

JÂNIA LÍLIA DA SILVA BENTES

**HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO
TOMATEIRO - *Stemphylium solani* Weber**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

JÂNIA LÍLIA DA SILVA BENTES

**HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO
TOMATEIRO - *Stemphylium solani* Weber**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 3 de dezembro de 2002.

Prof. Sérgio H. Brommonschenkel
(Conselheiro)

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho
(Conselheiro)

Prof. Eldo A. Monteiro da Silva

Dra. Neusa de Lima Nogueira

Prof. Kiyoshi Matsuoka
(Orientador)

A Deus, por todas as graças concedidas.
Aos meus pais, Lindalva e Linhares.
Ao meu esposo, Hedinaldo e minha filha Júlia
Aos meus irmãos, James e Júnior,
pelo estímulo em todos os momentos .

AGRADECIMENTO

Ao professor Kiyoshi Matsuoka, por todos os ensinamentos.

Aos colegas, Cláudia Vanetti, Adelica e Miguel pelo auxílio nas horas difíceis e pelos bons momentos.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos valiosos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

BIOGRAFIA

JÂNIA LÍLIA DA SILVA BENTES, filha de Jeú Linhares Bentes e Lindalva da Silva Bentes, nasceu em 8 de janeiro de 1971, em Manaus, Estado do Amazonas.

Em janeiro de 1997, graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal do Amazonas, em Manaus.

Em agosto de 1999, concluiu o curso de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa

Em agosto de 1999, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 5 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 6 |
| 3.1. Material vegetal e preparo das plantas | 6 |
| 3.2. Inóculo e inoculação..... | 6 |
| 3.3. Determinação da melhor idade das plantas para inoculação..... | 8 |
| 3.4. Estudo histológico do processo de infecção..... | 8 |
| 3.4.1. Avaliação quantitativa dos eventos de pré-penetração..... | 8 |
| 3.4.2. Colonização dos tecidos | 9 |
| 3.5. Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão..... | 10 |
| 3.6. Localização de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) | 11 |
| 4. RESULTADOS | 12 |
| 4.1. Determinação da melhor idade das plantas para a inoculação..... | 12 |
| 4.2. Avaliação quantitativa dos eventos de pré-penetração | 12 |
| 4.3. Processo de infecção | 13 |
| 4.4. Colonização dos tecidos..... | 24 |
| 4.5. Localização de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) | 30 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 5. DISCUSSÃO..... | 36 |
| 6. RESUMO E CONCLUSÕES | 44 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 47 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sintomas provocados por *Stemphylium solani* nas cultivares resistente e suscetível. A) sintomas típicos de mancha-de-estenfilio (setas) em tomateiro suscetível, c.v. Moneymaker, 36 h.a.i.. B) Cultivar resistente, Motelle, sem sintomas típicos da doença; note os pontos necróticos nos folíolos (setas)..... 13
- Figura 2 - Germinação de conídios de *Stemphylium solani* na superfície foliar de tomateiro, em cvs resistente e suscetível 14
- Figura 3 - Penetração de *Stemphylium solani* em tomateiro resistente e suscetível via abertura estomática 14
- Figura 4 - Formação de vesícula de *Stemphylium solani* na cavidade subestomática de tomateiro resistente e suscetível 15
- Figura 5 - Penetração de *Stemphylium solani* em folhas de tomateiro. A) Conídio germinado, com um tubo germinativo penetrando na abertura estomática (seta) de tomateiro resistente, 48 h.a.i. B) penetração via estômato (seta) e vesícula subestomática em tomateiro suscetível, 24 h.a.i.. C) Conídio de *S. solani* com tubo germinativo penetrando pelo estômato (seta), e vesícula subestomática em tomateiro suscetível. D) Conídio de *S. solani* com tubo germinativo penetrando diretamente na célula da epiderme da c.v. suscetível. Barra em A, B, C e B = 20 µm. h.a.i. = horas após a inoculação; tg = tubo germinativo; c = conídio de *S. solani*; es = estômato; vs = vesícula subestomática; ep = epiderme 16

- Figura 6 - Penetração do tubo germinativo de *S. solani* em tomateiro via estômato, observada ao microscópio eletrônico de varredura. A) Penetração da porção terminal do tubo germinativo de *S. solani* através da abertura estomática. B) Penetração da porção lateral do tubo germinativo de *S. solani* na abertura estomática (seta). C) Tubo germinativo de *S. solani* sobre o ostíolo do estômato (seta), sem penetrar no hospedeiro. D) Tubo germinativo ao lado da abertura estomática, sem penetração. Barra em A, B, e C = 5 μm ; em D = 10 μm . es = estômato; tg = tubo germinativo..... 17
- Figura 7 - Estrutura semelhante a apressório no tubo germinativo de *S. solani*, observada em microscópio eletrônico de varredura.. A) Estrutura semelhante a apressório (seta) no tubo germinativo de *S. solani*, entre células da epiderme, na superfície foliar da c.v. resistente de tomateiro. B) estrutura semelhante a apressório (seta) na parede anticlinal de células da epiderme, na c.v. suscetível de tomateiro. Barra =10 μm . tg = tubo germinativo..... 18
- Figura 8 - Alterações da parede celular em células epidérmicas de folhas de tomateiro resistente e suscetível a *S. solani*. A) Tubo germinativo de *S. solani* em contato com célula da epiderme da c.v. resistente. Célula vegetal apresentando papila no sítio da tentativa de penetração do fungo. B e C) Aspecto ultraestrutural de alteração de parede celular na célula da epiderme foliar da c.v. suscetível, no ponto de contato entre a hifa do patógeno e a parede celular do hospedeiro. Barra em A e B = 2 μm ; em C = 1 μm . tg = tubo germinativo; p = papila; PE = peroxissomo; H = hifa do patógeno; apc = alteração de parede celular; CV = célula vegetal..... 19
- Figura 9 - Penetração de *S. solani* via estômatos e formação de vesícula subestomática em tecido foliar de tomateiros resistente e suscetível. A) Penetração através do estômato (seta) e presença de vesícula subestomática em tecido foliar de tomateiro suscetível, 48 h.a.i.. B) Célula-guarda do estômato comprimida durante a penetração (seta) e formação de vesícula subestomática em c.v. resistente, 48 h.a.i., observada ao microscópio eletrônico de transmissão (MET). C e D) vista seqüencial da penetração do tubo germinativo de *S. solani* entre as células-guardas do estômato, em C, e formação de vesícula subestomática, em D, em tomateiro suscetível, observada ao MET. Barra em A = 20 μm ; em C, D e E = 5 μm . H = hifa do patógeno; cg = célula-guarda do estômato do hospedeiro; VS = vesícula subestomática..... 20

- Figura 10 - Seqüência dos eventos no início da infecção de *S. solani* em tomateiro c.v. resistente, registrados 36 h.a.i., de um mesmo ponto de infecção em amostras diafanizadas, sob diferentes focos. A) Tubo germinativo de *S. solani* (seta) penetrando na abertura estomática. B) Sítio de infecção no ostíolo do estômato (seta). C) Formação de vesícula subestomática na cavidade subestomática no parenquima paliçádico. D e E) Vesícula subestomática e hifas intercelulares ramificadas, no mesofilo (setas). F) Hifa intercelular em contato com a célula do parênquima. Célula vegetal apresentando alteração da parede celular (seta). Barra = 20 µm. tg = tubo germinativo; es = estômato; VS = vesícula subestomática; ep = células da epiderme; pc = parede celular vegetal; H = hifa intercelular 21
- Figura 11 - Alterações nucleares em células do mesofilo de tomateiro infectado por *S. solani*. A) Núcleo de célula do mesofilo da c.v. resistente da c.v. suscetível (B) com massas de material eletrondenso possivelmente resultantes da condensação da cromatina (setas). Cloroplastos nas células das duas cultivares apresentando-se desorganizados. Barra, em A = 1 µm; em B = 2 µm. nc = núcleo; C = cromatina condensada; cl = cloroplastos 23
- Figura 12 - Hifa intracelular de *S. solani* apresentando material extracelular elentrodense (setas) na c.v. resistente (A) e na c.v. suscetível (B). Barra = 2 µm. H = hifa intracelular; cl = cloroplastos 25
- Figura 13 - Degradação enzimática da parede da célula hospedeira. A) Hifa intercelular de *S. solani* em contato com célula do mesofilo do tomateiro resistente. Parede celular do hospedeiro não é visível no ponto de contato (seta) entre a hifa do patógeno e a célula vegetal. B) Parede celular de célula do mesofilo da c.v. suscetível degradada pelo contato com a hifa do patógeno (seta). C) Degradação de parede celular de células vizinhas durante o crescimento da hifa intracelular de *S. solani*, através das células do mesofilo. Barra = 1 µm. H = hifa do patógeno; PCV = parede celular vegetal; PCF = parede celular do fungo; CV = célula vegetal..... 26

- Figura 14 - Tecidos colonizados dos tomateiros resistente e suscetível, observados em corte semifino, 24 h.a.i. A) Tecido do tomateiro resistente apresentando hifas intracelulares (setas) nas células do mesofilo. Note que o tecido está bem preservado, em comparação com o tecido da c.v. suscetível (em B), e com inúmeros cloroplastos. B) Tecido da cultivar suscetível com vesícula subestomática. Células do mesofilo apresentam-se degradadas, sem cloroplastos, na ausência de hifas intracelulares. Barra = 10 μm . ep = epiderme foliar; ms = mesofilo; H =hifa intracelular; cge = célula-guarda do estômato; VS = vesícula subestomática 27
- Figura 15 - Colonização do mesofilo foliar de tomateiro, observada em microscópio eletrônico de transmissão. A) Hifas intracelulares (setas) nas células do mesofilo da cultivar resistente, 24 h.a.i., apresentando seu conteúdo desorganizado, sendo possível ainda diferenciar cloroplastos. B) Hifas intracelulares (setas) nas células do mesofilo da cultivar suscetível, 24 h.a.i., apresentando-se com citoplasma degenerado. Barra em A, B, e C = 5 μm . H = hifas do patógeno; cl = cloroplastos 28
- Figura 16 - Papilas na parede celular das células do mesofilo da cultivar resistente, observadas em microscópio eletrônico de transmissão. A, B, C e D) Hifas intercelulares de *S. solani* (setas) em contato com células do hospedeiro, 24 h.a.i., apresentando diferentes tipos de papilas. E) Matriz extracelular (seta) entre hifa do patógeno e célula do hospedeiro apresentando papila. F) Papila formada no ponto de contato entre a hifa do patógeno e a parede celular do hospedeiro. Barra em A e B = 5 μm ; em C, D, E e F = 2 μm . H = hifa do patógeno; P = papila; cl = cloroplastos; pcv = parede celular vegetal 29
- Figura 17 - Alterações da parede celular na cultivar suscetível observadas em MET. A, B, C e D) Hifas intercelulares em contato com as células do hospedeiro, que apresentam parede espessada (setas). E) Papila em célula do mesofilo, no sítio da tentativa de penetração. Não é possível distinguir a parede celular do hospedeiro. F) Hifa intracelular saindo da célula. Rompimento da parede celular (setas) do hospedeiro indicando o envolvimento de pressão exercida pela hifa para transpor a parede celular vegetal. Barra em A = 5 μm ; em B, C, D e F = 2 μm ; em E = 1 μm . H = hifa; cl = cloroplastos; apcv = alteração de parede celular vegetal; pcv = parede celular vegetal; p = papila 31

- Figura 18 - Presença de precipitados de peridróxido de cério nas células do mesofilo de tomateiro resistente a *S. solani*. A) Deposição de material eletrondenso (seta) junto à papila formada na parede celular de célula do mesofilo em contato com a hifa do fungo. B) Precipitados de peridróxido de cério (seta) ao longo da parede celular da célula vegetal em contato com a hifa do fungo. C) Acúmulo de precipitados junto à papila formada em célula em contato com patógeno. D) Hifa intercelular sem conteúdo, em contato com parede celular apresentando papila e acúmulo de precipitado (seta). Barra em A, C, D e F = 2 µm; em B = 5 µm; em E = 1 µm. H = hifa; P = papila; PCF = parede celular do fungo; PCV = parede celular vegetal 32
- Figura 19 - Precipitados de peridróxido de cério em células do mesofilo de tomateiro suscetível infectado por *S. solani*. A) Célula vegetal em contato com a hifa intercelular de *S. solani*, apresentando acúmulo de precipitados de peridróxido na parede celular vegetal. B) Hifa intracelular de *S. solani* apresentando acúmulo de precipitados de peridróxido de cério. C) Acúmulo de precipitados de peridróxido de cério junto a alteração de parede celular na parede celular da célula vegetal. D, E e F) Material eletrondenso na parede celular vegetal em contato com as hifas do patógeno (seta). Barra em A = 5 µm; em B, C, D e F = 2 µm; em E = 1 µm. H = hifa; cl = cloroplastos; cv = célula vegetal; apcv = alteração de parede celular vegetal; PCF = parede celular do fungo 33
- Figura 20 - Tecidos foliares das cultivares resistente e suscetível tratados com CeCl₃ e não inoculado com o patógeno (controle 1). A) Células da c.v. resistente apresentando cloroplastos intactos, sem a presença do fungo. (B) Célula da c.v. suscetível com cloroplastos e mitocôndrias intactos, na ausência do patógeno. C e D) Deposição de material eletrondenso (setas) na parede celular do hospedeiro resistente (C) e suscetível (D) indicando o acúmulo de precipitados de peridróxido de cério. Barra em A, B e D = 2 µm; em C = 1 µm. cl = cloroplastos; m = mitocôndria; pcv = parede celular vegetal; cv = célula vegetal 34
- Figura 21 - Tecido foliar das cultivares resistente e suscetível não tratado com CeCl₃ e inoculado com o patógeno (controle 2). A e B) Hifas intercelulares (setas) em contato com células do mesofilo da c.v. resistente, sem acúmulo de precipitados de peridróxido de cério na parede da célula vegetal. C e D) Hifas intercelulares (setas) em contato com células do mesofilo da c.v. suscetível, sem acúmulo de precipitados na parede da célula vegetal. Barra em A, B e C = 5 µm; em D = 2 µm. H = hifa; cl = cloroplasto; cv = célula vegetal 35

RESUMO

BENTES, Jânia Lília da Silva, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2002. **Histopatologia da interação tomateiro - *Stemphylium solani* Weber**. Orientador: Kiyoshi Matsuoka. Conselheiros: Sérgio H. Brommonschenkel e Murilo Geraldo de Carvalho.

Estudou-se a infecção de *S. solani* em folíolos de tomateiros resistente, cv. Motelle, e suscetível, cv. Moneymaker, usando-se técnicas histológicas e de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. Inicialmente quantificaram-se os eventos de pré-penetração nas duas cultivares, os quais não diferiram significativamente (teste F a 5%) entre si, indicando que a resistência é exercida em pós-penetração. Após a penetração, que ocorre principalmente via estômatos, a hifa diferenciou-se na cavidade subestomática, nas duas cultivares, formando uma vesícula globosa ou irregular; a vesícula ramificou-se em hifas secundárias, que 24 e 36 h.a.i. (horas após a inoculação) colonizaram o hospedeiro de forma intra e intercelular. Na cultivar ‘Motelle’, as células do mesofilo continuaram preservadas, com os cloroplastos aparentemente intactos, quando a colonização se limitava aos espaços intercelulares. Raramente a hifa conseguia penetrar e, quando o conseguiu, causou colapso celular. A frequência da colonização intracelular na cultivar resistente foi menor que na suscetível e, quando verificada, foi pequeno o número de células afetadas, originando lesão

pequena. Aposições foram observadas na parede das células do mesofilo resistente e, na maioria das células examinadas, aparentemente restringiram a colonização intracelular. No tomateiro suscetível, os tecidos apresentavam-se intensamente colonizados e as células do mesofilo, com cloroplastos destruídos no citoplasma degradado. Peróxido de hidrogênio foi localizado citoquimicamente em virtude de sua reação com cloreto de cério, evidenciando H_2O_2 produzido em ambos tipos de tomateiros. 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 H_2O_2 , e sua presença detectada num dos controles negativos, este composto não participa diretamente da resistência manifestada pela c.v. 'Motelle' contra *S. solani* no tocante ao fortalecimento da parede celular. A resistência de 'Motelle' explica-se em parte pelas alterações da parede celular e aposições encontradas nas células do mesofilo em contato com as hifas. Porém, somente a presença dessas barreiras estruturais não explicam a resistência observada, pois a colonização intracelular dos tecidos da c.v. resistente também foi observada em alguns casos, porém o desenvolvimento das lesões foi restringido nestas áreas colonizadas. Desta forma, é provável que outros mecanismos bioquímicos de resistência ocorram em conjunto com os mecanismos reportados neste estudo.

ABSTRACT

BENTES, Jânia Lília da Silva, D.S., Universidade Federal de Viçosa, December 2002. **Histopatology *Stemphylium solani* Weber and tomato interaction.** Adviser: Kiyoshi Matsuoka. Committee members: Sérgio H. Brommonschenckel and Murilo Geraldo de Carvalho.

The infection process of *S. solani* on resistant (cv. Motelle) and susceptible (cv. Moneymaker) tomato leaflets was studied using histochemical and scanning and transmission electron microscopy techniques. No quantitative differences were found in the pre-penetration conidial events on resistant and susceptible tomatoes, an indication that resistance results from post-penetration responses. The histological studies showed that the initial infection events were similar on the resistant and susceptible plants. The pathogen invaded the tomato leaf primarily through stomates and a vesicle developed inside the substomatal cavity. Secondary hyphae originated from the vesicle and within 24 and 36 hours after inoculation had branched inter and intracellularly. On resistant tomato, chloroplasts of the mesophyll cells remained intact, as hyphae grew intercellularly, while the entire cell collapsed when the colonization went intracellular. However, intracellular hyphae were an uncommon event in the resistant tomato, and small the number of infected cells. Cell wall appositions in the mesophyll of resistant tomato prevented the intracellular colonization.

Mesophyll cells of the susceptible tomato were strongly colonized inter and intracellularly, their protoplast became disorganized, and the cell collapsed. No different physiological reactions were found for the two studied tomato types concerning H_2O_2 accumulation in the wall of mesophyll cells because deposits of cerium perhydroxide were found equally in both cultivars. It is thus assumed that H_2O_2 has no effect on building up the wall resistance of 'Motelle' to *S. solani*. Resistance of the mesophyll cells was caused by appositions and other changes on the cell wall. However, these do not completely account for the resistance in 'Motelle', as it seems likely that biochemical mechanisms are also involved.

