

Localização de Peróxido de Hidrogênio Durante a Resposta de Defesa de Tomateiro Contra *Stemphylium solani*

Jânia L. S. Bentes^{1**} & Kiyoshi Matsuoka²

¹Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Otávio, 3000, CEP 69077-000, Manaus, AM, e-mail: janialilia.bentes@bol.com.br; ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36570-000, Viçosa, MG

(Aceito para publicação em 09/03/2005)

Autor para correspondência: Jânia Lília da Silva Bentes

BENTES, J.L.S. & MATSUOKA, K. Localização de peróxido de hidrogênio durante a resposta de defesa de tomateiro contra *Stemphylium solani*. Fitopatologia Brasileira 30:643-646. 2005.

RESUMO

Peróxido de hidrogênio foi localizado citoquimicamente em virtude de sua reação com cloreto de cério, evidenciando H₂O₂ produzido em tomateiros (*Lycopersicon esculentum*) resistente e suscetível a *Stemphylium solani*. Precipitados de peridróxido de cério foram constatados nas células do mesofilo, na parede em contato com as hifas do patógeno. Portanto, não tendo sido observada reação diferencial entre as cultivares quanto ao acúmulo de H₂O₂, e, sendo sua presença detectada num dos controles negativos, sugere-se que este composto possivelmente não participe diretamente da resistência manifestada pela c.v. 'Motelle' contra *S. solani*, no tocante ao fortalecimento da parede celular.

Palavras-chave adicionais: resistência, parede celular, *Lycopersicon esculentum*, H₂O₂.

ABSTRACT

Localization of hydrogen peroxide during defense response of tomato against *Stemphylium solani*

Two tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars were studied due to their reaction with cerium perhydroxide, verifying H₂O₂ produced in tomato plants both resistant and susceptible to *Stemphylium solani*. There was an accumulation of cerium perhydroxide on the wall of mesophyll cells in contact with the pathogen hyphae. Different reactions were not found in the two tomato cultivars concerning H₂O₂ accumulation. Since cerium perhydroxide was detected on negative control as well, it is suggested that H₂O₂ may possibly not participate in the resistance of c.v. 'Motelle' to *S. Solani*, in terms of cell wall buttressing.

Additional keywords: resistance, cell wall, *Lycopersicon esculentum*, H₂O₂.

A mancha-de-estenfílio causada por *Stemphylium solani* Weber. afeta plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) em diferentes estádios de desenvolvimento. Os sintomas são caracterizados por lesões necróticas marrom-acinzentadas, circundadas por halo amarelo no limbo foliar. O patógeno pode atacar cerca de vinte espécies de solanáceas cultivadas como pimentão (*Capsicum annuum* L.), jiló (*Solanum gilo* Raddi) e batatinha (*Solanum tuberosum* L.) (Mizubuti & Brommonschenkel, 1996). No entanto, os danos causados dependem da suscetibilidade das cultivares plantadas. O uso de variedades resistentes é a medida de controle mais eficiente contra o fungo (Mizubuti & Brommonschenkel, 1996).

No início do desenvolvimento de uma doença, as plantas podem induzir uma série de respostas de defesa, incluindo a rápida geração, de "espécies reativas de oxigênio"

(reactive oxygen species, ROS) tais como O₂⁻, H₂O₂ e OH⁻. Sabe-se que ROS estão envolvidas na ligação de proteínas estruturais da parede celular, ativação da transcrição de genes, respostas de resistência induzida, deterioração de membranas, indução de morte celular e no desenvolvimento de lesões necróticas (Lamb & Dixon, 1997; Hückelhoven & Kogel, 1998; Scandalios, 2002). Diversos estudos têm sido efetuados visando elucidar o papel das espécies reativas de oxigênio nas respostas de defesa das plantas a patógenos. Alguns relatos enfatizam a importância da ligação oxidativa de proteínas e compostos fenólicos na parede celular, mediada pelo H₂O₂ (Quiroga *et al.*, 2000; Hilaire *et al.*, 2001; Kozłowska *et al.* 2001). Outros mecanismos relacionados com o fortalecimento da parede celular, como lignificação (Czaninski *et al.* 1993; Otte & Barz, 1996) e formação de papilas (Cadena-Gomez & Nicholson, 1987; Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Hückelhoven *et al.*, 1999), também foram relacionados com a síntese de H₂O₂.

A detecção de H₂O₂ pode indicar o envolvimento de

*Parte de tese de doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa (2002)

**Bolsista do CNPq

proteínas e outros compostos relacionados com o fortalecimento da parede celular, contribuindo com a resistência da planta ao ataque de patógenos. O estudo do envolvimento deste composto no processo de infecção de *Stemphylium solani* em tomateiro é de interesse para ajudar a esclarecer quais mecanismos de resistência estão envolvidos neste patossistema. Dessa forma, efetuou-se o presente estudo com o objetivo de localizar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) associado à parede celular de tomateiro, durante a reposta de defesa ao ataque de *S. solani*.

