

Investigação histológica da interação *Mycosphaerella fijiensis* x Banana (*Musa acuminata*) com ênfase no “Burst” oxidativo

Maria de Jesus Barbosa Cavalcante

Embrapa Acre, Caixa Postal 321, CEP: 69900-056, Rio Branco – AC. E-mail: maju@cpafac.embrapa.br

A Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* (M. Morelet) (anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton Crous & Braun) é a doença mais prejudicial e economicamente mais importante que afeta banana e plântanos (*Musa* spp.) (Marin et al., 2003).

O patossistema *Musa acuminata* x *Mycosphaerella fijiensis* é pouco documentado no que se refere ao entendimento no âmbito celular dos mecanismos de defesa dessa interação.

A escassez desses estudos é ligada, em parte, às características biológicas do hospedeiro e do patógeno, tornando o estudo da interação muito difícil e demorado (Donzelli et al., 2007). A complexidade deste patossistema exige alguns desafios que desestimulam a busca de informações que podem contribuir para o melhor entendimento da interação *Musa* x *M. fijiensis*, dentre estes, incluem o desenvolvimento lento dos sintomas que podem chegar até dois meses sob ótimas circunstâncias de crescimento, taxa de crescimento do fungo *in vitro* geralmente lenta, dificuldade de produzir esporos para a inoculação, circunstâncias ambientais restritas exigidas para a infecção e o desenvolvimento bem sucedido da doença (Donzelli et al., 2007).

Contudo, a escassa literatura revela que os mecanismos de defesa podem ser atribuídos a fatores fisiológicos e bioquímicos após a penetração estomática do tecido do hospedeiro (Beveraggi et al., 1995; Hoss et al., 2000).

Baseado em análises cromatográficas (Beveraggi, 1992; Beveraggi et al., 1995), hipotetizaram que compostos pré-formados de natureza fenólica podem estar relacionados com a resistência de plantas. Outros autores sugerem a presença de fitoalexinas como mecanismo de resistência, além dos mecanismos de natureza morfológica como a presença de lignina e suberina que podem inibir a penetração do patógeno na planta hospedeira (Lepoivre et al., 1990). Hoss et al., (2000) evidenciaram a presença de fitoalexinas na variedade de bananeira resistente, a qual bloqueou o desenvolvimento do fungo após elicitação pela fitotoxina 2,4,8-trihidroxitetralona (2,4,8-THT).

Existem ainda relatos que a densidade e o tamanho dos estômatos são duas características comumente associadas às respostas das plantas em relação aos agentes patogênicos. Uma baixa densidade de pequenos estômatos poderia constituir uma maior barreira à penetração dos agentes infecciosos, enquanto que uma forte densidade de grandes estômatos facilitaria a penetração desses agentes (Vásquez et al., 1990).

Portanto, esse patossistema complexo necessitou ser investigado com maior profundidade, visando obter informações que possam esclarecer melhor o papel de alguns mecanismos de defesa que a planta desenvolve face ao ataque desse patógeno.

A interação patógeno-hospedeiro no sistema *Musa* x *M. fijiensis* apresenta três fenótipos possíveis: susceptibilidade, resistência parcial e resistência total, que foram definidos a partir de observações em condições de campo (Fouré et al., 1990).

Naturalmente as plantas possuem estratégias de defesa contra vários estresses bióticos, sendo estas reguladas por dois mecanismos de defesa: a) resistência não hospedeira, que é eficaz contra várias espécies patogênicas (raças, biótipos, *pathovars*) de um único patógeno e b)

resistência gene a gene, onde a planta pode resistir à infecção de um ou algumas raças do patógeno (Király et al., 2007). Este tipo de resistência específica está associada com o mecanismo de resposta de hipersensibilidade (HR) das plantas (Resende et al., 2003).

A liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) através do consumo de oxigênio assim chamado “burst” oxidativo, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH) e radicais hidroxiperoxila (HO_2) em plantas, têm demonstrado ser a primeira resposta de defesa da planta ao ataque do patógeno (Apel et al., 2004; Torres, et al., 2006, Wang et al., 2007).

O “burst” oxidativo ocorre como resposta de defesa da planta após o reconhecimento do patógeno conduzindo à reação de hipersensibilidade (Baker et al., 1995; Sasabe et al., 2000; Dat et al., 2003).