1. INTRODUÇÃO

A mancha-de-estenfilio, causada por *Stemphylium solani* Weber., é uma doença que ocorre em praticamente todas as regiões onde se cultiva o tomateiro, afetando a cultura 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, jiló e batatinha (MIZUBUTI e BROMMONSCHENKEL, 1996). Esta doença é de importância relativa, porque os danos causados dependem da suscetibilidade das cultivares plantadas. Quando se plantam cultivares suscetíveis, esta doença torna-se uma das mais importantes, principalmente a partir do início das colheitas, pois é nesta época que o produtor reduz a aplicação de fungicidas. Os prejuízos são resultantes da redução da área foliar e do potencial produtivo da porção apical das plantas, uma vez que a incidência é maior em folhas mais novas (KUROSAWA e MUSSI, 1995). Uso de variedades resistentes é a medida de controle mais eficiente contra o fungo (MIZUBUTI e BROMMONSCHENKEL, 1996).

Ao longo dos anos, os pesquisadores têm buscado entender os mecanismos naturais de resistência encontrados nas plantas, tendo em vista as vantagens que esse conhecimento propicia no controle de doenças como, redução

do uso de produtos químicos; baixo custo, uma vez que a cultivar já está desenvolvida; controle exercido em alta eficiência (KEEN, 1999).

Em geral, os mecanismos responsáveis pela defesa das plantas ao ataque de patógenos são estruturais como cutícula e formação de aposições na parede celular, ou bioquímicos, como acúmulo de fitoalexinas, síntese de proteínas PR (proteínas relacionadas com a patogênese) e reação de hipersensibilidade (HR) (PASCHOLATI e LEITE, 1995).

As papilas são formadas pela deposição, entre a membrana plasmática e a parede celular, no sítio de infecção, de substâncias como calose, lignina, derivados fenólicos, celulose e suberina, e podem funcionar como uma barreira à penetração. As papilas surgem principalmente em resposta da intrusão física do patógeno na célula hospedeira, mas existem evidências de um estímulo químico capaz de incitar a formação de papilas em células sem estresse físico (AIST, 1976). O papel destas deposições como mecanismos eficientes de resistência ainda é alvo de especulações, uma vez que papilas têm sido encontradas em diversas interações compatíveis e incompatíveis (AIST, 1976).

As fitoalexinas são definidas como compostos antimicrobianos sintetizados pelas plantas e que se acumulam nas células em resposta à infecção (DEVERALL, 1982).

A reação de hipersensibilidade (HR) é um mecanismo de resistência tido como uma resposta extrema da planta à invasão por um patógeno. Resulta na morte repentina de um número limitado de células da planta hospedeira, circundando o sítio de infecção e parализando o crescimento do patógeno nos tecidos da planta. A HR requer o reconhecimento de moléculas do patógeno por parte do hospedeiro, levando à transdução de sinais e ativação de genes de resposta de defesa, os quais codificam proteínas tóxicas ao patógeno, como quitinases, glucanases, e proteínas, responsáveis pela lignificação da parede celular, além de fitoalexinas (KEEN, 1999). Este tipo de resposta de resistência foi demonstrado em diversos patossistemas, tais como em cevada atacada por *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* (KOGA *et al.*, 1990) e em malva infectada por *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* (MORIN *et al.*, 1996).

No início do desenvolvimento de uma doença, as plantas podem induzir uma série de respostas de defesa, incluindo a rápida geração, nas "espécies reativas de oxigênio" (reactive-oxygen species, ROS) tais como O_2^- , H_2O_2 e OH^\cdot . Este fenômeno, conhecido como "explosão oxidativa", foi primeiramente relatado como um evento inicial na resposta de defesa de plantas de batata infectadas por *Phytophthora infestans* (DOKE (1983) citado por IWANO *et al.*, 2002). 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 e DIXON 1997; HÜCKELHOVEN e 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 H_2O_2 (HILAIRE *et al.*, 2001; KOZLOWSKA *et al.*, 2001; QUIROGA *et al.*, 2000). Outros mecanismos relacionados com o fortalecimento da parede celular, como lignificação (CZANINSKI *et al.*, 1993; OTTE e BARZ, 1996) e formação de papilas (CADENA-GOMEZ e NILCHOLSON, 1987; THORDAL-CHRISTENSEN *et al.*, 1997; HÜCKELHOVEN *et al.*, 1999), também foram relacionados com a síntese de H_2O_2 .

A detecção de H_2O_2 pode indicar o envolvimento de proteínas e outros compostos relacionados com o fortalecimento da parede celular, e que podem contribuir com a resistência da planta ao ataque de patógenos. O estudo do envolvimento deste composto no processo de infecção de *S. solani* em tomateiro, é de interesse para auxiliar a esclarecer quais mecanismos de resistência estão envolvidos neste patossistema.

A interação *S. solani* e tomateiro foi estudada por HENDRIX e FRAZIER (1949), visando detectar o gene responsável pela resistência de cultivares de tomateiro a esse patógeno. Segundo estes autores, a resistência é conferida por um único gene dominante, denominado *Sm*. Segundo BLANCARD e

LATERROT (1986), este gene também é eficiente contra isolados de *S. vesicarium* e *S. floridanum*, além de *S. solani*.

Apesar de ter sido identificado o gene *Sm* de resistência de tomateiro a *S. solani* e embora já existam variedades comerciais resistentes a este patógeno, ainda não se estudaram os mecanismos responsáveis pela expressão dessa resistência. O entendimento dos mecanismos estruturais e bioquímicos de resistência de tomateiro a *S. solani* será de grande valia para se obter um modelo de mecanismo(s) de resistência que futuramente possa ser aplicado a outros patossistemas, e para fornecer subsídios para os programas de melhoramento que objetivam obter novas cultivares resistentes.

A histologia da interação patógeno-hospedeiro permite estudar o processo de infecção, esclarecendo os eventos de pré-penetração, penetração e colonização dos tecidos do hospedeiro, além de evidenciar possíveis mecanismos estruturais de resistência. O trabalho de DIENER (1955) relacionado com a histologia da interação *Stemphylium solani* e tomateiro, relata processos iniciais de infecção, o modo de penetração e o início da colonização dos tecidos em plantas suscetíveis, mas não aborda a interação fungo - planta resistente. A participação dos mecanismos estruturais na resistência ainda não foi estudada neste patossistema.

2. OBJETIVOS

Diante da ausência de conhecimentos a respeito dos mecanismos bioquímicos e estruturais da resistência de cultivares de tomateiro contra *S. solani* e da patogênese nesta interação, efetuou-se o presente trabalho, com os objetivos:

- estudar o processo de infecção no patossistema *S. solani* e tomateiro, através de técnicas histológicas e comparando-se a cultivar resistente com a suscetível, visando detectar diferenças estruturais entre elas provavelmente relacionadas com a resistência.
- localizar peróxido de hidrogênio (H₂O₂) associado à parede celular do hospedeiro, durante a resposta de defesa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e preparo das plantas

Foram utilizados tomateiros c.v. Motelle, com o gene *Sm* de resistência, e da c.v. Moneymaker, suscetível. A semeadura foi feita em substrato solo, areia e esterco de curral, misturados na proporção de 3:1:1, pré-tratado com brometo de metila e contido em bandejas de plástico (45 x 30 x 9,5 cm).

3.2. Inóculo e inoculação

Foi usado neste trabalho um variante esporulante de *S. solani*, (S70l-5), obtido de cultura monospórica e preservado em óleo mineral (MATSUOKA, 1968), disponível há trinta anos no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

Em vista do prolongado período de preservação, foi necessário verificar inicialmente se permaneciam normais a esporulação e a patogenicidade do variante. O fungo foi repicado dos tubos de ensaio com óleo mineral para placas de Petri contendo meio de cultura V8 (200ml de suco V8; 17g de ágar; 800ml de água destilada), o qual favorece a esporulação do patógeno. Verificou-se abundante produção de esporos depois de incubação por dez dias a cerca de

25°C. O teste de patogenicidade foi feito em tomateiros cv. Moneymaker e cv. Motelle, tendo-se verificado lesões típicas da doença, visíveis somente na cultivar suscetível. Foi feito o reisolamento do fungo a partir dos folíolos infectados, confirmando-se portanto a viabilidade e patogenicidade do isolado. Na condução dos trabalhos seguintes, o fungo foi mantido em tubos de ensaio contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e armazenado em incubadora reguladas para 25°C. Por ocasião das inoculações, o fungo era repicado para placas de Petri contendo meio V8 que a seguir eram mantidas a 25°C, em incubadora durante dez dias.

A suspensão de inóculo foi obtida a partir da adição de água destilada nas placas de Petri contendo a colônia do fungo, a qual era levemente raspada com um pincel de cerdas macias. O líquido foi recolhido em um béquer e a suspensão ajustada para 10^4 esporos/ ml.

Dois métodos de inoculação foram usados, de acordo com o objetivo de cada ensaio. No primeiro, a suspensão de esporos foi aplicada, com um atomizador De Vilbis, na face adaxial da folhas. No segundo, a inoculação foi localizada aplicando-se gotas de 30 μ l de suspensão de esporos, em locais diferentes no folíolo, e a seguir recobertas com disco de papel de filtro esterilizado, com cerca de 0,5 cm², para evitar o escorrimento das gotas. Este método foi usado nos estudos de colonização e de microscopia eletrônica de transmissão 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, durante 48 horas, e em seguida transferidas para casa de vegetação, onde foram mantidas até o término da coleta das amostras.

3.3. Determinação da melhor idade das plantas para inoculação

Foram realizados testes preliminares para determinar a melhor idade dos tomateiros para a inoculação e verificar se havia diferença quanto a resistência ou suscetibilidade das plantas em diferentes estádios fenológicos

As cultivares foram semeadas em cinco épocas diferentes, com intervalos de sete dias. As plantas foram inoculadas por atomização, como descrito no item 3.2, todas de uma só vez, aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias de idade. Para cada idade foram usadas três plantas de cada cultivar e uma, como testemunha, que foi atomizada com água destilada. A avaliação diária foi feita observando-se durante sete dias consecutivos o surgimento dos sintomas típicos da doença. Este ensaio foi repetido três vezes.

3.4. Estudo histológico do processo de infecção

As folhas cotiledonares e primárias inoculadas das cultivares resistente e suscetível foram coletadas 6, 12, 24, 36, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i.) para os experimentos relatados a seguir.

3.4.1. Avaliação quantitativa dos eventos de pré-penetração

As amostras inoculadas por atomização foram coletadas e diafanizadas segundo o método descrito por LONGO *et al.* (1994), que consiste em deixar as amostras em cloral hidratado (250 g de cloral hidratado/100 ml de água destilada) durante cinco dias, seguido de três lavagens em água destilada. As amostras diafanizadas foram coloridas com azul de algodão em lactofenol (100 ml de lactofenol, 1 ml de azul de algodão aquoso 1%, 20 ml de ácido glacial acético), montadas lâminas de microscopia e observadas a 100 e 400X, em microscópio ZEISS de luz branca.

Foi feita a avaliação quantitativa dos conídios germinados, do modo de penetração do tubo germinativo, direta ou via estômatos, e das vesículas subestomáticas produzidas nas amostras. Foram inoculadas 3 plantas por período de coleta, sendo cada planta uma repetição, e avaliados 4 folíolos de cada planta. A testemunha consistiu de uma planta atomizada com água destilada, para cada período de coleta. Este ensaio foi repetido duas vezes.

Amostras de tecido diafanizado das duas cultivares foram observadas em microscópio de fluorescência de luz transmitida, visando detectar autofluorescência nas áreas lesionadas. As amostras foram montadas em lâmina de microscopia contendo lactofenol (20g de fenol, 20ml de ácido láctico, 40g de glicerina e 20 ml de água destilada; DHINGRA e SINCLAIR, 1986) e observadas em microscópio de fluorescência ZEISS de luz transmitida, com lâmpada HBO 200 , filtro de excitação BG 12 (azul) e filtro de barreira 47 ou 50.

3.4.2. Colonização dos tecidos

Para observar a colonização dos tecidos , as plantas foram inoculadas com gotas de 30 µl de suspensão com 10^4 esporos/ml, como descrito em 3.2. A coleta foi feita 24, 36, 48 e 72 horas após a inoculação, as amostras foram incluídas em resina Spurr, em seguida, feitos cortes semifinos, com cerca de 0,5 a 1 µm de espessura. Para isso, as amostras foliares, com cerca 1 a 2 mm³, foram fixadas em glutaraldeído a 3% v/v, preparado em tampão cacodilato de sódio a 0,05 Mol/ L, pH 7,0, durante 8 a 10 h a 4°C. Após a fixação, as amostras foram lavadas seis vezes consecutivas, 10 minutos por vez, em tampão fosfato 0,05 Mol/ L, pH 7,0. Em seguida, foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1% , durante 4 horas, a 4°C, seguida de lavagens, como descrito anteriormente. A desidratação foi feita em série etanólica (30, 50, 70, 80, 95 e 100%), e os fragmentos desidratados foram submetidos a infiltração em misturas de álcool e resina de acordo com a seguinte seqüência: álcool e resina 1:1 v/v, durante trinta minutos; álcool e resina 1:3 v/v, mais trinta minutos; resina pura durante 4 horas seguida

de troca da resina, e à resina pura por 12 horas. As amostras foram emblocadas em resina, em moldes de silicone, devidamente etiquetados e polimerizados a 70°C durante 24 horas.

O tecido incluído em resina Spurr foi seccionado usando-se ultramicrótomo SORVALL MT2-B, equipado com navalha de vidro. Os cortes foram coloridos com azul de toluidina O a 0,1% (p/v) (borax p.a. 0,1g; toluidina O 0,1g; 100 ml de água destilada), montados em óleo de imersão e examinados ao microscópio de luz Zeiss e microscópio Olympus VANOX.

3.5. Microscopia eletrônica de varredura e de transmissão

As observações ao microscópio eletrônico de varredura visaram obter informações sobre a interação em nível de superfície do hospedeiro.

As amostras inoculadas por atomização foram coletadas 24 e 48 h.a.i. e processadas como descrito em 3.4.2, até a etapa de desidratação. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem ao ponto crítico (Critical Point Dryer 020, Balzers Union) e cobertas com filme de ouro de 15 nm de espessura mediante pulverização catódica. A observação das amostras foi feita no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM - T200, a 10 KV.

Os estudos no microscópio eletrônico de transmissão foram feitos visando observar resultados da interação em nível ultraestrutural e detectar alterações em organelas e, ou na parede celular das cultivares em estudo. Para isso, as plantas foram inoculadas com gotas de suspensão de esporos (item 3.2.). A coleta das amostras foi feita 24, 36, 48 e 72 h.a.i. e estas foram incluídas em resina Spurr (item 3.4.2) e submetidas a cortes ultrafinos, em ultramicrótomo SORVALL MT2-B, equipado com navalha de diamante. Os cortes foram montados em telinhas de cobre e submetidos à contrastação com acetato de uranila a 2% em solução aquosa durante 30 minutos, seguida de exposição a citrato de chumbo durante 15 minutos. As observações foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

3.6. Localização de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para os estudos ultraestruturais, visando localizar o acúmulo de H₂O₂ nos prováveis sítios de alteração da parede celular, o método utilizado foi o de BESTWICK *et al.* (1997), que se baseia na reação de H₂O₂ com CeCl₃, produzindo precipitados de peridróxido de cério, nos sítios de produção ou acúmulo de H₂O₂.

As plantas foram inoculadas com gotas de suspensão de esporos (item 3.2). As amostras foram coletadas 48 h.a.i. Fragmentos de aproximadamente 2 mm² foram incubados durante uma hora em CeCl₃, a 5 mM, preparado em MOPS 50 mM (ácido 3-(N-morfolino) propano-sulfônico), pH 7.2. Em seguida, os tecidos foram fixados durante uma hora 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 minutos, e pós-fixados durante 45 minutos em OsO₄ (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 equipado com navalha de diamante, montados em telinhas de cobre, contrastados durante 30 minutos com acetato de uranila 2% em solução aquosa, seguindo-se de citrato de chumbo, durante 15 minutos. Os cortes foram examinados em microscópio eletrônico de transmissão.

Dois tipos de controle foram usados neste estudo. O primeiro foram amostras não inoculadas das duas cultivares e tratadas com CeCl₃. O segundo, amostras inoculadas, das duas cultivares, porém não tratadas com CeCl₃.

4. RESULTADOS

4.1. Determinação da melhor idade da plantas para a inoculação

Não se observou diferença quanto à resistência ou suscetibilidade entre plantas da mesma cultivar em diferentes estádios fenológicos. As plantas da cultivar suscetível apresentaram sintomas típicos da doença em todas as idades testadas e a infecção levou-as à morte durante o período de avaliação. Nas plantas da cultivar resistente, constataram-se pequenas lesões macroscópicas em algumas plantas, mas que não eram freqüentes e não originaram sintomas típicos da doença. De modo geral as plantas resistentes se desenvolveram como as completamente sadias (Figuras 1 A e B). Com base nestes dados, optou-se utilizar plantas com cerca de quinze dias de idade em todos os experimentos.

4.2. Avaliação quantitativa dos eventos de pré-penetração

Pelas observações das amostras diafanizadas, o patógeno desenvolveu-se de maneira semelhante nas duas cultivares de tomateiro, visto que a quantificação dos eventos de pré-penetração não mostrou diferença significativa, pelo teste de F em nível de 5% de probabilidade, entre o hospedeiro resistente e

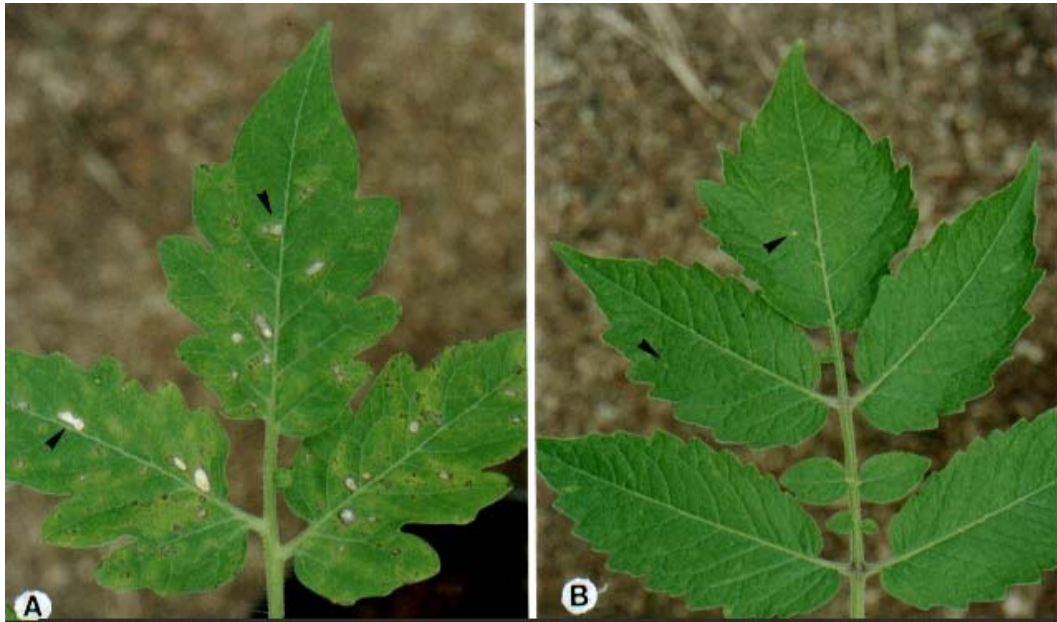


Figura 1 - Sintomas provocados por *Stemphylium solani* nas cultivares resistente e suscetível. A) sintomas típicos de mancha-de-estenfilio (setas) em tomateiro suscetível, c.v. Moneymaker, 36 h.a.i. B) Cultivar resistente, Motelle, sem sintomas típicos da doença; note os pontos necróticos nos folíolos (setas).

suscetível, quanto à germinação (Figura 2), penetração (Figura 3) e formação de vesícula na cavidade subestomática (Figura 4). Estes dados sugerem que os mecanismos envolvidos na resistência se manifestam na fase de pós-penetração, após o contato das hifas do patógeno com as células do mesófilo.