Foram utilizados tomateiros da cultivar Motelle, resistente à mancha de estenfilio, e da cultivar Moneymaker, suscetível. A semeadura foi feita em bandejas de plástico (45 x 30 x 9,5 cm) contendo como substrato solo, areia e esterco de curral, na proporção de 3:1:1, pré-tratado com brometo de metila.

Foi usado um variante esporulante de *S. solani*, S701-5, disponível no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura V8 (200 ml de suco V8; 17g de ágar; 800 ml de água destilada), por dez dias em temperatura de 25 °C. A suspensão de inóculo foi obtida a partir da adição de água destilada nas placas de Petri contendo a colônia do fungo, a qual foi levemente raspada com um pincel de cerdas macias para a liberação dos conídios. O líquido foi recolhido em um béquer e a suspensão ajustada para 10^4 conídios/ml. A inoculação foi feita em mudas de tomateiro com cerca de 15 dias de idade, aplicando-se gotas de 30 μ l de suspensão de conídios, em diferentes locais nas folhas, em seguida as gotas foram recobertas com disco de papel de filtro esterilizado, com cerca de 0,5 cm², para evitar o escorrimento. Este método foi usado visando facilitar a coleta de amostras, pela localização dos pontos de inoculação e do patógeno nos tecidos do hospedeiro. Após as inoculações, as plantas foram mantidas em câmara de nevoeiro a 25 °C, até o término da coleta das amostras.

Para a localização de peróxido de hidrogênio, foi utilizado o método descrito por Bestwick *et al.* (1997), que se baseia na reação de H_2O_2 com $CeCl_3$, produzindo precipitados de peridróxido de cério, nos sítios de produção ou acúmulo de H_2O_2 . As amostras foliares foram coletadas 48 h após a inoculação (h.a.i.), das quais foram retirados fragmentos de 2 mm² e incubados durante 1 h em $CeCl_3$, a 5mM, preparado em ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfônico (MOPS) 50 mM, pH 7.2. Em seguida, os tecidos foram fixados durante 1 h em glutaraldeído a 1,25% (v/v) e paraformaldeído a 1,25% (v/v), preparado em tampão cacodilato de sódio a 0,05M, a pH 7.2. Após a fixação, os tecidos foram lavados duas vezes no tampão de cacodilato de sódio, durante 10 min, e pós-fixados durante 45 min em OsO_4 (tetróxido de ósmio) a 1%, e novamente lavados, como já descrito. Após este processamento, as amostras foram desidratadas em série alcóolica e incluídas em resina Spurr, como se faz no procedimento convencional para microscopia eletrônica. Os cortes ultrafinos foram confeccionados em ultramicrotomo marca Sorval MT2-B, equipado com navalha de diamante,

montados em telinhas de cobre, contrastados durante 30 min com acetato de uranila 2% em solução aquosa, seguindo-se de citrato de chumbo, durante 15 min. Os cortes foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss.

Dois tipos de controle foram usados neste estudo. O primeiro foi amostras não inoculadas das duas cultivares e tratadas com $CeCl_3$. O segundo, amostras inoculadas, das duas cultivares porém não tratadas com $CeCl_3$.

Precipitados de peridróxido de cério foram constatados na parede de células do mesofilo em tecidos infetados da cultivar resistente (Figura 1 A e B) e da cultivar suscetível (Figura 1 C e D) em contato com hifas do patógeno, indicando a presença no local de H_2O_2 , independentemente de a planta ser resistente ou suscetível. No primeiro controle, no qual amostras das cultivares resistente e suscetível foram tratadas com $CeCl_3$ mas não foram inoculadas com o patógeno, observou-se a deposição de material eletrondenso na parede celular das cultivares, correspondente a precipitados de peridróxido de cério, indicando a presença de H_2O_2 . O conteúdo celular destas amostras apresentou-se preservado, com cloroplastos e mitocôndrias intactos (Figura 2 A e B). No segundo controle, no qual amostras das cultivares

