stress in *Saccharina latissima* (Phaeophyceae). *PLoS ONE*, v. 7:8, 2011.

HU, H.; LIU, Y.; SHI, G.; LIU, Y.; WU, R.; YANG, A.; WANG, M.; Proteomic analysis of peach endocarp and mesocarp during early fruit development. *Physiologia Plantarum*, v. 142, p. 390–406, 2011.

JIMENEZ, M., VAN DER VEKEN, L., NEIRYNCK, H., RODRIGUEZ, H., RUIZ, O., SWENNEN, R. 2007 Organic banana production in Ecuador: Its implications on black Sigatoka development and plant–soil nutritional status. *Renewable Agriculture and Food Systems*, V. 22, p.297–306.

JOHNSTON M.L., MIERNYK, J.A.; RANDALL, D. D. Import, processing, and assembly of the alpha- and beta-subunits of chloroplast pyruvate dehydrogenase. *Planta* , v. 211, p. 72-76. 2000.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, p.323-329, 2006.

JULLIEN, A., 2000. Croissance, développement et qualité des fruits du bananier (*Musa* spp. groupe AAA cv 'grande naine'). Modélisation de la répartition des assimilats entre les fruits du régime. Thèse de PhD, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Paris, 92 p.

KAGEYAMA, P. Y., OLIVEIRA, R. S., FERRAZ, P. A., FURTADO, E. L., SOUZA, A. D., SEBBENN, A. M. 2002. Ganhos na seleção para a produtividade de látex em população natural de *Hevea brasiliensis* na Reserva Chico Mendes: estudo de caso das IAPs (Ilhas de alta produtividade). *Scientia Forestalis*, n. 61, p. 79-85.

KANG, J. G.; PYO, Y. J.; CHO, J. W.; CHO, M. H. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by K⁺ deficiency in *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics*, v. 4, p. 3549–3559, 2004.

KESARI, R.; TRIVEDI, P. K.; NATH, P. Gene expression of pathogenesis-related protein during banana ripening and after treatment with 1-MCP. *Postharvest Biology and Technology*, v. 56, p. 64–70, 2010.

KUMAR, D.; KLESSIG, D. F. High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *PNAS*, v. 100:26, 2003.

KUMAR, V.; MILLS, D. J.; ANDERSON, J. D.; MATOO, A. K. 2004. An alternative agriculture system is defined by a distinct expression profile of select gene transcripts and proteins. *PNAS*, v. 101, n. 29, p. 10535–10540.

INGVARDSEN, C.; VEIERSKOV, B. Ubiquitin- and proteasome-dependent proteolysis in plants. *Physiologia Plantarum*, v. 112, p. 451–459, 2001.

LESSOIS, L.; FRETTENGER, P.; DE LAPEYRE DE BELLAIRE, L.; LEPOIVRE, P.; JIJAKLI, H. Identification of Genes Involved in the Response of Banana to Crown Rot Disease. *MPMI*, v. 24, p. 143–153, 2011.

LEBORGNE-CASTEL, N.; ADAM, T.; BOUHIDEL, K. Endocytosis in plant–microbe interactions. *Protoplasma*, v. 247, p. 177–193, 2010.

LEE, J.; BRICKER, T. M.; LEFEVRE, M.; PINSON, S. R. M.; OARD, J. H. Proteomic and genetic approaches to identifying defence-related proteins in rice challenged with the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant Pathology*, v. T, p. 405-416, 2006.

LEHESRANTA, S. J.; KOISTINEN, K. M.; MASSAT, N.; DAVIES, H. V.; SHEPHERD, L. V. T.; MCNICOL, J. W.; CAKMAK, I.; COOPER, J.; LÜCK, L. KÄRENLAMPI, S. O.; PROFESSOR, C. L. *Proteomics*, V. 7, P. 597-604, 2007.