4.3. Processo de infecção

Com 6 h.a.i., os esporos do patógeno haviam germinado, dando origem a vários tubos germinativos por esporo, dos quais somente um ou eventualmente dois, penetraram no hospedeiro. A penetração, que ocorreu principalmente via estômatos, foi observada 12 h.a.i. (Figura 5 A, B e C; Figura 6 A e B). A

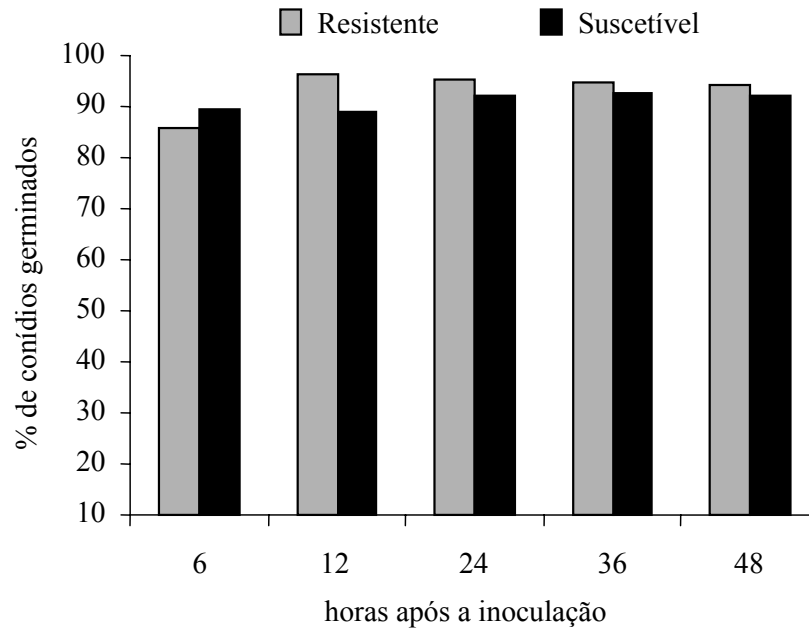


Figura 2 - Germinação de conídios de *Stemphylium solani* na superfície foliar de tomateiro, em cvs resistente e suscetível. Não houve diferença significativa de acordo com o teste de Tuckey a 5%, quanto a germinação dos esporos do fungo nas duas cultivares.

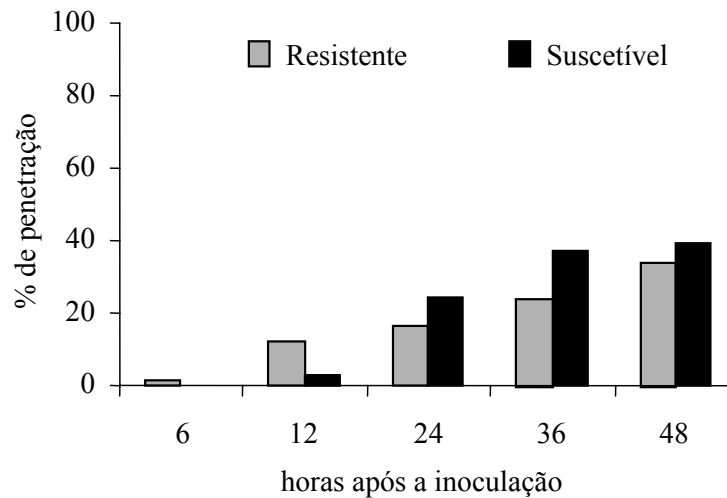


Figura 3 - Penetração de *Stemphylium solani* em tomateiro resistente e suscetível via abertura estomática. Não houve diferença significativa de acordo com o teste de Tuckey a 5%, quanto a penetração dos esporos do fungo nas duas cultivares.

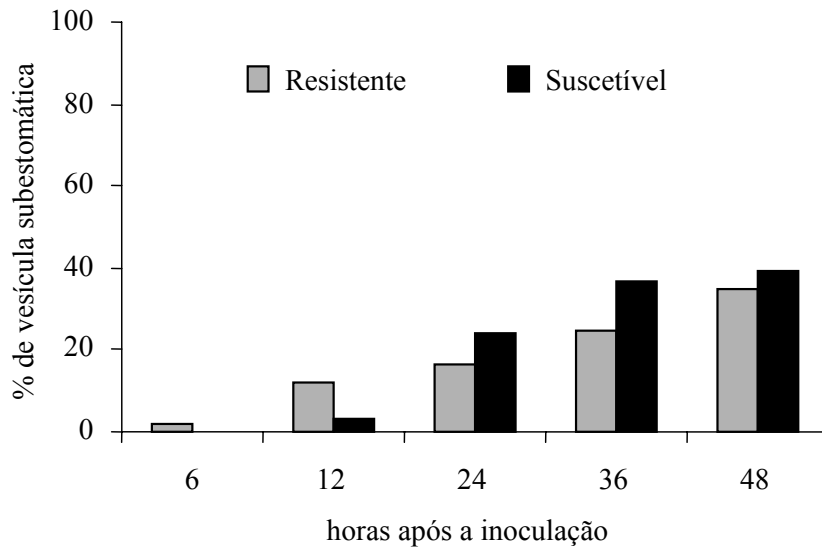


Figura 4 - Formação de vesícula de *Stemphylium solani* na cavidade subestomática de tomateiro resistente e suscetível. Não houve diferença significativa de acordo com o teste de Tuckey a 5%, quanto a formação de vesícula subestomática nas duas cultivares.

penetração direta foi eventual e ocorreu através da parede periclinal das células da epiderme (Figura 5 D). Ao que parece, a entrada do tubo germinativo na abertura estomática ocorre ao acaso, uma vez que foram observados os tubos germinativos do fungo ao lado ou por cima do estômato aberto, sem que houvesse penetração (Figura 6 C e D). Em algumas ocasiões, verificou-se a intumescência do ápice do tubo germinativo, originando uma estrutura semelhante a apressório (Figura 7 A e B), mas não se observou penetração a partir desta estrutura. Na maioria dos casos, não houve diferenciação do tubo germinativo durante a penetração.

Em ambas cultivares, encontraram-se papilas entre o plasmalema e a parede das células da epiderme, produzidas em resposta ao contato do tubo germinativo de *S. solani* com estas células (Figura 8 A, B e C). Ao que parece, a formação de papilas impede a penetração direta do patógeno, que então utiliza os estômatos como via alternativa para penetrar. No entanto, em alguns sítios de

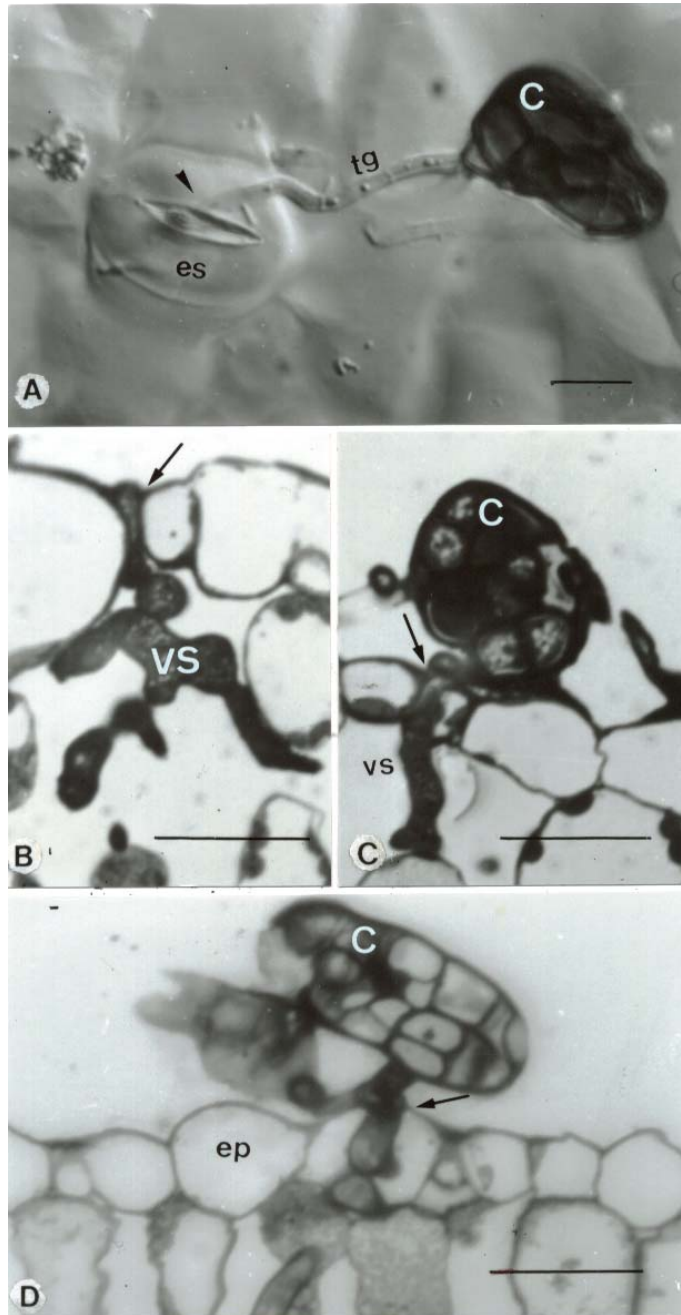


Figura 5 - Penetração de *Stemphylium solani* em folhas de tomateiro. A) Conídio germinado, com um tubo germinativo penetrando na abertura estomática (seta) de tomateiro resistente, 48 h.a.i. B) penetração via estômato (seta) e vesícula subestomática em tomateiro suscetível, 24 h.a.i. C) Conídio de *S. solani* com tubo germinativo penetrando pelo estômato (seta), e vesícula subestomática em tomateiro suscetível. D) Conídio de *S. solani* com tubo germinativo penetrando diretamente na célula da epiderme da c.v. suscetível. Barra em A, B, C e B = 20 μ m. h.a.i. = horas após a inoculação; tg = tubo germinativo; c = conídio de *S. solani*; es = estômato; vs = vesícula subestomática; ep = epiderme.

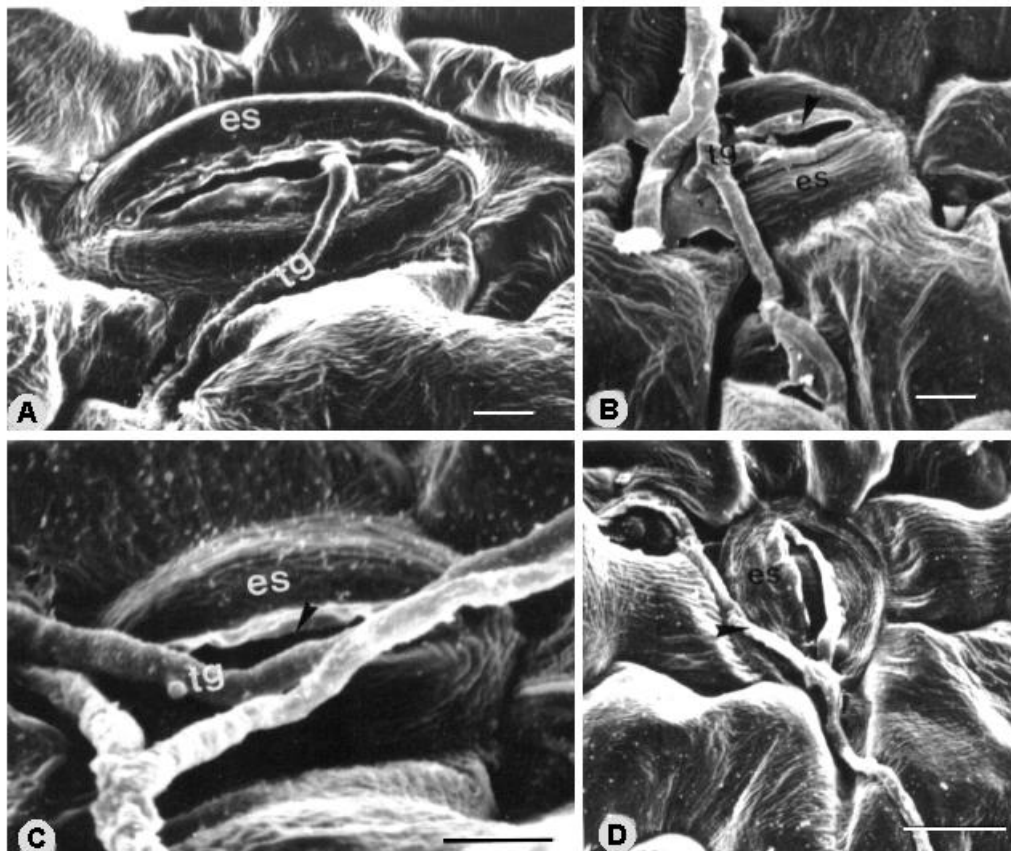


Figura 6 - Penetração do tubo germinativo de *S. solani* em tomateiro via estômato, observada ao microscópio eletrônico de varredura. A) Penetração da porção terminal do tubo germinativo de *S. solani* através da abertura estomática. B) Penetração da porção lateral do tubo germinativo de *S. solani* na abertura estomática (seta). C) Tubo germinativo de *S. solani* sobre o ostíolo do estômato (seta), sem penetrar no hospedeiro. D) Tubo germinativo ao lado da abertura estomática, sem penetração. Barra em A, B, e C = 5 μm ; em D = 10 μm . es = estômato; tg = tubo germinativo.

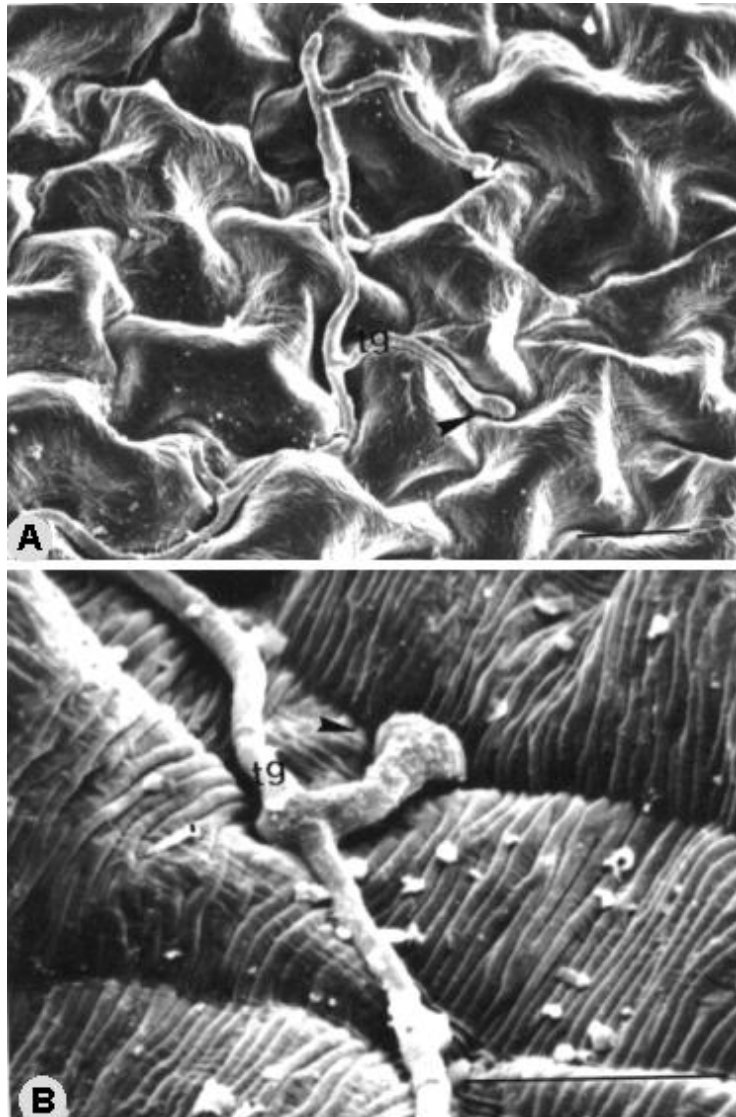


Figura 7 - Estrutura semelhante a apressório no tubo germinativo de *S. solani*, observada em microscópio eletrônico de varredura. A) Estrutura semelhante a apressório (seta) no tubo germinativo de *S. solani*, entre células da epiderme, na superfície foliar da c.v. resistente de tomateiro. B) estrutura semelhante a apressório (seta) na parede anticlinal de células da epiderme, na c.v. suscetível de tomateiro. Barra =10 μ m. tg = tubo germinativo.