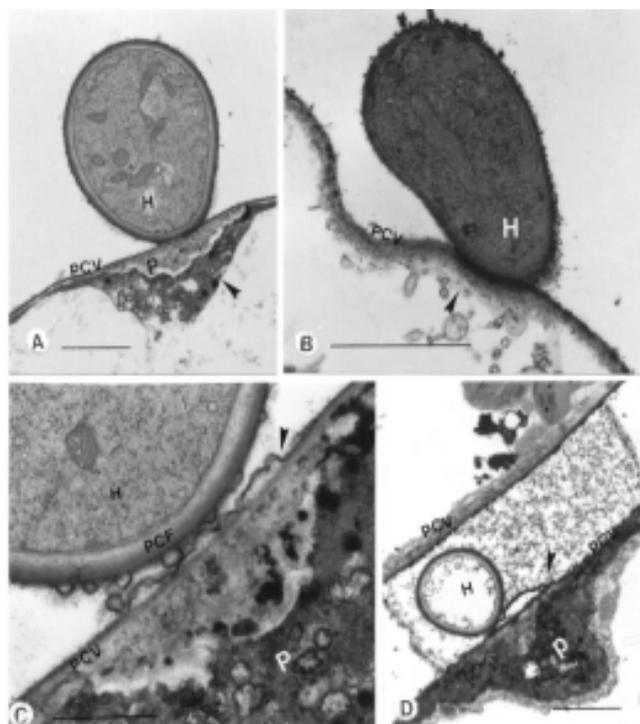


FIG. 1 - Presença de precipitados de peridróxido de cério nas células do mesofilo de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) resistente e suscetível inoculados com *Stemphylium solani*. A e B) Deposição de material eletrondenso (setas) junto à parede celular de célula do mesofilo da cultivar resistente. C e D). Acúmulo de precipitados junto à parede celular (setas) em célula do mesofilo da cultivar suscetível em contato com hifas do patógeno. Barra em A, C e D = 2 μ m; em B = 5 μ m. H = hifa; P = papila; PCV = parede celular vegetal.

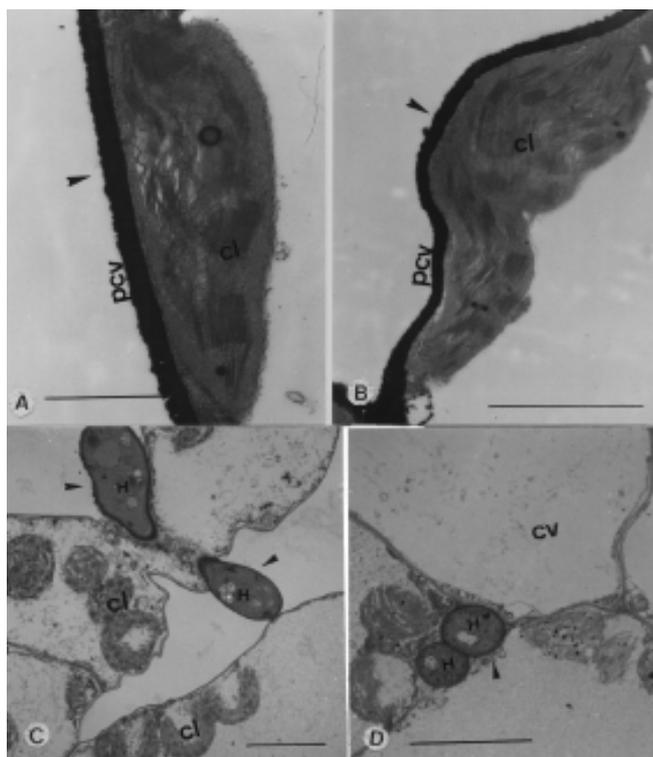


FIG. 2 - Amostras de tecido foliar das cultivares de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) resistente e suscetível a *Stemphylium solani* do controle 1 (tratadas com $CeCl_3$ e não inoculadas com o patógeno) e do controle 2 (não tratadas com $CeCl_3$ e inoculadas com o patógeno). A e B) Deposição de material eletrondenso (setas) na parede celular do hospedeiro resistente (A) e suscetível (B) do controle 1, indicando o acúmulo de precipitados de peridróxido de cério. C e D) Hifas intercelulares (setas) em contato com as células do mesofilo da cultivar resistente (C) e suscetível (D) do controle 2, sem acúmulo de precipitados na parede celular vegetal. Barra em A = 1 μ m; em B = 2 μ m; em C e D = 5 μ m cl = cloroplastos; m = mitocôndrias; pcv = parede celular vegetal.

resistente e suscetível não foram tratadas com $CeCl_3$ e foram inoculadas com o patógeno, não se constatou material precipitado ou depositado na parede celular do hospedeiro (Figura 2 C e D).

As análises feitas no trabalho presente, visando localizar o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), possivelmente relacionado com o fortalecimento da parede celular do hospedeiro, revelaram a presença de H_2O_2 nas duas cultivares em estudo, e no controle negativo em que o $CeCl_3$ foi utilizado. A provável explicação pela qual precipitados de peridróxido de cério apareceram nas amostras do controle tratado com $CeCl_3$ e não inoculado com o fungo, é a presença de H_2O_2 constitutivo na célula vegetal. De acordo com Bolwell & Wojtaszek (1997), a geração de espécies de oxigênio reativo (reactive oxygen species, ROS) é uma característica constitutiva de qualquer célula viva. Em condições normais, as ROS aparecem como resultado de sucessivas reações redutoras de oxigênio molecular. As plantas são capazes de produzir ROS constitutivamente e em quantidades

significantes, principalmente H_2O_2 , e esta produção pode ser regulada pela luz, hormônios ou ferimentos. Segundo Resende *et al.* (2003), durante o transporte de elétrons nos cloroplastos e mitocôndrias, muitos e^- são perdidos e então captados pelo O_2 , formando O_2^- . A dismutação do O_2^- catalisada pela SOD (superóxido dismutase), é responsável pelo surgimento da maioria do H_2O_2 celular.