LEITNER-DAGAN, OVADIS, M.; SHKLARMAN, E.; ELAD, Y.; DAVID, D. R.; VAINSTEIN, A. Expression and Functional Analyses of the Plastid Lipid-Associated Protein CHRC Suggest Its Role in Chromoplastogenesis and Stress. *Plant Physiology*, v. 142, p. 233–244, 2006.

LI, X.; BAI, T.; LI, Y.; RUAN, X.; LI, H. Proteomic analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4-inoculated response to Fusarium wilts in the banana root cells. *Proteome Science*, v. 11:41, 2013.

LI, M.; XU, J.; QIU, Z.; ZHANG, J.; MA, F.; ZHANG, J. Screening and identification of resistance related proteins from apple leaves inoculated with *Marssonina coronaria* (Ell. & J. J. Davis). *Proteome Science*, v. 12:7, 2014.

LIANG, Y.; YUAN, Y.; LIU, T.; MAO, W.; ZHENG, Y. LI, D. Identification and computational annotation of genes differentially expressed in pulp development of *Cocos nucifera* L. by suppression subtractive hybridization. *BMC, Plant Biology*, v. 14, 2014.

LIU, J.; ZHANG, J.; XU, B.; ZHANG, J.; JIA, C.; WANG, J.; QIANG, Z. Expression analysis of banana MaECH11 during fruit ripening with different treatments. *African Journal of Biotechnology*, v. 11, p. 12951-12957, 2012.

LU, X.; ZHANG, F.; JIANG, W.; LIN, X.; CHEN, Y.; SHEN, Q.; WANG, T.; WU, S.; SUN, X.; TANG, K. Characterization of the first specific jasmonate biosynthetic pathway gene allene oxide synthase from *Artemisia annua*. *Molecular Biology Reports*, v. 39, p. 2267-2274, 2011.

LU, Y.; LIAO, D.; PU, J.; QI, Y.; XIE, Y. Proteome analysis of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 84, p. 163–171, 2013.

LOMBARDI-BOCCIA, G.; LUCARINI, M.; LANZI, S.; AGUZZI, A.; CAPPELLONI, M. Nutrients and Antioxidant Molecules in Yellow Plums (*Prunus domestica* L.) from Conventional and Organic Productions: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 90-94, 2004

MARRIOTT, J. Bananas – physiology and biochemistry of storage and ripening for optimum quality. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 13, p. 41–88. 1980.

MATTOO, A. K.; ABDUL-BAKI, A. Crop genetic responses to management: evidence of root-shoot communication. IN: UPHOFF N. et al. *Biological approaches to sustainable soil systems*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 221–230. 2006.

MATOS, A.P. de; BORGES, M. de F.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA, S. de O. Reação de genótipos de bananeira à infecção natural pela Sigatoka-amarela. *Magistra*, v.13. 2001.

MELO, C. V. DE ; SANTOS, J. D. ; LE MOAL, M. F. ; SOBRAL, J. P. ; CAMARGO, P. C. C. E ; KAGEYAMA, P. Y. Análise econômica de dois sistemas produtivos, um estudo de caso do bairro Guapiruvu, Sete Barras S. P. 2009. In: VII Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais, Brasília D. F. *Anais do VII Congresso Brasileiro de Sistemas Agroflorestais*. 2009.

MEREDITH, D.S. Banana Leaf Spot Disease (Sigatoka) Caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England, *Phytopathological Papers*, v. 11, 147 p., 1970.

MIRANDA, K. F., GOGOY, L. J. G., GOMES, J. M., BARBOSA, M. R. V. X. Características químicas do solo de bananal adubado com fertilizantes de eficiência aumentada. XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, p. 5428-5431. 2009.

MIRANDA, L. N., AZEVEDO, J. A., MIRANDA, J. C. C., GOMES, A. C. Calibração de métodos de análise de fósforo e resposta do feijão ao fósforo no sulco. *Pesq. agropec. bras.*, v. 37, n. 11, p. 1621-1627. 2002.

MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. Composição em carboidratos de alguns cultivares de banana (*Musa* spp) durante o amadurecimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.117(2), p.94-97, 1997.

MOTA, R.V.; CORDENUNSI, B.R.; NASCIMENTO, J.R.O.; PURGATTO, E.; ROSSETTO, M. R. M.; LAJOLO, F. M. Activity and expression of banana starch phosphorylases during fruit development and ripening. *Planta*, v.216, p.325-333, 2002.

MOREIRA, R.S. Banana: teoria e prática de cultivo. São Paulo: Fundação Cargill. 1 CD-Rom, 1999.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA, G. A. B., KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, p. 853-858.

MÜLLER, V.; LANKES, C.; ZIMMERMANN, B. F.; NOGA, G.; HUNSCHE, M. 2013. Centelloside accumulation in leaves of *Centella asiatica* is determined by resource partitioning between primary and secondary metabolism while influenced by supply levels of either nitrogen, phosphorus or potassium. *Journal of Plant Physiology*, v. 170, p. 1165–1175.

NASCIMENTO, J.R.O.; VIEIRA-JUNIOR, A.; BASSINELLO, P.Z.; CORDENUNSI, B.R.; MAINARDI, J.A.; PURGATTO, E.; LAJOLO, F.M. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biol. Technol.* v.40, p. 41-47, 2006.

NASCIMENTO, T. P. O efeito da biodiversidade nativa da Mata Atlântica sobre o metabolismo de amadurecimento da banana (*Musa acuminata* AAA, Cavendish, cv. Nanicão). Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 187 p., 2015.

NATH, P.; TRIVEDI, P. K.; SANE, V. A.; SANE, A. P. Role of ethylene in fruit ripening. *In: Ethylene Action in Plants*, ISBN 978-3-540-32846-9, 2006.

NEELAM, A.; CASSOL, T.; MEHTA, R. A.; ABDUL-BAKI, A. A.; SOBOLEV, A. P.; GOYAL, R. K.; ABBOTT, J.; SEGRE, A. L.; HANDA, A. K.; MATOO, A. K. 2008. A field-grown transgenic tomato line expressing higher levels of polyamines reveals legume cover crop mulch-specific perturbations in fruit phenotype at the levels of metabolite profiles, gene expression, and agronomic characteristics. *J. Exp. Bot.*, v. 59, n. 9, p. 2337-2346.

NOMURA, E. S.; PENTEADO, L. A. C.; GARCIA, V. A.; DAMATO JUNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J.; SAES, L. A. Produção integrada de Frutas (PIF) Banana: futuro ou realidade? 2010.

O'LEARY, B.; PARK, J.; PLAXTON, W. C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem. J.*, v. 436, p. 15-34, 2011.

ONG WD, VOO LYC, KUMAR VS. De Novo Assembly, Characterization and Functional Annotation of Pineapple Fruit Transcriptome through Massively Parallel Sequencing. *PLoS ONE*, v. 7 (10), 2012.

PALMA, J. M.; CORPAS, F. J.; DEL RIO, A. Proteomics as na approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *Journal of Proteomics*, v. 74, P. 1230 – 1243, 2011.

PERONI, F.H.G., Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas que atuam no metabolismo amido-sacarose. Tese de Doutorado (FCF/USP), 2007.

PEACOCK, B.C.; BLAKE, J.R. Some effects of non-damaging temperatures on the life and respiratory behavior of bananas. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, v. 27, p. 147–168, 1970. PURGATTO, E., Lajolo, F.M., Nascimento, J.R.O.; Cordenunsi, B.R. Inhibition of α -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta*, v.212, p.823-828, 2001.

PURGATTO, E.; LAJOLO, F.M.; NASCIMENTO, J.R.O.; CORDENUNSI, B.R. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta*, v. 212, p. 823-828, 2001.