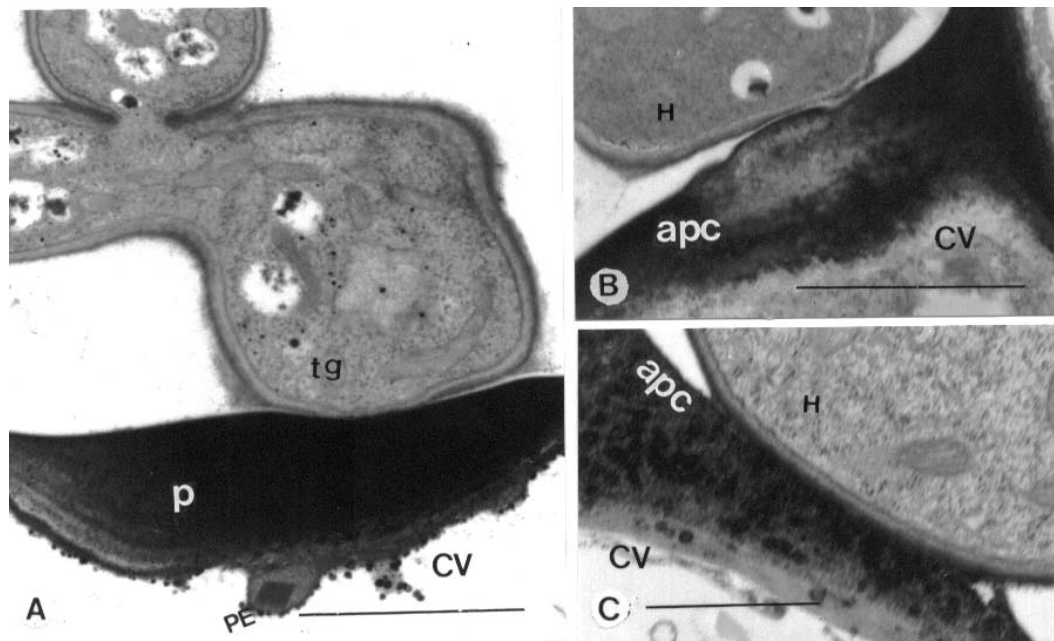


Figura 8 - Alterações da parede celular em células epidérmicas de folhas de tomateiro resistente e suscetível a *S. solani*. A) Tubo germinativo de *S. solani* em contato com célula da epiderme da c.v. resistente. Célula vegetal apresentando papila no sítio da tentativa de penetração do fungo. B e C) Aspecto ultraestrutural de alteração de parede celular na célula da epiderme foliar da c.v. suscetível, no ponto de contato entre a hifa do patógeno e a parede celular do hospedeiro. Barra em A e B= 2 μm ; em C = 1 μm . tg = tubo germinativo; p = papila; PE = peroxissomo; H = hifa do patógeno; apc = alteração de parede celular; CV = célula vegetal.

penetração nas células da epiderme, não houve formação de papilas, ou estas não foram eficientes em prevenir a entrada do patógeno, tendo ocorrido a penetração direta do tubo germinativo nestas células.

Após a penetração, a hifa se expandiu originando uma vesícula de formato globoso ou irregular na cavidade subestomática; esta ramificou-se, originando hifas secundárias que colonizaram o mesofilo do hospedeiro (Figura 9 A, B, C e D). Com 24 e 36 h.a.i., as hifas de *S. solani* haviam-se estabelecido no mesofilo das cultivares resistente e suscetível (Figura 10 A, B, C, D e E). Em alguns

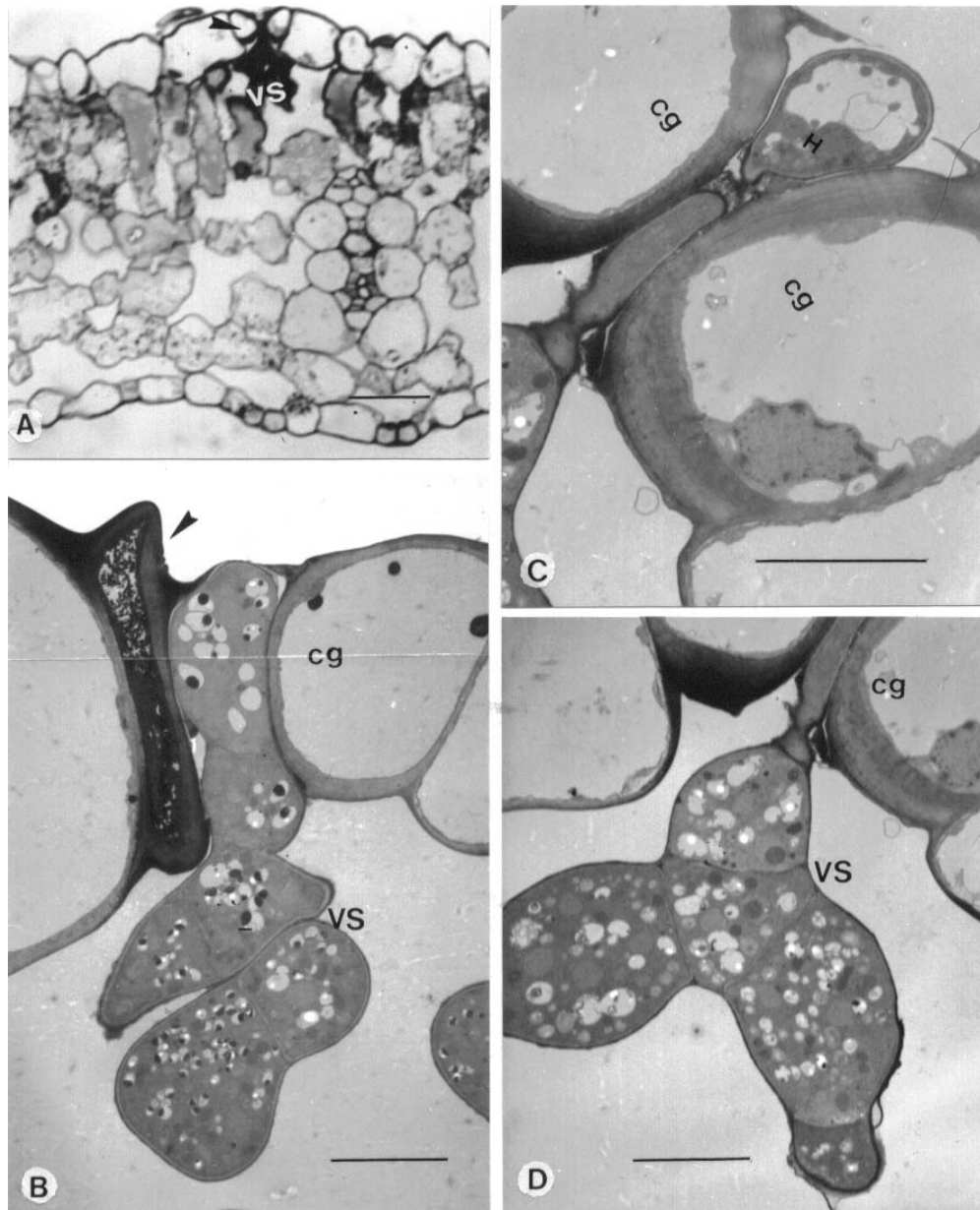


Figura 9 - Penetração de *S. solani* via estômatos e formação de vesícula subestomática em tecido foliar de tomateiros resistente e suscetível. A) Penetração através do estômato (seta) e presença de vesícula subestomática em tecido foliar de tomateiro suscetível, 48 h.a.i.. B) Célula-guarda do estômato comprimida durante a penetração (seta) e formação de vesícula subestomática em c.v. resistente, 48 h.a.i., observada ao microscópio eletrônico de transmissão (MET). C e D) vista seqüencial da penetração do tubo germinativo de *S. solani* entre as células-guardas do estômato, em C, e formação de vesícula subestomática, em D, em tomateiro suscetível, observada ao MET. Barra em A = 20 μm ; em C, D e E = 5 μm . H = hifa do patógeno; cg = célula-guarda do estômato do hospedeiro; VS = vesícula subestomática.

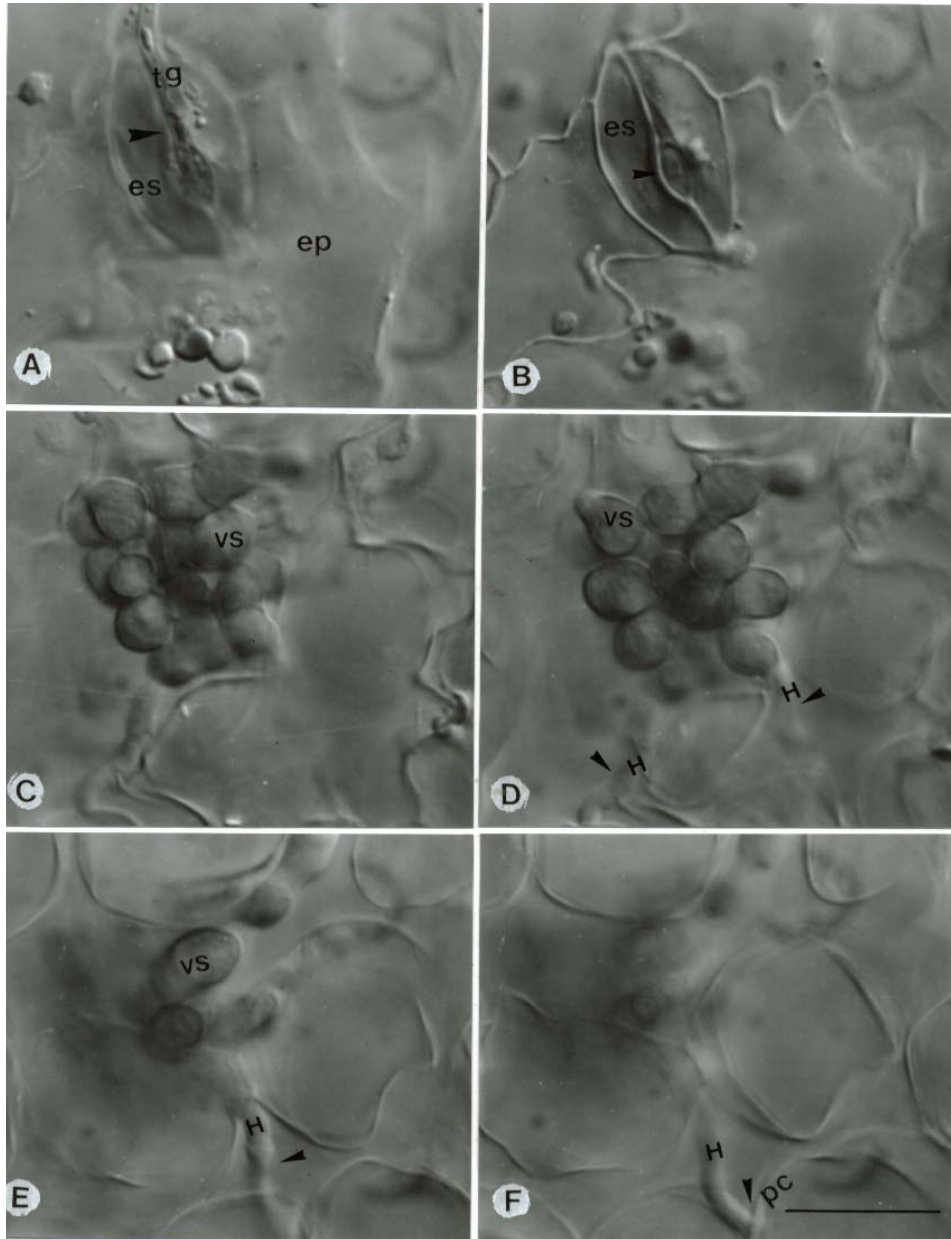


Figura 10 - Seqüência dos eventos no início da infecção de *S. solani* em tomateiro c.v. resistente, registrados 36 h.a.i., de um mesmo ponto de infecção em amostras diafanizadas, sob diferentes focos. A) Tubo germinativo de *S. solani* (seta) penetrando na abertura estomática. B) Sítio de infecção no ostíolo do estômato (seta). C) Formação de vesícula subestomática na cavidade subestomática no parenquima paliçádico. D e E) Vesícula subestomática e hifas intercelulares ramificadas, no mesofilo (setas). F) Hifa intercelular em contato com a célula do parênquima. Célula vegetal apresentando alteração da parede celular (seta). Barra = 20 μ m. tg = tubo germinativo; es = estômato; VS = vesícula subestomática; ep = células da epiderme; pc = parede celular vegetal; H = hifa intercelular.

locais, as células do tecido paliçádico, em contato com as hifas, apresentavam alterações de parede celular ou formação de papilas (Figura 10 F). Decorridas 36 h.a.i., os locais de infecção na cultivar suscetível caracterizavam-se pelo colapso de células do mesofilo e pela grande quantidade de hifas secundárias dentro e entre células. Neste período, começou-se a observar lesões macroscópicas, que com o tempo se desenvolveram em sintomas típicos da doença e evoluíram para murcha e queda das folhas. Na c.v. suscetível foi observado a degradação do conteúdo celular e colapso de células mesofilo, na presença de hifas intercelulares, e em células distantes das hifas do patógeno, demonstrando que a estratégia de infecção do fungo é do tipo necrotrófica.

Na cultivar resistente, decorridas 48 h.a.i., observou-se o colapso de algumas células, originando pequenas lesões macroscópicas. Estas não cresceram, permitindo o desenvolvimento normal do hospedeiro. Apesar de não surgirem sintomas típicos da doença no tomateiro resistente, hifas do patógeno foram localizadas infectando tecidos foliares deste hospedeiro.

Nos ensaios onde a inoculação foi feita com gotas de 30 µl de suspensão de esporos e cobertas com disco de papel de filtro esterilizado, observou-se o surgimento de lesões encharcadas no ponto de inoculação, na cultivar resistente. Estas lesões não aumentaram de tamanho nem originaram sintomas típicos da doença. Provavelmente estas lesões surgiram devido ao acúmulo de água no local de deposição das gotas de inóculo, tornando os tecidos encharcados. Na cultivar suscetível observou-se sintomas típicos da doença no ponto de inoculação.

Não foi detectada autofluorescência nas áreas lesionadas das amostras observadas, das cultivares resistente e suscetível. No entanto, em observações feitas ao MET, em células dispersas do mesofilo, tanto na c.v. Moneymaker como na c.v. Motelle, foram detectadas alterações em cloroplastos, mitocôndrias e núcleo. Nessas células, observaram-se massas de material eletrondenso, indicando a condensação de cromatina. Ao redor, o citoplasma apresentou-se desorganizado, com cloroplastos degradados (Figura 11 A e B).

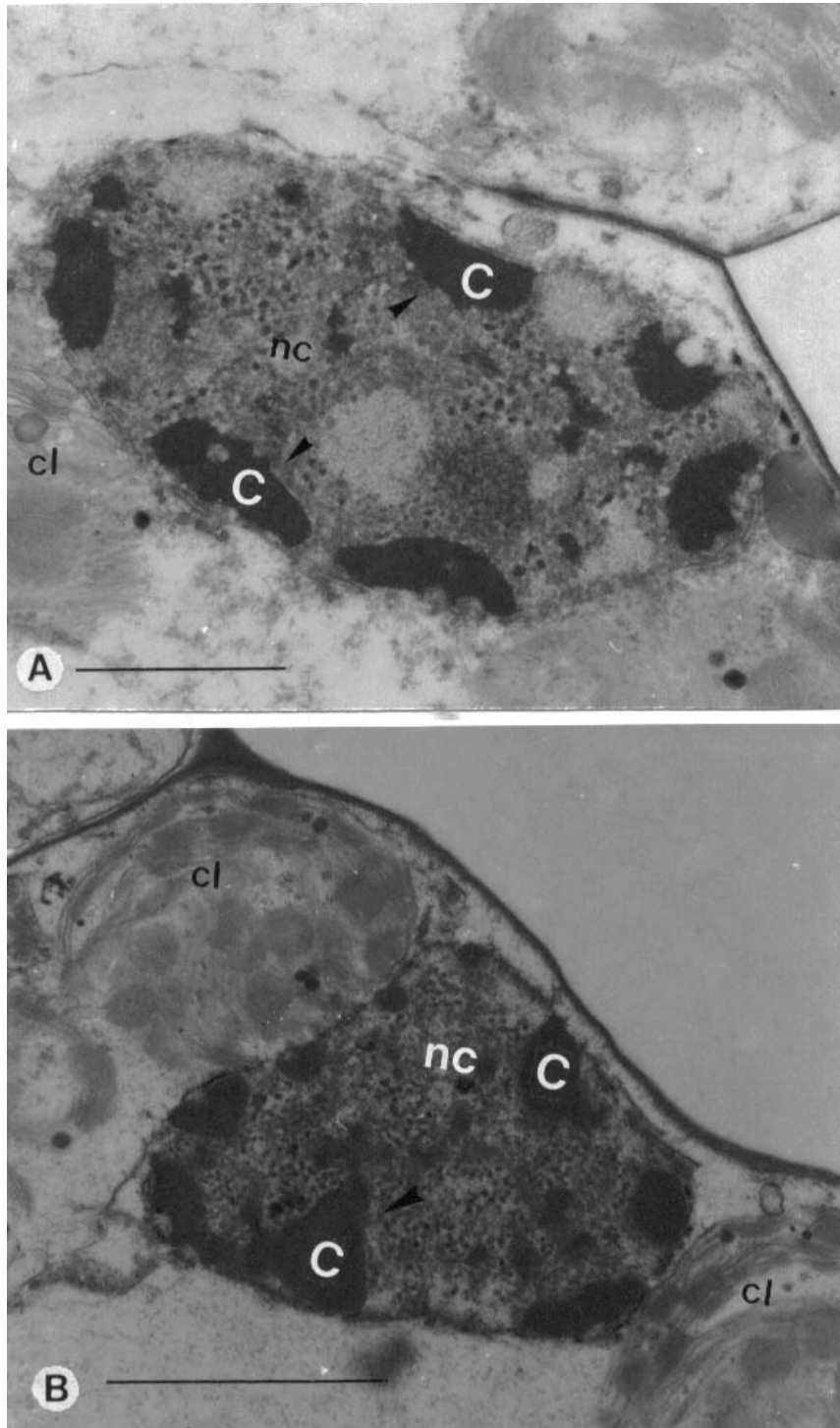


Figura 11 - Alterações nucleares em células do mesofilo de tomateiro infectado por *S. solani*. A) Núcleo de célula do mesofilo da c.v. resistente da c.v. suscetível (B) com massas de material eletrondenso possivelmente resultantes da condensação da cromatina (setas). Cloroplastos nas células das duas cultivares apresentando-se desorganizados. Barra, em A = 1 μm ; em B = 2 μm . nc = núcleo; C = cromatina condensada; cl = cloroplastos.

4.4. Colonização dos tecidos

Nas amostras examinadas em cortes semifinos e ultrafinos, confirmaram-se as observações feitas em amostras diafanizadas e foram obtidas importantes informações adicionais sobre a interação entre *S. solani* e o tomateiro resistente e suscetível.