Os resultados observados também sugerem que o H_2O_2 , presente nas células de tomateiro resistente e suscetível, inoculados com o patógeno, pode estar relacionado com respostas intrínsecas de defesa das cultivares estudadas, como a deposição de substâncias na parede celular do hospedeiro, ou a síntese de compostos fenólicos. Hüchelhoven *et al.* (1999) estudaram a presença de H_2O_2 em plantas de *Hordeum vulgare* L. resistentes a *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (DC.) Speer e detectaram H_2O_2 acumulado em papilas eficientes em conter o patógeno, ao passo que H_2O_2 não foi detectado em células onde as papilas se mostraram ineficazes, indicando que o H_2O_2 tem papel substancial na resistência, neste patossistema. Cadena-Gomez & Nicholson (1987) analisaram a atividade de peroxidases associadas com a formação de papilas na epiderme e no mesocótilo de milho inoculado com *Helminthosporium maydis* Nisikado & Myiake e *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils. e revelaram atividade de peroxidases antes e depois da formação de papilas, como também a presença de fenóis e lignina na parede celular, o que demonstra o envolvimento de H_2O_2 nessas respostas.

Sugere-se no presente trabalho que o peróxido de hidrogênio não deva contribuir de forma significativa para a resistência da cultivar Motelle contra *S. solani*, visto que não se encontrou qualquer reação diferencial entre as cultivares resistente e suscetível, quanto a presença de H_2O_2 . Entretanto, este estudo foi realizado avaliando-se apenas um período de coleta após a inoculação (48 h), não sendo possível concluir sobre o papel efetivo do H_2O_2 na alteração de parede celular do hospedeiro e na manifestação da resistência. É necessária a repetição do experimento, testando-se outros períodos de coleta, visando avaliar a presença deste composto no hospedeiro resistente e suscetível e sua interferência no que diz respeito ao fortalecimento da parede celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BESTWICK, C.S., BROWN, I.R., BENNETT, M.H.R. & MANSFIELD, J.W. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* p.v. *phaseolicola*. *The Plant Cell* 9:209-221. 1997.
- BOLWELL, G.P. & WOJTASZEK, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence- a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51:347-366. 1997.
- CADENA-GOMEZ, G. & NICHOLSON, R.L. Papillae formation and associated peroxidase activity: a non-specific response to attempted fungal penetration of maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 31:51-67. 1987.

- CZANINSKI, Y., SACHOT, R.M. & CATESSON, A.M. Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell walls. *Annals of Botany* 72:547-550. 1993.
- HILAIRE, E., YOUNG, S.A., WILLARD, L.H., McGEE, J.D., SWEAT, T., CHITTOOR, J.M., GUIKEMA, J.A. & LEACH, J.E. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14:1411-1419. 2001.
- HÜCKELHOVEN, R. & KOGEL, K.H. Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistance and susceptible near-isogenic barley lines attacked by powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*). *Molecular Plant Microbe Interactions* 11:292-300. 1998.
- HÜCKELHOVEN, R., FODOR, J., PREIS, C. & KOGEL, K. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* 119:1252-1260. 1999.
- KOZLOWSKA, M., FRYDER, K. & WOLKO, B. Peroxidase involvement in the defense response of red raspberry to *Didymella applanata* (Niessl/Sacc). *Acta Physiologiae Plantarum* 23:303-310. 2001.
- LAMB, C. & DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:251-275. 1997.
- MIZUBUTI, E.S.G. & BROMMONSHENKEL, S.H. Doenças causadas por fungos em tomateiro. *Informe Agropecuário* 18:7-14. 1996.
- OTTE, O. & BARZ, W. The elicitor induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta* 200:238-246. 1996.
- QUIROGA, M., GUERRERO, C., BOTELLA, M.A., BARCELÓ, A., AMAYA, I., MEDINA, M.I., ALONSO, F.J., de FORCHETTI, S.M., TIGIER, H. & VALPUESTA, V. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* 122:1119-1127. 2000.
- RESENDE, M.L.V., SALGADO, S.M.L. & CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28:123-130. 2003.
- SCANDALIOS, J.G. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences* 27:483-486. 2002.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEI, Y. & COLLINGE, D.B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* 11:1187-1194. 1997.