PURGATTO, E.; LAJOLO, F.M.; NASCIMENTO, J.R.O.; CORDENUNSI, B. R. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. *Journal of Plant Physiology*, v. 159, n. 10, p. 1105-1111, 2002.

QIN, Q.; KAAS, Q.; ZHANG, L.; XU, K.; LI, N.; ZHENG, W.; LAI, Q. Isolation and Characterization of A Cytosolic Pyruvate Kinase cDNA From Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *Plant Mol Biol Rep*, v. 31, p. 109–119, 2013.

RAMSEY, M.D.; DANIELLS, J.W.; ANDERSON, V. J. Effects of sigatoka leaf spot (*Mycosphaerella musicola* Leach) on fruit yield, field ripening and greenlife of bananas in North Queensland. *Scientia Horticulturae*, v. 41, p. 305–313. 1990.

REY, P.; GILLET, B.; ROMER, S.; EYMERY, F.; MASSIMINO, J.; PELTIER, G.; KUNTZ, M. Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *The Plant Journal*, v. 21, p. 483-494, 2000.

RIEMANN, M.; HAGA, K.; SHIMIZU, T.; OKADA, K.; ANDO, S.; MOCHIZUKI, S.; NISHIZAWA, Y.; YAMANOUCHI, U.; NICK, P.; YANO, M.; MINAMI, E.; TAKANO, M.; YAMANE, H.; IINO, M.; Identification of rice Allene Oxide Cyclase mutants and the function of jasmonate for defence against *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Journal*, v. 74, p. 226–238, 2013.

RUBIO, M.; RODRÍGUEZ-MORENO, L.; BALLESTER, A. R.; DE MOURA, M. C.; BONGHI, C. CANDRESSE, T.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P. Analysis of gene expression changes in peach leaves in response to Plum pox virus infection using RNA-Seq. *Molecular Plant Pathology*, v. 16, p. 164–176, 2015.

SANTOS, P.; FORTUNATO, A.; RIBEIRO, A.; PAWLOSK, K. Chitinases in root nodules. *Plant Biotechnology*, v. 25, 2008.

SARAIVA, L. A.; CASTELAN, F. P.; SHITAKUBO, R.; HASSIMOTO, N. M. A.; PURGATTO, E.; CHILLET, M.; CORDENUNSI, B. R. Black leaf streak disease affects starch metabolism in banana fruit. *J. Agric. Food Chem.*, v. 61, p. 5582-5589, 2013.

SCHLINDWEIN, J. A. Calibração de métodos de determinação e estimativa de doses de fósforo e potássio em solos sob sistema de plantio direto. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 169p, 2003.

SINGH, A. D. R. K.; KUMAR, S.; KUMAR, S. An Effective and Beneficial Plant Growth Promoting Soil Bacterium “*Rhizobium*”: A Review. *Annals of Plant Sciences*, v. 4, 2015.

SHIGA, T. M.; SOARES, C. A.; NASCIMENTO, J. R. O.; PURGATTO, E.; LAJOLO, F. M.; CORDENUNSI, B. R. Ripening-associated changes in the amounts of starch and non-starch polysaccharides and their contributions to fruit softening in three banana cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 8, p. 1511-1516, 2011.

SHIOJIRI, K.; KISHIMOTO, K.; OZAWA, R.; KUGIMIYA, S.; URASHIMO, S.; ARIMURA, G.; HORIUCHI, J.; NISHIOKA, T.; MATSUI, K.; TAKABAYASH. Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: An approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. PNAS, 103:45, 2006.

SOARES, C. A., Avaliação comparativa de características estruturais do amido e enzimas relacionadas a sua degradação em cultivares de banana com padrão distinto do modelo representado pela cultivar nanicão. Tese de Doutorado (FCF/USP), 2009.

SEYMOUR, G.; TAYLOR, J.; TUCKER, G. Biochemistry of Fruit Ripening. London: Chapman & Hall, 454p., 1993.