A colonização dos tecidos ocorre tanto de forma inter como intracelular, nos parênquimas do mesofilo, tanto na cultivar resistente como na suscetível. Em alguns casos, foi observado material eletrondenso depositado ao redor das hifas intracelulares do fungo (Figura 12 A e B). Em observações feitas no microscópio eletrônico de transmissão, nas duas cultivares, as células do mesofilo em contato com as hifas do patógeno não apresentavam parede celular definida, possivelmente em decorrência de degradação enzimática da parede celular do hospedeiro no sítio de penetração da hifa (Figura 13 A, B e C). Na c.v. resistente, enquanto a colonização se limitava aos espaços intercelulares, as células do parênquima apresentavam-se pouco danificadas e com muitos cloroplastos aparentemente intactos. Quando a hifa do fungo conseguia penetrar na célula, causava a degradação dos cloroplastos e colapso celular. No entanto, a colonização intracelular no material resistente poucas vezes ocorreu e, quando verificada, era reduzido o número de células afetadas, originando lesões pequenas (Figuras 14 A e 15 A). Na cultivar suscetível, os tecidos apresentavam-se intensamente colonizados, as células do mesofilo estavam danificadas e com cloroplastos destruídos ou sem conteúdo (Figuras 14 B e 15 B e C). Também não se constatou estreitamento das hifas durante a penetração nas células do parênquima. Aparentemente, o seu diâmetro permaneceu inalterado enquanto penetravam nestas.

Na cultivar resistente, papilas formaram-se nas células do parênquima (Figura 16 de A a F). Aparentemente, estas papilas foram eficientes em restringir a colonização intracelular na maioria das células, evitando o colapso das mesmas. No entanto, ainda não está clara a participação efetiva das papilas na resistência da c.v. Motelle a *S. solani*.

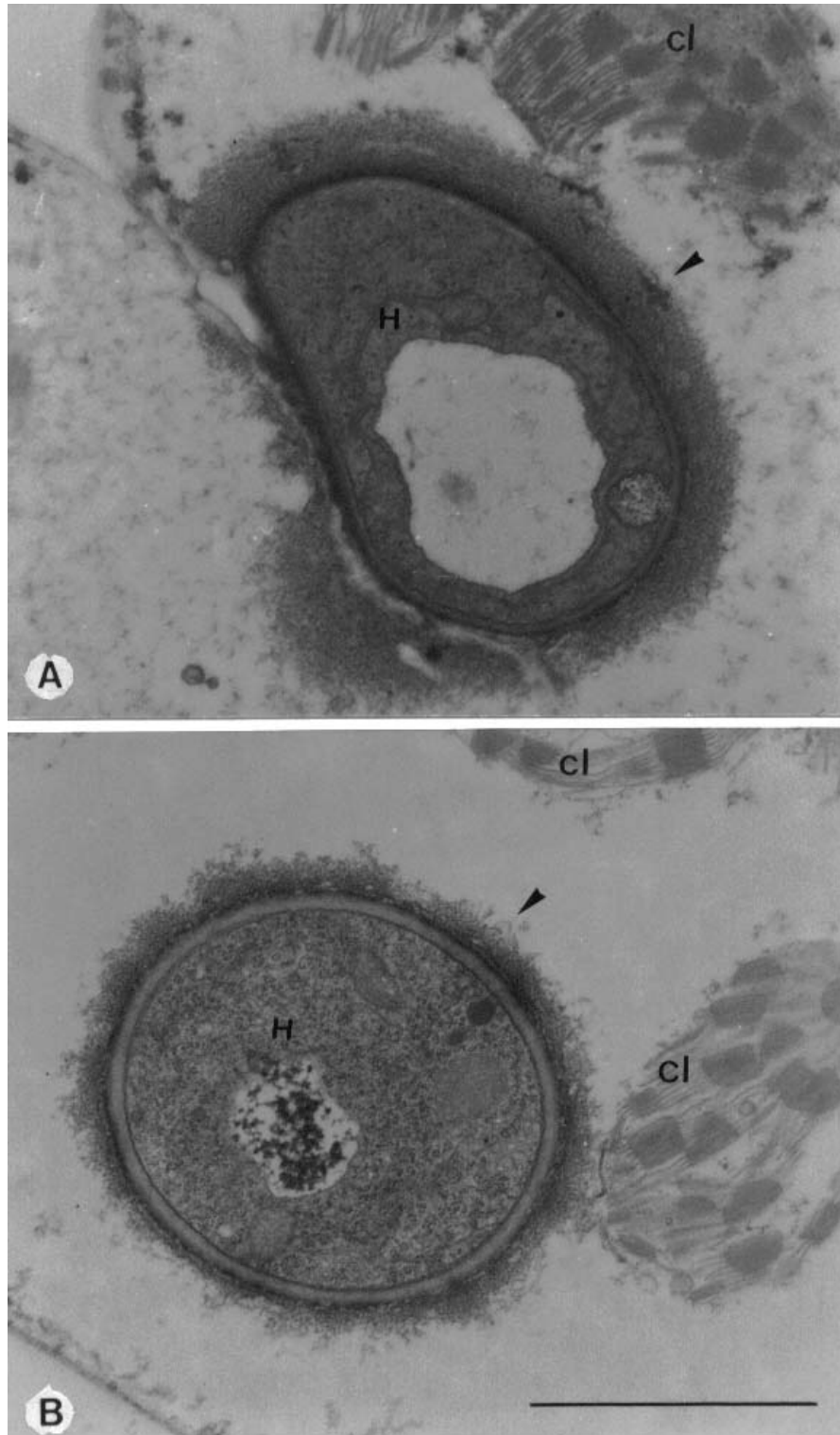


Figura 12 - Hifa intracelular de *S. solani* apresentando material extracelular elentrodensso (setas) na c.v. resistente (A) e na c.v. suscetível (B). Barra = 2 μ m. H = hifa intracelular; cl = cloroplastos.

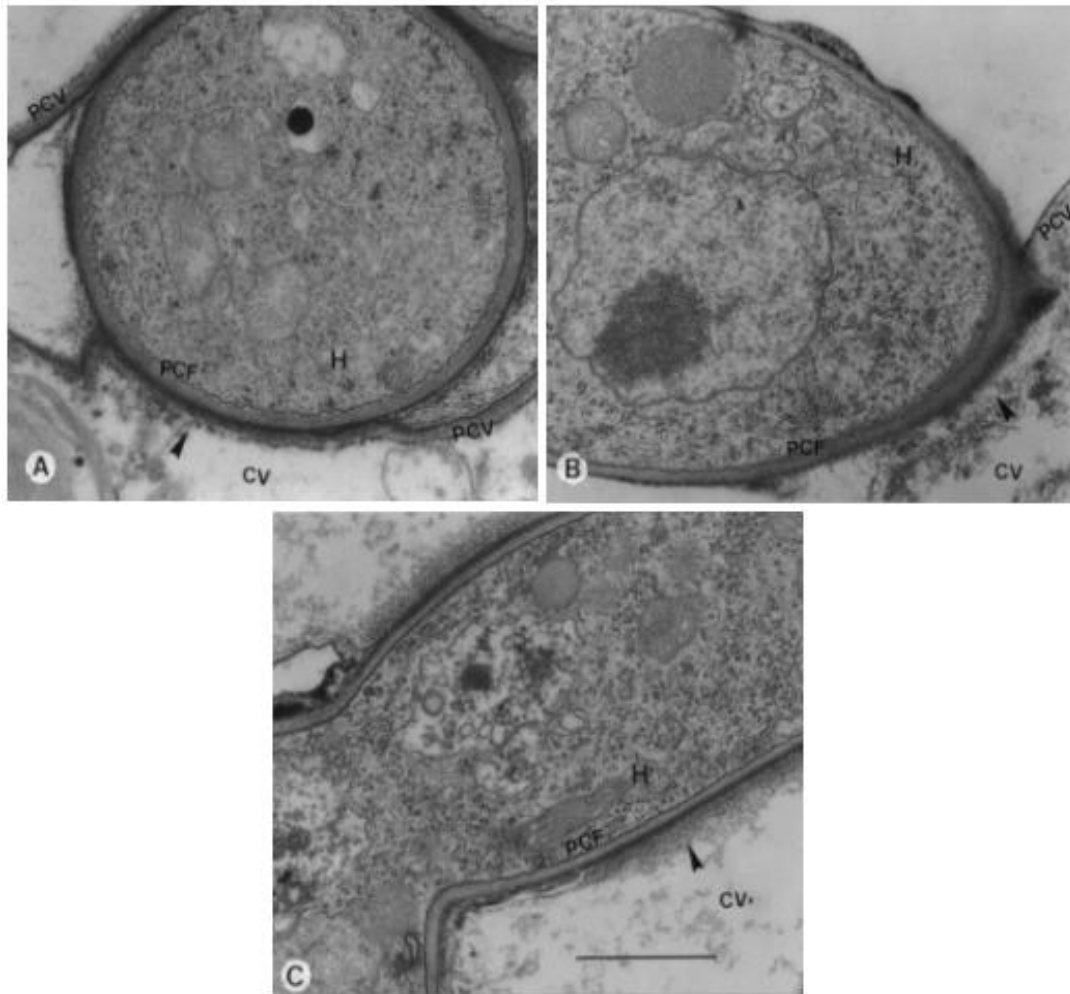


Figura 13 - Degradação enzimática da parede da célula hospedeira. A) Hifa intercelular de *S. solani* em contato com célula do mesofilo do tomateiro resistente. Parede celular do hospedeiro não é visível no ponto de contato (seta) entre a hifa do patógeno e a célula vegetal. B) Parede celular de célula do mesofilo da c.v. suscetível degradada pelo contato com a hifa do patógeno (seta). C) Degradação de parede celular de células vizinhas durante o crescimento da hifa intracelular de *S. solani*, através das células do mesofilo. Barra = 1 μm . H = hifa do patógeno; PCV = parede celular vegetal; PCF = parede celular do fungo; CV = célula vegetal.

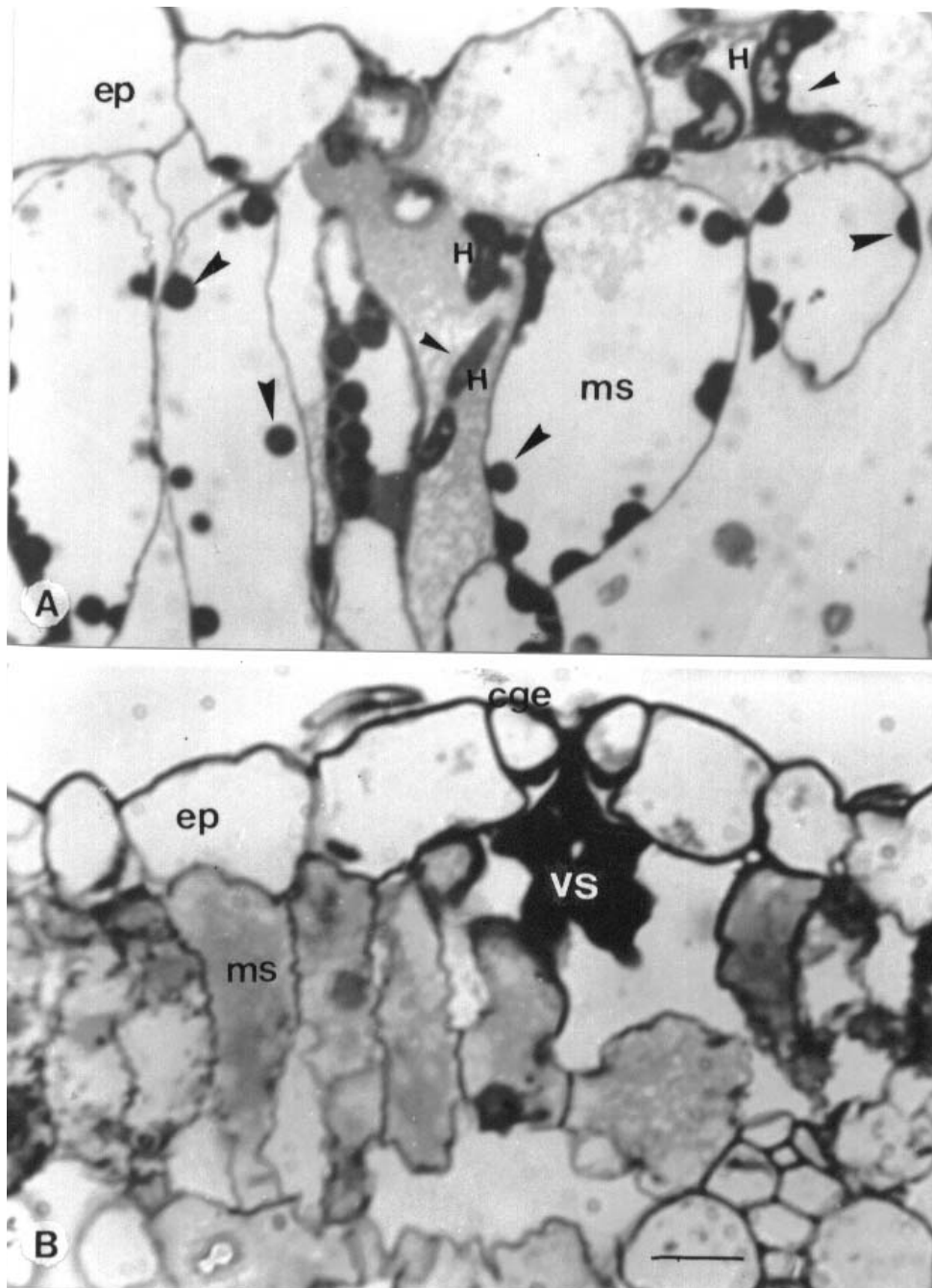


Figura 14 - Tecidos colonizados dos tomateiros resistente e suscetível, observados em corte semifino, 24 h.a.i. A) Tecido do tomateiro resistente apresentando hifas intracelulares (setas) nas células do mesofilo. Note que o tecido está bem preservado, em comparação com o material suscetível (em B), e com inúmeros cloroplastos. B) Tecido da cultivar suscetível com vesícula subestomática. Células do mesofilo apresentam-se degradadas, sem cloroplastos, na ausência de hifas intracelulares. Barra = 10 μ m. ep = epiderme foliar; ms = mesofilo; H =hifa intracelular; cge = célula-guarda de estômato; VS = vesícula subestomática.

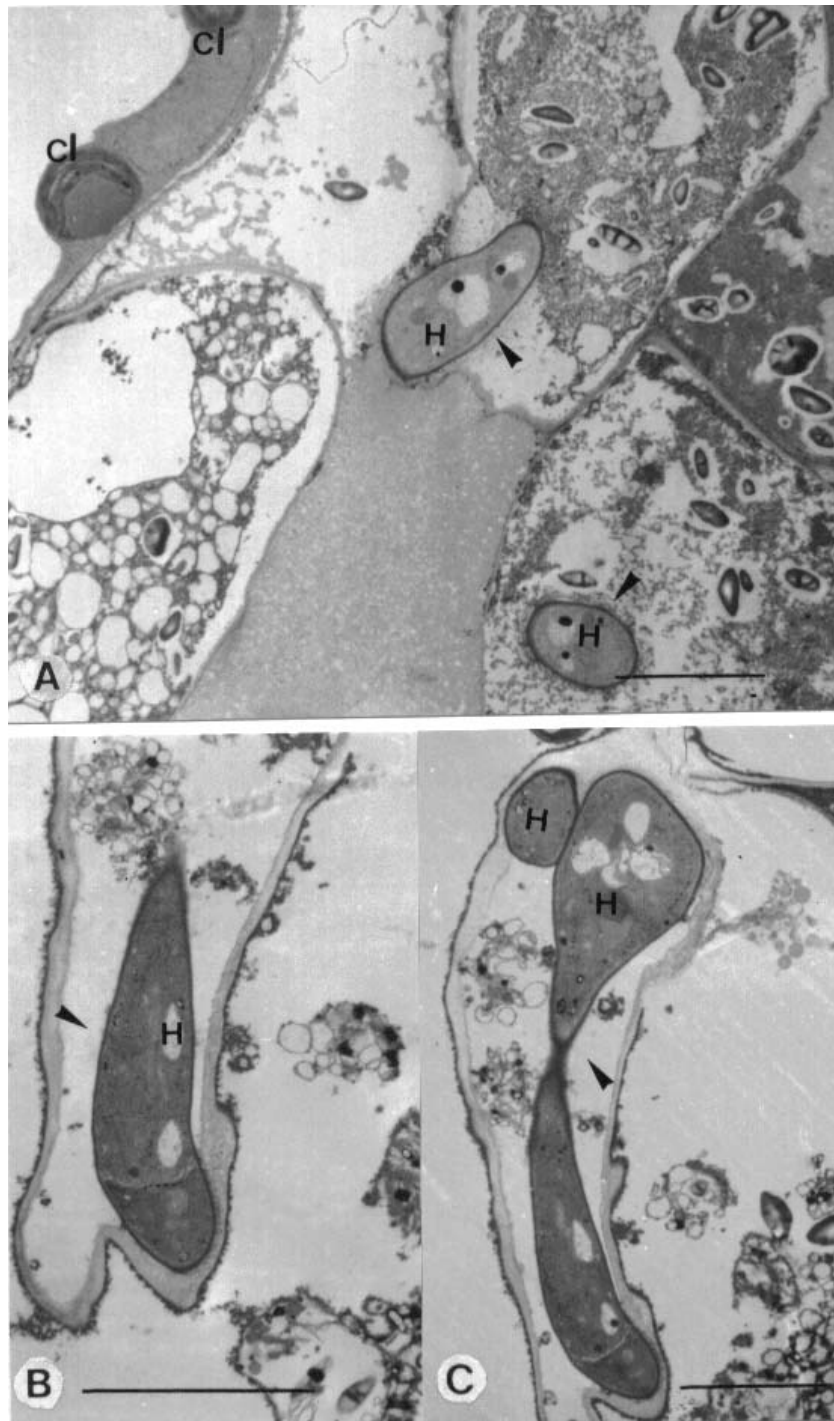


Figura 15 - Colonização do mesofilo foliar de tomateiro, observada em microscópio eletrônico de transmissão. A) Hifas intracelulares (setas) nas células do mesofilo da cultivar resistente, 24 h.a.i., apresentando seu conteúdo desorganizado, sendo possível ainda diferenciar cloroplastos. B) Hifas intracelulares (setas) nas células do mesofilo da cultivar suscetível, 24 h.a.i, apresentando-se com citoplasma degenerado. Barra em A, B, e C = 5 μ m. H = hifas do patógeno; cl = cloroplastos.