A peroxidase tem um aumento da atividade durante ou após o ataque do patógeno na planta hospedeira (Montalbini et al., 1995; Milosevic et al., 1996). Além de fazer parte da produção de ROS (Mika et al., 2004), participa desta resposta precoce de defesa onde ajudam a proteger as células dos danos de ROS como parte de um complexo sistema antioxidante mobilizado pela planta (Gay et al., 2000; Hiraga et al., 2001).

A produção de ROS está envolvida em muitos outros patossistemas, tais como: trigo x *Micosphaerella graminicola* (Shetty et al., 2003); cevada/trigo x *Blumeria graminis* (Trujillo et al., 2004); *Lycopersicon* x *Oidium neolycopersic* (Mlickova et al., 2004) e arroz x *Magnaporthe grisea* (Egan et al., 2007).

Apesar do impacto econômico da Sigatoka-negra em bananeira, o patossistema *M. fijiensis* x *M. acuminata* é pouco documentado quanto ao entendimento no âmbito celular dos mecanismos de defesa dessa interação.

Outros autores sugerem a presença de fitoalexinas como mecanismo de resistência à penetração do patógeno na planta hospedeira (Lepoivre et al., 1990). Hoss et al., (2000) evidenciaram a presença de fitoalexinas na variedade de bananeira resistente, a qual bloqueou o desenvolvimento do fungo após elicitação pela fitotoxina 2,4,8-trihidroxitetralona (2,4,8-THT).

Por meio de metodologias adaptadas de outros patossistemas, selecionamos o isolado de *M. fijiensis* adequado para realizarmos os estudos de interação, onde evidenciamos que a densidade estomática não tem nenhuma relação com a resistência de *M. acuminata* à *M. fijiensis*. Não foi observada nenhuma presença de compostos fenólicos que poderiam estar relacionados com a resistência de algumas variedades de bananeiras, nem a presença de calose e lignina como mecanismos de defesa estruturais.

Os estudos dos mecanismos de defesa na interação do patossistema *M. acuminata* x *M. fijiensis*, evidenciou o envolvimento da produção de ROS, no caso específico, o H_2O_2 da atividade da enzima peroxidase e ocorrência da reação de hipersensibilidade na variedade Calcutta 4 (R), fazendo parte de um conjunto que estão todos interligados no papel dos mecanismos oxidativos de defesa que esta variedade desenvolveu contra o ataque do fungo.

Esses resultados confirmam a hipótese de que a resistência de *Musa acuminata* é caracterizada após a penetração do fungo na planta pela interação incompatível.

Outro aspecto foi a presença de espessamento da parede celular nas variedades Pisang Madu (PR) e Calcutta 4 (R), relacionado à resistência dessas duas variedades ao ataque de *M. fijiensis*.

Foi evidenciado o papel de toxinas produzidas pelo fungo no início da infecção nas variedades de bananeiras testadas, confirmando a hipótese de Hoss et al., 2000. Um estudo mais preciso da toxina produzida pelo fungo (2,4,8-trihidroxitetralona) poderia ser realizado por meio

da visualização *in situ* pela análise espectral e, assim, realizar um acompanhamento *in situ* através de uma cinética de infecção nessas variedades de bananeira dos diferentes acontecimentos celulares que estão relacionados com a toxina.

Referências Bibliográficas

APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*; 55:373-399. 2004.

BAKER, C. J., ORLANDI E. W. Active oxygen in plant pathogenesis *Annu Rev Phytopathol*; 33:29-321. 1995.

BEVERAGGI, A. Etude des interactions hôte-parasite chez des bananiers sensibles et résistants inoculé par *Cercospora fijiensis* responsables de la maladies des raies noires. Thèse de 3^{ème} cycle, Université de Montpellier II, USTL,. 1992.

BEVERAGGI, A., MOURICHON, X., SALLE, G. Etude comparée des premières étapes de l'infection chez les bananiers sensibles et résistants infectés par *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) agent responsable de la maladies des raies noires. *Canadian Journal of Botany*; 73:1328-1337. 1995.