SPONHOLZ, C., BATISTA, U.G., ZAMBOLIM, L., SALOMÃO, L.C.C. & CARDOSO, A.A. Efeito do tratamento hidrotérmico e químico de frutos de banana 'Prata' no controle da antracnose em pós-colheita. Fitopatologia Brasileira 29:480-485, 2004.

SRIVASTAVA, M. K.; DWIVEDI, U. N. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. Plant Science, v. 158, p. 87–96, 2000.

STOVER, R.H. A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot. Tropical Agriculture (Trinidad) 48, 185–196. 1971.

STOVER, R. H. Sigatoka Leaf Spots of Bananas and Plantains. Plant Disease, v. 64, n. 8, p.750-756. 1980.

SWAIN, T. , HILLS, W.E. J. Sci. Food Agric., v. 10, p. 63-68, 1959.

TANG, W.; ZHU, S.; LI, L.; LIU, D.; IRVING, D. Differential expressions of PR1 and chitinase genes in harvested bananas during ripening, and in response to ethephon, benzothiadizole and methyl jasmonate. Postharvest Biology and Technology, v. 57, p. 86–91, 2010.

TANG, Y.; KUANG, J.; WANG, F.; CHEN, L.; HONG, K.; XIAO, Y.; XIE, H. LU, W.; CHEN, J. Molecular characterization of PR and WRKY genes during SA- and MeJA-induced resistance against Colletotrichum musae in banana fruit. Postharvest Biology and Technology, v. 79, p. 62–68. 2013.

TEIXEIRA, L. A. J., ZAMBROSI, F. C. B., NETO, J. E. B. 2007. Avaliação do estado nutricional de bananeiras do subgrupo Cavendish no estado de São Paulo: normas dris e níveis críticos de nutrientes. Rev. Bras. Frutic. v.29 n.3, p. 613-620.

TOLEDO, T. T.; NOGUEIRA, S. B.; CORDENUNSI, B. R.; GOZZO, F. C.; PILAU, E. J.; LAJOLO, F. M.; NASCIMENTOS, J. R. O. Proteomic analysis of banana fruit reveals proteins that are differentially accumulated during ripening. Postharvest Biology and Technology, v. 70, p. 51-58. 2012.

TOMAS F. L. A influência da biodiversidade florestal na ocorrência de insetos-praga e doenças em cultivos de tomate no município de Apiaí-SP. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 90 p. 2010.

VAN DER MORTEL, J. E.; VOS, R. C. H.; DEKKERS, E.; PINEDA, A.; GUILLOD, L.; BOUWMEESTER, K.; VAN LOON, JOOP.; DICKE, M.; RAAIJMAKERS, J. M. Metabolic and Transcriptomic changes induced in Arabidopsis by the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* SS101. Plant Physiology, DOI:10.1104/pp.112.207324, 2012.

VANHOVE, A. C.; VERMAELEN, W.; PANIS, B.; SWENNEN, R.; CARPENTIER, S. D. Screening the banana biodiversity for drought tolerance: can an in vitro growth model and proteomics be used as a tool to discover tolerant varieties and understand homeostasis. Frontiers in Plant Science. V. 3:176, 2012.

VEERANAGAMALLAIAH G.; JYOTHSNAKUMARI, G. THIPPESWAMY, M.; REDDY, P. C. O.; SURABHI, G. K.; SRIRANGANAYAKULU, G.; MAHESH, Y.; RAJASEKHAR, B.; MADHURAREKHA, SUDHAKAR, C. Proteomic analysis of salt stress responses in foxtail millet (*Setaria italica* L. cv. Prasad) seedlings. Plant Science, v. 175, p. 631–641, 2008.