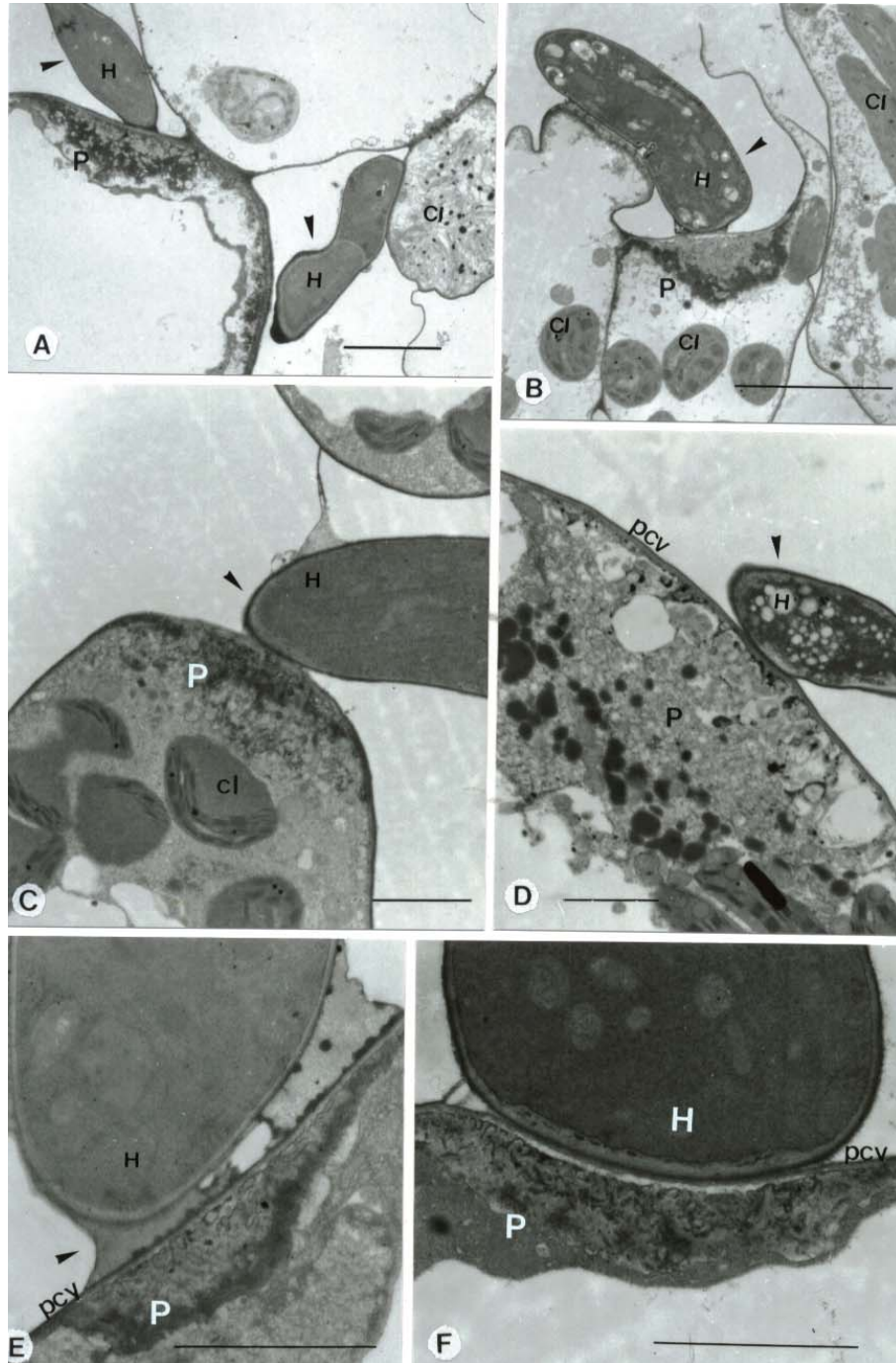


Figura 16 - Papilas parede celular das células do mesofilo da cultivar resistente, observadas em microscópio eletrônico de transmissão. A, B, C e D) Hifas intercelulares de *S. solani* (setas) em contato com células do hospedeiro, 24 h.a.i., apresentando diferentes tipos de papilas. E) Matriz extracelular (seta) entre hifa do patógeno e célula do hospedeiro apresentando papila. F) Papila formada no ponto de contato entre a hifa do patógeno e a parede celular do hospedeiro. Barra em A e B = 5 μm ; em C, D, E e F = 2 μm . H = hifa do patógeno; P = papila; cl = cloroplastos; pcv = parede celular vegetal.

Apesar de não terem sido quantificadas nas duas cultivares, a frequência de papilas na c.v. suscetível aparentou ser menor que a observada na c.v. resistente. Em alguns casos, observou-se "engrossamento" da parede celular do hospedeiro suscetível em contato com a hifa do patógeno. Mas, ao que parece, essas alterações da parede celular não foram suficientes para restringir a colonização intracelular na c.v. Moneymaker (Figura 17 de A a F).

4.5. Localização de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Precipitados de peridróxido de cério foram constatados na parede de células do mesofilo em tecidos infectados da cultivar resistente (Figura 18 A e D) e da cultivar suscetível (Figura 19 de A a F) em contato com hifas do patógeno, indicando a presença no local de H₂O₂, independentemente de a planta ser ou não resistente. Estas observações sugerem que o H₂O₂ presente nestas células pode estar relacionado com respostas intrínsecas de defesa das cultivares estudadas, como a deposição de substâncias na parede celular do hospedeiro (Figura 18 A, C e D; Figura 19 C) ou com a síntese de compostos fenólicos.

No 1º controle, em que amostras das cultivares resistente e suscetível foram tratadas com CeCl₃, mas não foram inoculadas com o patógeno, observou-se a deposição de material eletron denso na parede celular das cultivares. Esta resposta, verificada na ausência do fungo, pode ter sido induzida pela presença constitutiva de H₂O₂ nas plantas. O conteúdo celular destas amostras apresentou-se preservado, com cloroplastos e mitocôndrias intactos (Figura 20).

No 2º controle, onde amostras das cultivares resistente e suscetível não foram tratadas com CeCl₃ e foram inoculadas com o patógeno, não se constatou material precipitado ou depositado na parede celular do hospedeiro (Figura 21).

Não tendo sido verificada qualquer reação diferencial entre as duas cultivares, quanto a presença de precipitados de peridróxido de cério, sugere-se que H₂O₂ não deve ser participante direto da resistência manifestada pela cv. Motelle contra *S. solani*.

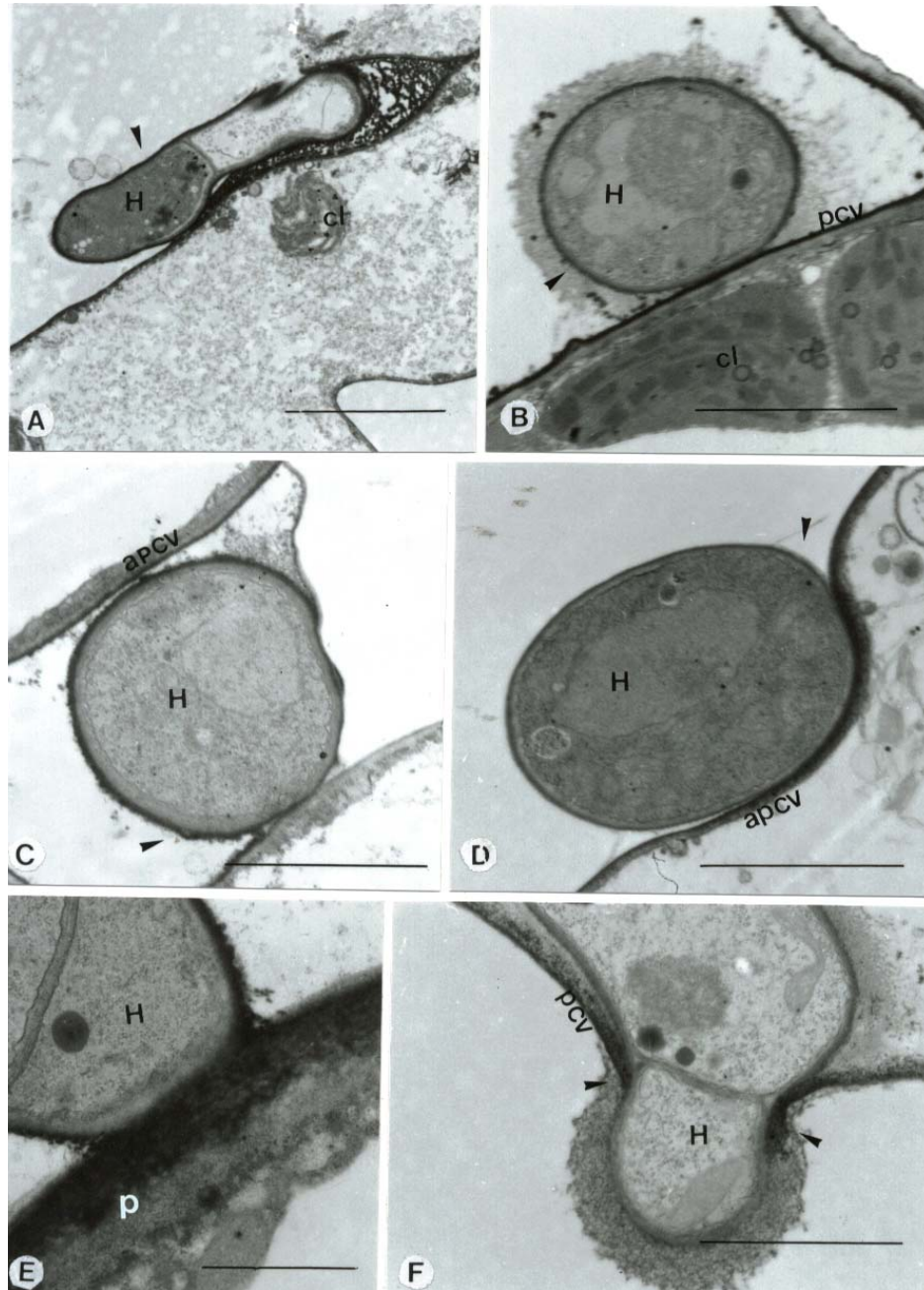


Figura 17 - Alterações da parede celular na cultivar suscetível observadas em MET. A, B, C e D) Hifas intercelulares em contato com as células do hospedeiro, que apresentam parede espessada (setas). E) Papila em célula do mesofilo, no sítio da tentativa de penetração. Não é possível distinguir a parede celular do hospedeiro. F) Hifa intracelular saindo da célula. Rompimento da parede celular (setas) do hospedeiro indicando o envolvimento de pressão exercida pela hifa para transpor a parede celular vegetal. Barra em A = 5 μ m; em B, C, D e F = 2 μ m; em E = 1 μ m. H = hifa; cl = cloroplastos; apcv = alteração de parede celular vegetal; pcv = parede celular vegetal; p = papila.

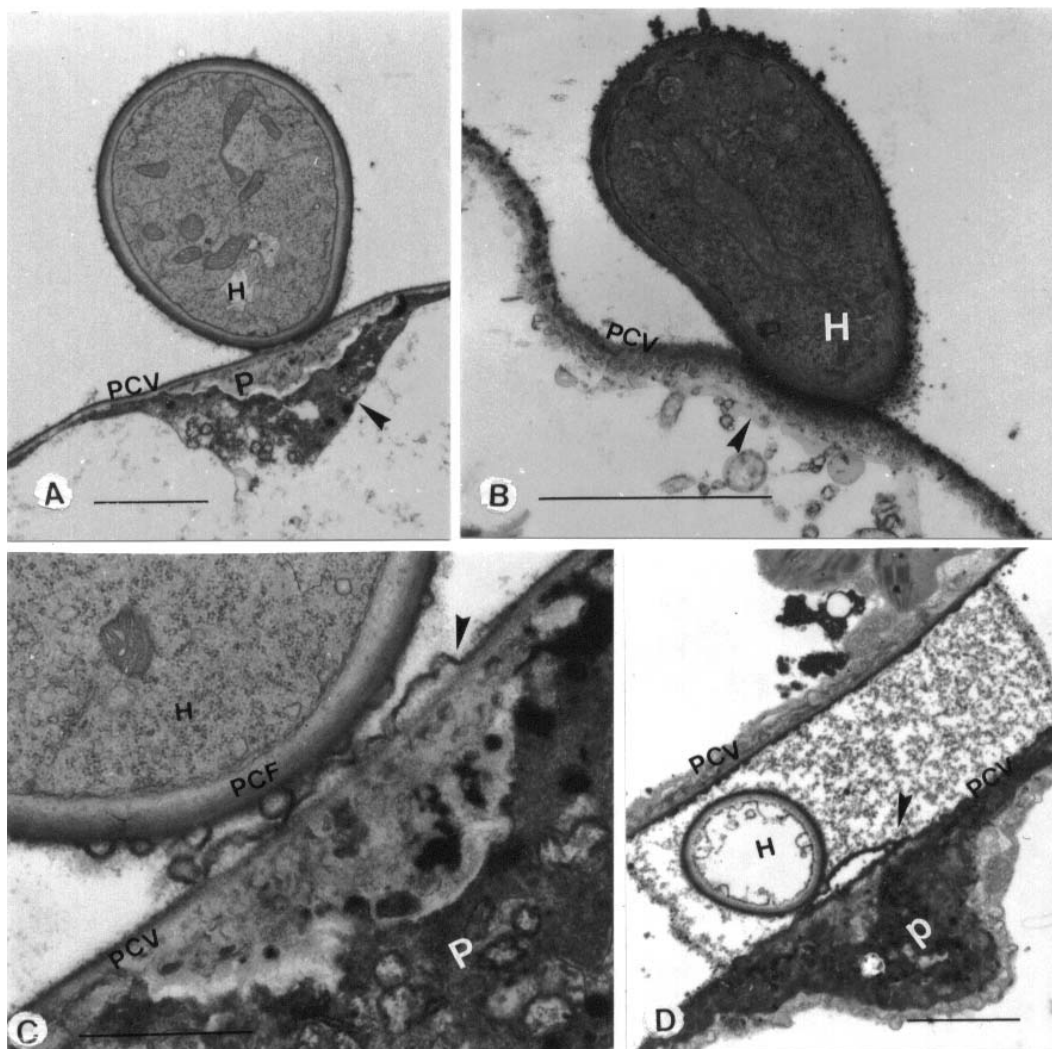


Figura 18 - Presença de precipitados de peridróxido de cério nas células do mesofilo de tomateiro resistente a *S. solani*. A) Deposição de material eletrondenso (seta) junto à papila formada na parede celular de célula do mesofilo em contato com a hifa do fungo. B) Precipitados de peridróxido de cério (seta) ao longo da parede celular da célula vegetal em contato com hifa do fungo. C) Acúmulo de precipitados junto à papila formada em célula em contato com patógeno. D) Hifa intercelular sem conteúdo, em contato com parede celular apresentando papila e acúmulo de precipitado (seta). Barra em A, C, D e F = 2 μm ; em B = 5 μm ; em E = 1 μm . H = hifa; P = papila; PCF = parede celular do fungo; PCV = parede celular vegetal.

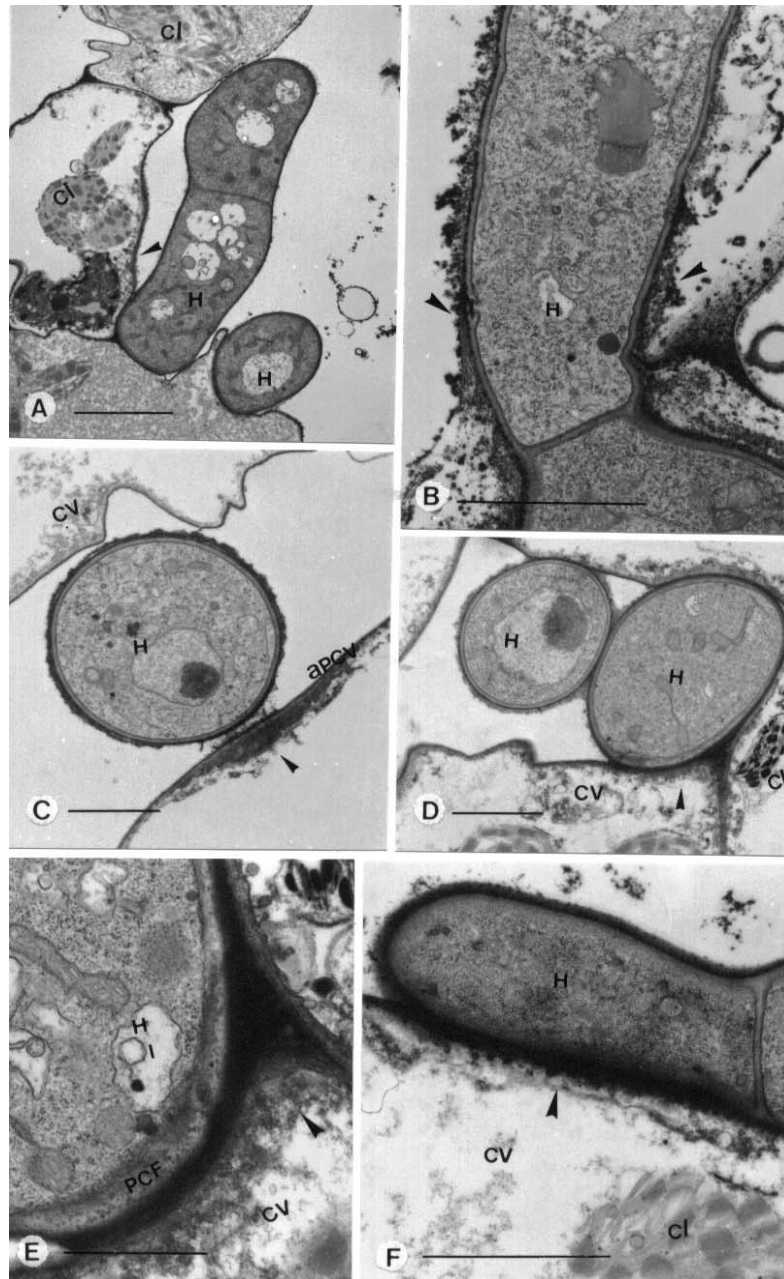


Figura 19 - Precipitados de peridróxido de cério em células do mesofilo de tomateiro suscetível infectado por *S. solani*. A) Célula vegetal em contato com a hifa intercelular de *S. solani*, apresentando acúmulo de precipitados de peridróxido na parede celular vegetal. B) Hifa intracelular de *S. solani* apresentando acúmulo de precipitados de peridróxido de cério. C) Acúmulo de precipitados de peridróxido de cério junto a alteração de parede celular na parede celular da célula vegetal. D, E e F) Material eletrondenso na parede celular vegetal em contato com as hifas do patógeno (seta). Barra em A = 5 μm ; em B, C, D e F = 2 μm ; em E = 1 μm . H = hifa; cl = cloroplastos; cv = célula vegetal; apcv = alteração de parede celular vegetal; PCF = parede celular do fungo.