DAT, J. F., PELLINEN, R., BEECKMAN, T., VAN DE COTTE, B., LANGEBARTELS, C., KANGASJÄRVI, J., ET AL. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *The Plant Journal*; 33, 621–632. 2003.

DONZELLI, B. G. G., CHURCHILL, A. C. L. A Quantitative Assay Using Mycelial Fragments to Assess Virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. *Phytopathology*; 97:916- 929. 2007.

EGAN, M. J., WANG, Z-Y., JONES, M A., SMIRNOFF, N., TALBOT, N J. Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *PNAS* July 10, vol. 104 no. 28, pp. 11772-11777. 2007.

FOURE, E, MOULIOM PEFOURA, A ET MOURICHON X. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantain à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Au Cameroun. Caractérisation de la résistance au champ de bananiers appartenant à divers groupes génétiques. *Fruits*; 45:339-345. 1990.

GAY, P.A, TUZUN, S. Temporal and spatial assessment of defense responses in resistant and susceptible cabbage varieties during infection with *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. *Physiol Mol Plant Pathol*; 57:201–210. 2000.

HIRAGA, S, SASAKI, K, ITO H, OHASHI, Y, MATSUI H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*; 42:462-468. 2001.

HOSS, R, HELBIG, J AND BOCHOW, H. Function of Host and Fungal Metabolites in Resistance Response of Banana and Plantain in the Black Sigatoka Disease Pathosystem (*Musa* spp.- *Mycosphaerella fijiensis*). *J Phytopathology*; 148:387-394. 2000.

KIRALY, L, BARNA B, AND KIRALY Z. Plant Resistance to Pathogen Infection: Forms and Mechanisms of Innate and Acquired Resistance *J. Phytopathology*; 155:385-396. 2007.

- LEPOIVRE, P, ACUNA, CHP. Production of toxins by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and induction of antimicrobial compounds in banana: their relevance in breeding for resistance to black sigatoka. In: Fullerton RA, Stover RH (eds) Sigatoka leaf spot diseases of bananas: Proc Int Workshop, San José, Costa Rica, March 28-April 1, 1989. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France, pp 201-207. 1990.
- MARÍN, DH, ROMERO, RA, GUZMÁN, M, SUTTON, TB. Black sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*; 87:208-222. 2003.
- MIKA, A, MINIBAYEVA, F, BECKETT, R & LÜTHJE, S. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*; 3:173-193. 2004.
- MILOSEVIC, N., SLUSARENKO, A. J. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean, *Physiol. Mol. Plant Pathol*; 49 143–158. 1996.
- MLÍCKOVÁ, K., LUHOVÁ, L., LEBEDA, A., MIESLEROVÁ, B., PEC, P. Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry*; 42 753-761. 2004.
- MONTALBINI, P., BUONAURO, R., UMESH-KUMAR, N.N. Peroxidase activity and isoperoxidase pattern in tobacco leaves infected with tobacco necrosis virus and other viruses inducing necrotic and non necrotic alternations, *J. Phytopathol*; 143 295–301. 1995.
- RESENDE, MLV, SALGADO, SML & CHAVES, ZM. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*; 28:123-130. 2003.
- SASABE, M., TAKEUCHI, K., KAMOUN, S., ICHINOSE, Y., GOVERS, F., TOYODA, K., ET AL. Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *European Journal of Biochemistry*; 267, 5005–5013. 2000.
- SHETTY, N. P., KRISTENSEN, B. K., NEWMAN, M. A., MØLLER, K., GREGERSEN, P. L., & JØRGENSEN, H. J. L. Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*; 62, 333-46. 2003.
- TORRES, MA, JONES, J. DG, & DANGL JL. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*; 141:373-378. 2006.
- TRUJILLO, M., KOGEL, KH., HÜCKELHOVEN, R. Superoxide and Hydrogen Peroxide Play Different Roles in the Nonhost Interaction of Barley and Wheat with Inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 17, No. 3, pp. 304-312. 2004.

WANG, CF, HUANG, L, BUCHENAUER H, HAN QM, ZHANG HC, KANG ZS.
Histochemical studies on the accumulation of reactive oxygen species (O_2^- and H_2O_2) in the incompatible and compatible interaction of wheat—*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*.
Physiological and Molecular Plant Pathology; 71:230-239. 2007.