VEGA-GARCÍA, M. O.; LÓPEZ-ESPINOZA, G. ONTIVEROS, J. C.; CARO-CORRALES, J. J.; VARGAS, F. D.; LÓPEZ-VALENZUELA, J. A. Changes in Protein Expression Associated with Chilling Injury in Tomato Fruit. JASHS, v. 135, p. 83-89, 2010.

VIVAN, J. L. Bananicultura em Sistemas Agroflorestais no Litoral Norte do RS. Agroecol.e Desenv.Rur.Sustent., v.3, n.2, p. 17-26, 2002.

VIERS, J. H.; WILLIAMS, J. N.; NICHOLAS, K. A.; BARBOSA, O.; KOTZÉ, I.; SPENCE, L.; WEBB, L. B.; MERENLENDER, A.; REYNOLDS, M. Conservation Letters, v. 6, p. 287–299. 2013.

VOGT, J.; SCHILLER, D.; ULRICH, D.; SCHWAB, W.; DUNEMANN, F. Identification of lipoxygenase (LOX) genes putatively involved in fruit flavour formation in apple (*Malus × domestica*). *Tree Genetics & Genomes*, v. 9, p. 1493-1511, 2013.

WANG, P.; SUN, X.; XIE, Y.; LI, M.; CHEN, W.; ZHANG, S.; LIANG, D.; MA, F. Melatonin regulates proteomic changes during leaf senescence in *Malus hupehensis*. *J. Pineal Res.*, v. 57, p. 291–307, 2014.

WANG, C.; ZHU, M.; DUAN, L.; YU, H.; CHANGA, X.; LI, L.; KANG, H.; FENG, Y.; ZHU, H.; HONG, Z.; ZHANG, Z. Lotus japonicus Clathrin Heavy Chain 1 Is Associated with ROP6 GTPase and Involved in Nodule Formation. *Plant Physiology*, DOI:10.1104/pp.114.256107, 2015.

WERREN, J. Symbionts provide pesticide detoxification. *PNAS*, v. 109:22, 2012.

XU, Q.; NI, H.; CHEN, Q.; SUN, F.; ZHOU, T.; LAN, Y.; ZHOU, Y. Comparative Proteomic Analysis Reveals the Cross-Talk between the Responses Induced by H₂O₂ and by Long-Term Rice Black-Streaked Dwarf Virus Infection in Rice. *PLoS ONE*, v. 8:11, 2013.

ZAPATA, P. J.; MARTINEZ-ESPLÁ, A.; GUILLÉN, F.; DÍAZ-MULA, H. M.; MARTINEZ-ROMERO, D.; SERRANO, M.; VALEROA, D. Preharvest application of methyl jasmonate (MeJA) in two plumcultivars. 2. Improvement of fruit quality and antioxidant systems during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, v. 98, p. 115–122, 2014.

BananaLink

<http://www.bananalink.org.uk/>

Fair Trade Foundation

<http://www.fairtrade.org.uk> acesso em 31/05/2012

FAOSTAT

<http://faostat.fao.org/> acesso em 19/01/2013

Fruta Leve

<http://frutaleve.com.br> acesso em 31/05/2012

Fundação Banco do Brasil. Fruticultura – Banana. Desenvolvimento Regional Sustentável, v. 3, 2010. <http://www.bb.com.br/docs/pub/inst/dwn/Vol3FruticBanana.pdf> acesso em 31/05/2012

IEA - Sér. inf. estat. Agric SP, v.20, n.1, p.1-127, 2009. <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/publicar/anuario2008/Estatisticas.pdf> acesso em 31/05/2012

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE
www.ibge.gov.br acesso em 19/01/2013

IUBMB - INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>

Keggpathways
<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

MMA – Ministério do Meio Ambiente
<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>

Pacific Coast 'Wax Tip' Eco Bananas
<http://www.eco-banana.com.au> acesso em 31/05/2012

S.O.S. Mata Atlântica
<http://www.mapas.sosma.org.br> acesso em 31/05/2012

World Resources Institute
<http://www.wri.org/>