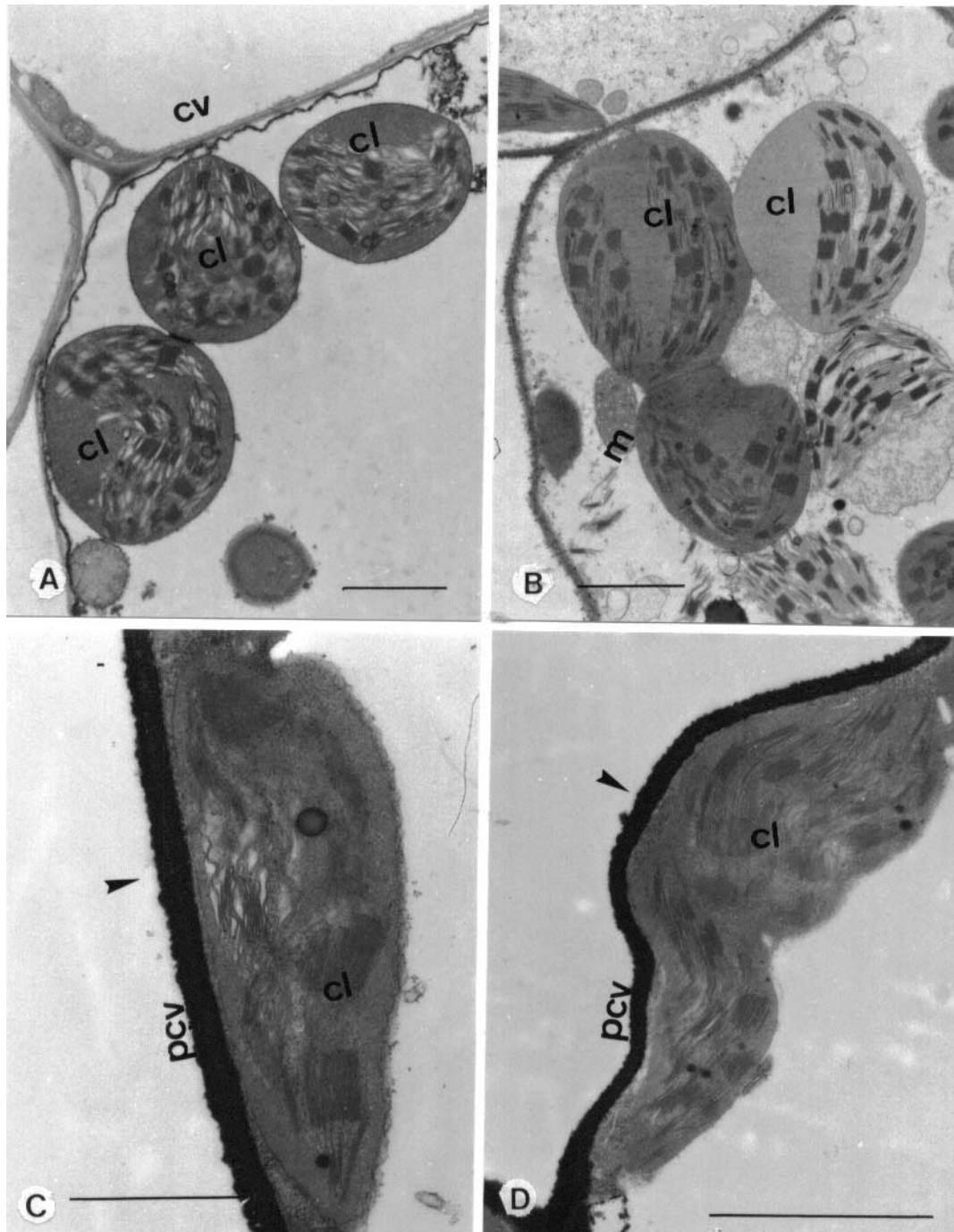


Figura 20 - Tecidos foliares das cultivares resistente e suscetível tratados com $CeCl_3$ e não inoculado com o patógeno (controle 1). A) Células da c.v. resistente apresentando cloroplastos intactos, sem a presença do fungo. (B) Célula da c.v. suscetível com cloroplastos e mitocôndrias intactos, na ausência do patógeno. C e D) Deposição de material eletrondenso (setas) na parede celular do hospedeiro resistente (C) e suscetível (D) indicando o acúmulo de precipitados de peridróxido de cério. Barra em A, B e D = 2 μm ; em C = 1 μm . cl = cloroplastos; m = mitocôndria; pcv = parede celular vegetal; cv = célula vegetal.

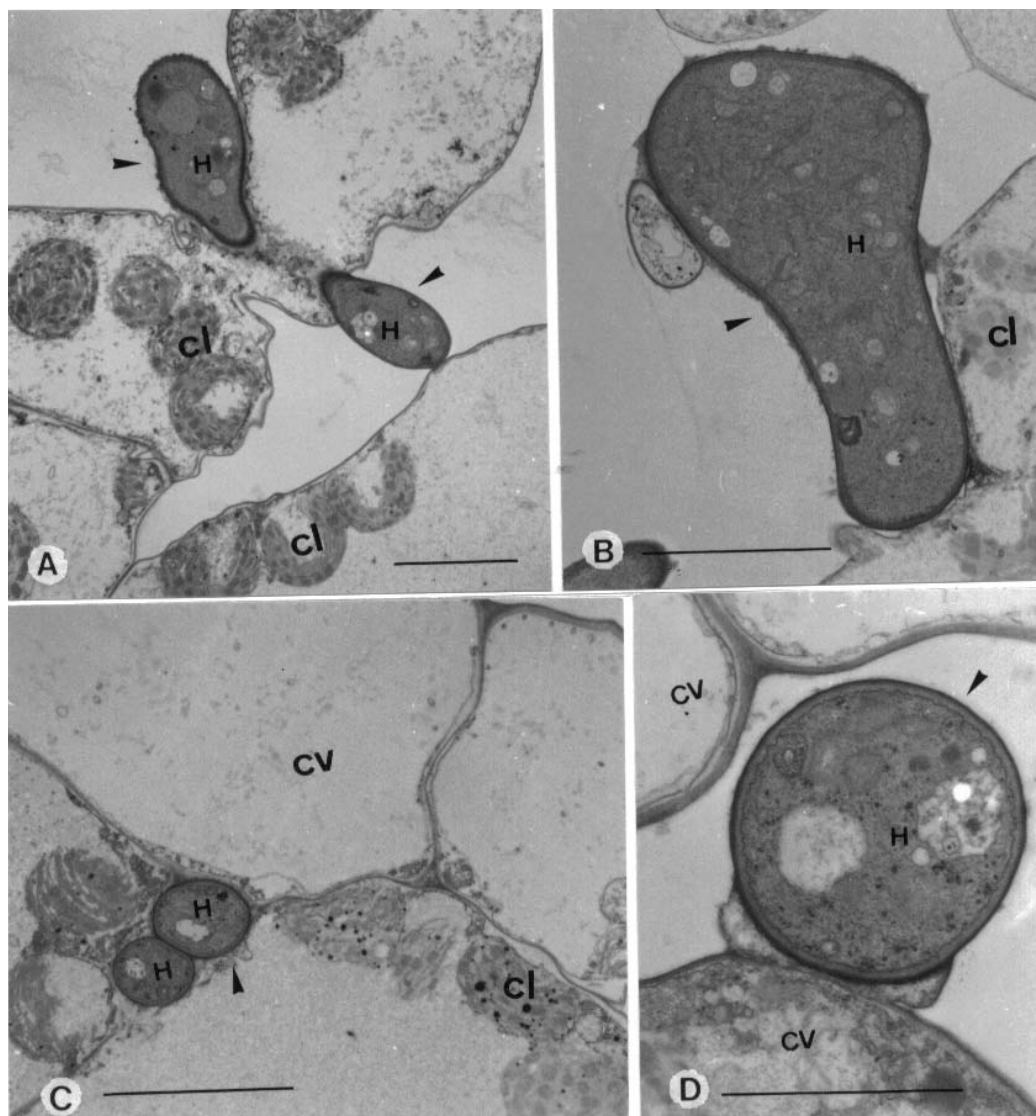


Figura 21 - Tecido foliar das cultivares resistente e suscetível não tratado com CeCl_3 e inoculado com o patógeno (controle 2). A e B) Hifas intercelulares (setas) em contato com células do mesófilo da c.v. resistente, sem acúmulo de precipitados de peridróxido de cério na parede da célula vegetal. C e D) Hifas intercelulares (setas) em contato com células do mesófilo da c.v. suscetível, sem acúmulo de precipitados na parede da célula vegetal. Barra em A, B e C = 5 μm ; em D = 2 μm . H = hifa; cl = cloroplasto; cv = célula vegetal.

5. DISCUSSÃO

O processo de infecção observado na interação *Stemphylium solani* e tomateiro resistente ('Motelle') e suscetível ('Moneymaker'), assemelhou-se ao descrito por DIENER (1955) em tomateiros de cultivares suscetíveis (cvs. Louisiana Pink e Marglobe). Os tubos germinativos produzidos pelos esporos se alongaram na superfície do hospedeiro e, ocasionalmente, terminaram em estrutura semelhante a apressório. Não foi observada a penetração a partir de tal estrutura. SUHERI e PRICE (2000) também reportaram apressórios terminais e intercalares no tubo germinativo de *S. vesicarium*. Destes, 60% penetraram com sucesso no hospedeiro. No presente estudo, as hifas dos esporos germinados foram bem sucedidas em penetrar o hospedeiro e sem o envolvimento de apressório, indicando que esta estrutura não é essencial para infecção no patossistema *S. solani* e tomateiro.

A penetração do patógeno nos tecidos do hospedeiro ocorreu principalmente via estômatos, sendo este o modo de penetração mais comum entre as espécies de *Stemphylium* (BORGES *et al.*, 1976; COWLING *et al.*, 1982; SUHERI e PRICE, 2000). Fatores químicos e físicos da superfície do hospedeiro podem influenciar no direcionamento do tubo germinativo e na diferenciação de estruturas de infecção de alguns fungos fitopatogênicos (HOCH e STAPLES, 1991). O reconhecimento de sinais químicos e topográficos pelo

tubo germinativo do fungo é chamado de quimiotropismo e tigmotropismo, respectivamente (STAPLES *et al.*, 1983). Na interação *S. solani* e tomateiro, a entrada do tubo germinativo na abertura estomática se dá ao acaso, sem ser influenciada pela proximidade do conídio com o estômato, já que o tubo germinativo ramifica-se e alonga-se na superfície foliar, passando sobre os estômatos abertos, sem penetrar no hospedeiro, sugerindo que neste patossistema não há interferência de sinais da superfície da planta, para o direcionamento do tubo germinativo e para a penetração no hospedeiro. COWLING *et al.* (1982) observaram o mesmo comportamento em alfalfa infectada por *S. botryosum*. O crescimento direcionado do tubo germinativo para os estômatos foi relatado por WYNN (1976), na interação *Uromyces phaseoli* var. *typica* e *Phaseolus vulgaris*, onde o tubo germinativo cresceu em ângulos retos sobre as células da epiderme até a abertura estomatal, onde os apressórios se diferenciaram. Este crescimento está relacionado com sinais topográficos da superfície do hospedeiro. ALLEN *et al.* (1991) demonstraram que o crescimento do tubo germinativo e a formação de apressório de diferentes espécies de ferrugens, ocorre em resposta a sinais topográficos da superfície onde estão depositados.

Foi observada penetração direta ocasional do tubo germinativo nas células da epiderme de ambas as cultivares. Na maioria dos casos, as papilas se formaram nessas células e foram a causa aparente do impedimento da penetração direta, sendo os estômatos uma via alternativa para penetrar no hospedeiro. A restrição da penetração nas células da epiderme pode resultar da ação inibitória de metabólitos presentes no sítio de formação de apressórios na parede celular, em conjunto com o impedimento físico (SHERWOOD e VANCE, 1980). KOGA *et al.* (1990) estudaram a interação *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* e linhagens resistente e suscetível de *Hordeum vulgare*, e observaram a mesma frequência de formação de papilas nas células da epiderme das linhagens em estudo, no entanto a maior porcentagem de papilas foi observada em células curtas próximas aos estômatos, enquanto que nas células mais longas longe dos estômatos o número de papilas foi menor, demonstrando que as células podem responder de forma

diferenciada à presença do patógeno, de acordo com suas características intrínsecas.

O tubo germinativo de *S. solani* não se diferenciou em uma hifa de infecção típica (peg de infecção) durante a penetração via estômatos ou nas células da epiderme. O mesmo foi observado por NELSON (1955) na interação *S. botryosum* e alfalfa, onde o fungo penetrou através dos estômatos ou na célula da epiderme, com o tubo germinativo mantendo o seu diâmetro aparentemente inalterado. A formação de vesícula subestomática e a colonização intercelular e intracelular parece ser um comportamento típico de *Stemphylium* spp. (DRAKE, 1963).

A estratégia de infecção do fungo *S. solani* em tomateiro é do tipo necrotrófica, uma vez que foi observado o colapso de células do mesofilo distantes das hifas do fungo ou em contato com hifas intercelulares, na c.v. suscetível, sugerindo o envolvimento de substâncias produzidas pelo patógeno, como enzimas e, ou, toxinas, para danificar ou matar as células do hospedeiro, e permitir a colonização dos tecidos, sendo este o comportamento típico de patógenos necrotróficos (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Neste estudo verificou-se a degradação da parede das células do mesofilo no ponto de contato entre as hifas e a célula vegetal. Estas observações sugerem o envolvimento de enzimas extracelulares produzidas pelo fungo, capazes de degradar os componentes da parede celular do hospedeiro, permitindo a colonização intracelular. Segundo WALTON (1994), enzimas degradadoras da parede celular são requeridas pelos patógenos para retirar nutrientes a partir da parede celular; para penetrar e ramificar nos tecidos. O envolvimento de enzimas na degradação de componentes da parede celular da planta hospedeira tem sido relatado em diversas interações envolvendo patógenos necrotróficos e hemibiotróficos. Na interação *Colletotrichum lindemuthianum* e *Phaseolus vulgaris*, foi demonstrado que o fungo, produz enzimas degradadoras da parede celular hospedeira, como poligalacturonase e endopectinaliase, que hidrolizam a fração péctica da parede celular vegetal, resultando na formação de lesões e na maceração dos tecidos (KEON, 1989). Na infecção de *Phomopsis helianthi* em

folhas de girassol, HELLER e GIERTH (2001) observaram que a degradação da parede celular do hospedeiro ocorreu pela ação de enzimas que se difundiram através do tecidos, antes da entrada da hifa nas células. Diferentes modos de ação foram verificados em diferentes locais da planta, tais como nos vasos condutores e nos parênquimas foliares, refletindo as diferenças na atividade enzimática do fungo e da composição da parede celular dos diferentes tecidos do hospedeiro. BENHAMOU e CÔTÉ (1992), utilizando técnicas de citoquímica, identificaram enzimas pécticas produzidas por *Phytophthora infestans* var. *nicotianae* infectando raízes de tabaco. Esta enzima se difundiu extracelularmente, e o acúmulo de fragmentos de pectina foi localizado nos espaços intercelulares, devido à ação enzimática do patógeno.

De acordo com WALTON (1994) as plantas podem apresentar inibidores de enzimas degradadoras de parede celular, os quais podem atuar como elicitores de mecanismos de defesa. É possível que este mecanismo esteja envolvido na interação *S. solani* e tomateiro resistente (c.v. Motelle).

Na cultivar resistente Motelle, a colonização intracelular foi observada em menor frequência que na cultivar suscetível Moneymaker; e, quando ocorreu, o número de células afetadas era reduzido, dando origem a lesões pequenas, as quais aparentemente não prejudicaram o desenvolvimento normal do hospedeiro. A restrição da colonização intracelular na cultivar resistente pode ser atribuída às papilas e, ou aposições na parede celular. Estas foram observadas nas células do mesófilo dessa cultivar e podem atuar fortalecendo a parede celular do hospedeiro por meio de barreira física que impede a entrada da hifa na célula vegetal. Existem numerosos relatos relacionando a presença de papilas com a resistência de plantas ao ataque de diversos patógenos (AIST, 1976; SHERWOOD e VANCE, 1980; KOGA *et al.*, 1990). Na citopatologia da interação *Colletotrichum trifolii* e *Medicago sativa*, a resposta do hospedeiro resistente à penetração do patógeno manifestou-se pela síntese de papilas que restringiram a colonização intracelular (MOULD e ROBB, 1992). SIRANIDOU *et al.* (2002) observaram, no desenvolvimento de *Fusarium culmorum* em diferentes cultivares de trigo, que a colonização na cultivar resistente foi

retardada pelas reações estruturais de defesa, tais como aposições depositadas na parede celular.

Apesar de não terem sido quantificadas as papilas surgidas nas células do mesofilo dos tomateiros resistente e suscetível durante a infecção, ficou claro que na cultivar resistente a frequência das papilas nesse tipo de células, foi maior do que na cv. suscetível. A deposição de papilas entre a parede celular e a membrana plasmática nas células do mesofilo, da cultivar Motelle, atuou impedindo a colonização intracelular e desta forma contribuindo significativamente para a manifestação da resistência.

As alterações de parede celular, eventualmente observadas no material suscetível, não restringiram a colonização intracelular neste hospedeiro. O mesmo foi observado por MIMS e VAILLANCOURT (2002) na interação *Colletotrichum graminicola* e cultivar suscetível de milho, onde as papilas foram produzidas nas células da epiderme e do mesófilo em resposta à tentativa de penetração pelo patógeno, no entanto estas não tiveram sucesso em prevenir a entrada das hifas nas células. De acordo com AIST (1983) as papilas nem sempre são efetivas em restringir a penetração do patógeno no hospedeiro. A frequência e a velocidade da formação das papilas são fatores que podem influenciar na retenção do patógeno. NICHOLSON e HAMMERSCHMIDT (1992) citam que se a papila é formada rapidamente e se esta se torna fortemente lignificada, pode prevenir a entrada do fungo no hospedeiro. MATSUOKA (1988) verificou que a resistência de pimentão a *Phytophthora capsici* se manifesta através da rápida formação de papilas, em resposta à penetração da hifa infectiva.

A deposição de material eletrodenso foi constatada ao redor das hifas intracelulares do fungo na colonização das cultivares resistente e suscetível. Não foi possível determinar a natureza deste material nas observações feitas no MET. Também OUELLETTE *et al.* (1999), que estudaram o acúmulo de material extracelular na parede celular de *Ophiostoma novo-ulmi* em diversos substratos e no hospedeiro *Ulmus glabra*, reportaram estruturas semelhantes a microfibrilas na parede celular do fungo colonizando as células do parênquima. Estudos

futuros podem elucidar a natureza e possível função destas deposições presentes ou junto da parede celular de *S. solani* infectando tomateiro.

As pequenas lesões necróticas presentes no material resistente levantaram a suspeita do envolvimento de reação de hipersensibilidade. Autofluorescência em tecidos infectados tem sido relatada, em alguns patossistemas (KOMBRINK e SCHMELZER, 2001; VLEESHOUWERS *et al.*, 2000; HEATH, 2000; HEATH, 1998), como indicativo *in situ* da reação de hipersensibilidade (HR). Lesões microscópicas encontradas nas amostras diafanizadas foram observadas em microscópio de fluorescência, no entanto, não foi detectada autofluorescência nas células da epiderme e, ou do mesofilo das áreas lesionadas no hospedeiro resistente e suscetível, o que seria um indicativo de reação de HR. Em nível ultraestrutural, em ambos os tomateiros, foram observadas alterações em organelas e no núcleo das células do mesofilo, que podem estar relacionadas com HR, como a condensação da cromatina, desorganização do citoplasma e degradação dos cloroplastos. POLVERARI *et al.* (2000) observaram que, durante a reação de HR induzida pela inoculação de isolado avirulento de *Xanthomonas campestris* p.v. *vesicatoria*, raça 2, em folhas de pimentão, as células do mesofilo apresentaram desorganização geral do citoplasma, degeneração de organelas, como cloroplastos, além de massas de material eletrondenso no núcleo, aparentemente formado pela agregação da cromatina. Estes resultados se assemelham aos aqui observados em tomateiro infectado por *S. solani*. No entanto, estas alterações celulares ocorreram de forma esporádica e em número restrito de células do mesofilo.

Sobre as respostas de plantas a fungos necrotróficos, MAYER *et al.* (2001) mencionam estudos recentes que mostram que, quando a HR ocorre nessas interações, o crescimento do fungo é acelerado em vez de restringido. Segundo estes autores, os patógenos necrotróficos precisam estar equipados com arsenal enzimático capaz de inativar os compostos tóxicos formados durante a HR.

Na interação *S. solani* e tomateiro, onde alterações celulares associadas com HR foram observadas de forma esporádica, tanto na cv. suscetível quanto na

cv.resistente, indicam que este mecanismo não contribui de forma significativa para a manifestação da resistência na cv. Motelle. No entanto, a colonização intracelular e o conseqüente desenvolvimento de sintomas típicos da doença foi restringido nesta variedade. Com base nos relatos de MAYER *et al.* (2001), é possível que este hospedeiro possua mecanismos bioquímicos de resistência capazes de inativar ou inibir a atividade enzimática do patógeno que, aliados aos mecanismos estruturais de resistência observados, como alterações parede celular e papilas, contribuam para a manifestação plena da resistência.

O envolvimento de H₂O₂ no fortalecimento da parede celular vegetal em resposta ao ataque de patógenos foi relatada em muitos trabalhos. HÜCKELHOVEN *et al.* (1999) estudaram a presença de H₂O₂ em plantas de *Hordeum vulgare* L. resistentes a *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. Detectaram H₂O₂ acumulado em papilas eficientes em conter o patógeno, ao passo que H₂O₂ não foi detectado em células onde as papilas se mostraram ineficazes, indicando que o H₂O₂ tem papel substancial na resistência, neste patossistema. CADENA-GOMEZ e NICHOLSON (1987) analisaram a atividade de peroxidases associadas com a formação de papilas na epiderme e no mesocótilo de milho inoculado com *Helminthosporium maydis* e *Colletotrichum graminicola*. Os resultados 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 H₂O₂ nessas respostas.

BESTWICK *et al.* (1997) utilizaram CeCl₃ para detectar peróxido de hidrogênio em células de alface infectadas com um isolado selvagem de *Pseudomonas syringae* p.v. *phaseolicola*, causador de HR, e também com o mutante Hrp⁻, que não causa HR. Papilas e alterações na parede celular surgiram em resposta ao isolado selvagem e ao mutante Hrp⁻; porém, H₂O₂ não estava relacionado com as alterações da parede celular nas plantas inoculadas com o mutante. Nas plantas inoculadas com o isolado selvagem, segundo os autores, o CeCl₃ reagiu com o excesso de H₂O₂ produzido durante a HR e não rapidamente metabolizado durante as reações de ligação (“cross-linking”) de compostos na parede celular do hospedeiro. Nas plantas inoculadas com o mutante, não houve

HR e não foi sintetizado H_2O_2 em excesso que pudesse reagir com o $CeCl_3$ e ser localizado.

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 variedades em estudo, e no controle negativo em que o $CeCl_3$ foi utilizado. H_2O_2 constitutivo nas células vegetais é 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. De acordo com BOLWELL e 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.

Como, no presente trabalho, não se encontrou qualquer reação diferencial entre as plantas resistente e a suscetível, quanto a presença de H_2O_2 , este composto não deve contribuir de forma significativa para a resistência contra *S. solani*, no que diz respeito ao fortalecimento da parede celular.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

A infecção de *Stemphylium solani* Weber em tomateiro resistente, c.v. Motelle, e suscetível, c.v. Moneymaker, foi estudado histologicamente, usando-se técnicas de microscopia de luz e de microscopia eletrônica. Os resultados revelaram que o processo de infecção ocorreu de forma semelhante nas duas variedades em estudo. Com cerca de 6 h.a.i, os conídios na superfície do hospedeiro haviam germinado, originando vários tubos germinativos, dos quais somente um, eventualmente dois, conseguiu penetrar no hospedeiro. A penetração ocorreu principalmente através da abertura estomática. Após a penetração, a hifa produziu uma vesícula subestomática, que se ramificou, originando as hifas secundárias que colonizaram os tecidos foliares hospedeiro.

Os eventos na pré-penetração e o início da colonização foram quantificados nas amostras diafanizadas, correspondentes a 6, 12, 24, 36 e 48 h.a.i, a fim de serem encontradas diferenças quanto à germinação, penetração, formação de vesícula subestomática nos tecidos das cultivares resistente e suscetível. Porém, nenhuma diferença significativa ficou revelada entre as duas cultivares quanto aos eventos avaliados (teste F, 5% de probabilidade), sugerindo que os mecanismos envolvidos na resistência se manifestam mais tarde, após a entrada do patógeno nos tecidos do hospedeiro.

Quanto à colonização, as hifas do fungo avançaram de forma inter e intracelular nos tecidos das duas cultivares. Contudo, o colapso dos tecidos na cv. suscetível foi evidenciado pela intensa colonização e degradação do conteúdo das células do mesofilo, de que resultaram os sintomas macroscópicos típicos da doença e, posteriormente, murcha e queda das folhas. A colonização intracelular só foi observada ocasionalmente na cv. resistente e, quando ocorreu, os danos causados foram qualitativamente semelhantes aos observados na cv. suscetível; no entanto, o número de células afetadas foi restrito, originando pequenas lesões macroscópicas, que não evoluíram e não afetaram o desenvolvimento normal do hospedeiro. Na cv. resistente, papilas surgidas nas células do mesofilo em contato com as hifas do patógeno restringiram a colonização intracelular, contribuindo significativamente para a resistência.

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi constatado na parede das células das duas cultivares em estudo, usando-se a técnica descrita por BESTWICK *et al.* (1997), na qual cloreto de cério ($CeCl_3$) reage com H_2O_2 , formando precipitado de peridróxido de cério, que é visível no MET. Dois tipos de controle negativo foram incluídos neste estudo, o primeiro consistindo de amostras, das duas cultivares, tratadas com $CeCl_3$ mas não inoculadas. O segundo, de amostras de ambas cultivares, não tratadas com $CeCl_3$, porém inoculadas. Não foi constatada reação diferencial, nas duas variedades, quanto à presença de H_2O_2 associado à parede celular indicando que ele não participa significativamente da resistência manifestada pela cv. Motelle.

Com base nos dados obtidos neste trabalho, conclui-se que a resistência de 'Motelle' contra *S. solani* é do tipo pós-penetração e está fortemente relacionada com as alterações de parede celular e as papilas surgidas nas células do mesofilo. No entanto, este mecanismo não é suficiente, isoladamente, para explicar a resistência encontrada, uma vez que a colonização intracelular também foi observada em alguns casos, porém esta de alguma forma foi restringida, resultando em lesões pequenas. É provável que mecanismos bioquímicos de resistência, tais como a síntese de fitoalexinas ou proteínas PR, também atuem em conjunto com as papilas. Estudos futuros poderão determinar se há

envolvimento de componentes bioquímicos na expressão da resistência observada na cv. Motelle. A HR, bem como a presença de peróxido de hidrogênio associado à parede da célula hospedeira, não contribuem efetivamente para que esta resistência seja exercida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIST, J.R. Papillae and related wound plugs of plant cells. **Annual Review of Phytopathology**, v.14, p. 145-163, 1976.
- AIST, J.R. Structural responses as resistance mechanisms. In: BAILEY, J. A., DEVERALL, B. J. (Eds). **The dynamics of host defense**. New York: Ac. Press, 1983, p. 33-69.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. e BLACKWELL, M. Introductory Mycology. 4º ed. John Wiley & Sons, Inc. 869p. 1996.
- ALLEN, E.A.; HAZEN, B. E.; HOCH, H.C.; KWON, Y.; LEINHOS, G.M.E.; STAPLES, R. C.; STUMPF, M. A. e TERHUNE, B.T. Appressorium formation in response to topographical signals by 27 rust species. **Phytopathology**, v. 81, p. 323-331, 1991.
- BENHAMOU, N. e CÔTÉ, F. Ultrastructure and cytochemistry of pectin and cellulose degradation in tobacco roots infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Phytopathology**, v. 82, p.468-478, 1992.
- BESTWICK, C.S.; BROWN, I.R.; BENNETT, M.H.R. e MANSFIELD, J.W. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* p.v. *phaseolicola*. **The Plant Cell**, v. 9, p. 209-221, 1997.
- BLANCARD, D. e LATERRROT, H. Les Stemphyliia rencontrés sur le tomate. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 25, p.140-144, 1986.

- BOLWELL, G.P. e WOJTASZEK, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence- a broad perspective. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.51, p.347-366, 1997.
- BORGES, O.L., STANFORD, E.H. e WEBSTER, R.K. The host-pathogen interaction of alfalfa and *Stemphylium botryosum*. **Phytopathology**, v.66, p.749-753, 1976.
- CADENA-GOMEZ. G. e NICHOLSON, R.L. Papillae formation and associated peroxidase activity: a non-specific response to attempted fungal penetration of maize. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.31, p. 51-67, 1987.
- COWLING, W.A.; GILCHRIST, D.G. e GRAHAM, J.H. Biotypes of *Stemphylium botryosum* on alfalfa in North America. **Phytopathology**, v.72, p. 679-684, 1982.
- CZANINSKI, Y.; SACHOT, R.M. e CATESSON, A.M. Cytochemical localization of hydrogen peroxide in lignifying cell walls. **Annals of Botany**, v.72, p.547-550. 1993.
- DEVERALL, B.J. Introduction. In: BAILEY, J.A. e MANSFIELD, J.W. (Ed) **Phytoalexins**. New York: Blackie, 1982. p. 1-20.
- DHINGRA, O.D. e SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC Press,1986. 355p.
- DIENER, V.L. Host-penetration and pathological histology in gray leaf spot of tomato. **Phytopathology**, v.45, p. 654-658, 1955.
- DRAKE, C.R. Host-parasite relations of *Stemphylium* leafspot and stem canker of birdsfoot trifol (*Lotus corniculatus*). **Phytopathology**, v.53, p.1094-1099, 1963.
- HALAIRE, 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. **MPMI**, v.14, p.1411-1419, 2001.
- HEATH, M.C. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p.117-124, 1998.
- HEATH, M.C. Hypersensitive response-related death. **Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 321-334, 2000.

- HELLER, A. e GIERTH, K. Cytological observations of the infection process by *Phomopsis helianthi* (Munt.-Cvet) in leaves of sunflower. **Phytopathology**, v.91, p.347-357, 2001.
- HENDRIX, J.W. e FRAZIER, W.A. **Studies on the inheritance of stemphylium resistance in tomatoes**. Honolulu: University of Hawaii, 1949. 24 p. (Technical Bulletin, 8).
- HOCH, H.C. e STAPLES, R.C. Signaling for infection structure formation in fungi. In: COLE, G. T. e HOCH, H.C. (Eds) **Fungal spore and disease initiation in plant and animals**. New York: Plenum Press, 1991, p. 25-46.
- HÜCKELHOVEN. R. e 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**, v.11, p. 292-300, 1998.
- HÜCKELHOVEN, R.; FODOR, J.; PREIS, C. e 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**, v.119, p.1252-1260, 1999.
- IWANO, M.; CHE, F.; GOTO, K.; TANAKA, N.; TAKAYAMA, S.; ISOGAI, A. Electron microscopic analysis of the H₂O₂ accumulation preceding hypersensitive cell death induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae* in cultured rice cells. **Molecular Plant Pathology**, v.3, p.1-8, 2002.
- KEEN, N. Mechanisms of pest resistance in plants. In: TRAYNOR, P.L. e WESTWOOD, J.H. (Ed). **Proceedings of a workshop on: Ecological effects of pest resistance genes in managed ecosystems**. 1999. p. 33-36.
- KEON, J. **Importance of cell-wall degradating enzymes in pathogen specificity and pathogenicity**. Institute of Arable Crops Research. Rothamsted:UK: IACR Report. 1989, p 89-91.
- KOGA, H.; BUSHNELL, W.R.; ZEYEN, R.J. Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. **Canadian Journal of Botany**, v. 68, p. 2344-2352, 1990.
- KOMBRINK, E.; SCHMELZER, E. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p. 69-78, 2001.

- KOZLOWSKA, M.; FRYDER, K. e WOLKO, B. Peroxidase involvement in the defense response of red raspberry to *Didymella applanata* (Niessl/Sacc). **Acta Physiologiae Plantarum**, v.23, p. 303-310, 2001.
- KUROSAWA, C. e MUSSI, L. Avaliação de resistência em cultivares e híbridos de tomateiro à mancha de estenfilio. **Summa Phytopatologica**, v.21, p.199-201, 1995.
- LAMB, C. e DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.251-275, 1997.
- LONGO, N.; NALDINI, B.; DROVANDI, F.; GONNELLI, T.; TANI, G. Penetration and early colonization in basidiospore-derived infection of *Melampsora pulcherrina* (Bib.) Maire on *Mercurialis annua* L. **Caryologia**, v.47, p.208-222, 1994.
- MATSUOKA, K. Uma variante de *Stemphylium solani*. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, v.2, p.181, 1968.
- MATSUOKA, K. **Aspectos ultra-estruturais na interação de *Phytophthora capsici* Leonian e *Capsicum annuum* L.** Viçosa, MG: UFV, 1988. 112p. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- MAYER, A.M.; STAPLES, R.C.; GIL-AD, N.L. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in host expressing the hypersensitive response. **Phytochemistry**, v.58, p.33-41, 2001.
- MIMS, C.W., VAILLANCOURT, L.J. Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*, and by a *C. graminicola* pathogenicity mutant. **Phytopathology**, v.92, p.803-812, 2002.
- MIZUBUTI, E.S.G., BROMMONSHENKEL, S.H. Doenças causadas por fungos em tomateiro. **Informe Agropecuário**, v.18, p.7-14, 1996.
- MORIN, L.; DERBY, J.L.; KOKKO, E.G. Infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* on malvaceae weeds. **Mycological Research**, v.100, p. 165-172, 1996.
- MOULD, M.J.R. e ROBB, J. The *Colletotrichum trifolii* – *Medicago sativa* interface, in culture: a cytological analysis. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.114-124, 1992.
- NELSON, R.R. Studies on *Stemphylium* leafspot of alfafa. **Phytopathology**, v.45, p. 352-356, 1955.

- NICHOLSON, R. L. e HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review Phytopathology**, v.30, p.369-389. 1992.
- OTTE, O. e BARZ, W. The elicitor induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. **Planta**, v.200, p. 238-246, 1996.
- OUELLETTE, G.B.; CHAMBERLAND, H.; GOULET, A.; LACHAPELLE, M. e LAFONTAINE, J.G. Fine structure of the extracellular sheath and cell walls in *Ophiostoma novo-ulmi* growing in various substrates. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, p.582-597, 1999.
- PASCHOLATI, S.F. e LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (Ed). **Manual de fitopatologia** vol. 1. 3º ed: São Paulo. Ed. Agronomica Ceres, 1995, p.417-453.
- POLVERARI, A.; BUONAURO, R.; GUIDERDONE, S.; PEZATTI, M. e MARTE, M. Ultrastructural observations and DNA degradation analysis of pepper leaves undergoing a hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* p.v. *vesicatoria*. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.423-431, 2000.
- 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**, v. 122, p. 1119-1127, 2000.
- SCANDALIOS, J.G. The rise of ROS. **Trends in Biochemical Sciences**, v.27, p.483-486, 2002.
- SHERWOOD, R.T. e VANCE, C. P, Resistance to fungal penetration in gramineae. **Phytopathology**, v.70, p. 273-279, 1980.
- SIRANIDOU, E.; KANG, Z. e BUCHENAUER, H. Studies on symptom development, phenolic compounds and morphological defense response in wheat cultivars differing in resistance to *Fusarium* head blight. **Phytopathology**, v.92, p.200-208, 2002.
- STAPLES, R.C.; MACKO, V.; WYNN, W.K. e HOCH, H.C. Terminology to describe the differentiation response by germilings of fungal spore. **Phytopathology**, v.73, p.380, 1983.

- SUHERI, H. e PRICE, T.V. Infection of onion leaves by *Alternaria porri* and *Stemphylium vesicarium* and disease development in controled enviroments. **Plant Pathology**, v. 49,p. 375-382, 2000.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y. e 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**, v.11, p. 1187-1194, 1997.
- VLEESHOUWERS, V.G.A.A.; Van DOOIGEWERT, W.; GOVERS, F.; KAMOUN, S.; COLON, L.T. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. **Planta**, v.210, p.853-864, 2000.
- WALTON, J..D. Deconstructing the cell wall. **Plant Physiology**, v.104, p.1113-1118, 1994.
- WYNN, W.K. Appressorium formation over stomatos by the bean rust fungus: response to a surface contact stimulus. **Phytopathology**, v. 66, p. 136-146, 1976.