

# INTERAÇÕES ENTRE *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* E GENÓTIPOS RESISTENTES OU SUSCETÍVEIS DE *Capsicum annuum* EM TECIDOS FOLIARES INOCULADOS

ANA CRISTINA PINTO JUHÁSZ<sup>1</sup>; ROSANA RODRIGUES<sup>2,3</sup>; FÁBIO LOPES OLIVARES<sup>2,4</sup>, JOÃO SEBASTIÃO DE PAULA ARAUJO<sup>5</sup>

1. Curso de Doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Cep. 36571-000. 2. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Av. Alberto Lamego, 2000, 28013-600 – Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. e-mail: anacpj@yahoo.com.br. 3. Lab. de Melhoramento Genético Vegetal/CCTA. 4. Lab. de Biologia Celular e Tecidual/CBB. 5. Universidade Federal Rural do Rio Janeiro, Instituto de Agronomia / Depto. de Fitotecnia. Br465, Km7, 23851-970, Seropédica-RJ.

## RESUMO

Foi realizado um estudo histológico sobre as interações *Capsicum annuum* - *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), comparando genótipos resistentes e suscetíveis. A bactéria foi inoculada mediante infiltração ou aspersão foliar, utilizando o isolado ENA 4135 em concentração de  $10^8$  ufc.ml<sup>-1</sup>. Amostras de folhas inoculadas foram coletadas após 21 dias, submetidas à desidratação em série alcoólica, fixadas em glutaraldeído, pós-fixadas em ósmio e, por fim, polimerizadas em resina acrílica LRWhite. Foram daí obtidos cortes semi-finos (0,8-1,0µm), corados com azul de toluidina para exame ao microscópio ótico, e cortes ultrafinos (70-80 nm) para exame ao microscópio eletrônico de transmissão. Amostras foliares adicionais, após seis dias da aspersão com a bactéria, foram preparadas da mesma forma, secas pelo método de “ponto crítico”, montadas em suporte de alumínio e metalizadas com ouro para observação ao microscópio eletrônico de varredura. Os exames revelaram que a intensidade de colonização por *Xav* nos espaços intercelulares variou de acordo com o genótipo inoculado, sendo significativamente maior no suscetível. Avaliações das imagens no microscópio eletrônico de varredura não relacionaram resistência e suscetibilidade às dimensões das aberturas estomatais.

**Palavras-chave:** mancha-bacteriana, mecanismos de resistência genética, ultra-estruturas.

## ABSTRACT

### INTERACTIONS BETWEEN *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* AND *Capsicum annuum* RESISTANT OR SUSCEPTIBLE GENOTYPES IN INOCULATED LEAF TISSUES

A histological study of *Capsicum annuum* - *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*) interactions was carried out comparing mesophyll colonization by bacteria in resistant and susceptible *Capsicum* genotypes. The bacterium was inoculated by means of leaf infiltration or spraying with isolate ENA 4135 of *Xav* using a suspension adjusted to c.a.  $10^8$  cfu.ml<sup>-1</sup>. Inoculated leaf samples were collected 21 days later, submitted to dehydration in alcoholic series, fixed in glutaraldehyde, post-fixed in osmium, and finally polymerized in LRWhite acrylic resin. Then, semi-fine cuts (0,8-1,0µm) were coloured with toluidin blue for examination in the light microscope and ultrafine cuts (70-80 nm) for the transmission electron microscope. Additional leaf samples, taken six days after spraying with the inoculum, were prepared in the same way, dried by the “critical point” method and coated with gold on aluminum supports and for visualization through scanning electron microscopy (SEM). The images disclosed that the intensity of *Xav* colonization of intercellular spaces varied according to the inoculated genotype, being significantly higher on the susceptible one. Evaluations by SEM did not correlated resistance and susceptibility to dimensions of the stomatal openings.

**Key words:** bacterial spot, genetic resistance, ultrastructures.

## INTRODUÇÃO

A mancha-bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*), é considerada uma das doenças mais disseminadas no Brasil, desde seu aparecimento na Região Nordeste em 1947 (Araujo *et al.*, 2004). Sua incidência sobre pimentão e tomateiro pode causar redução significativa da produtividade e da qualidade dos frutos, especialmente quando da prevalência de períodos chuvosos (Hibberd *et al.*, 1988). Sementes contaminadas representam a principal fonte de inóculo primário, que mesmo em baixo percentual de infecção, pode resultar em severas epidemias da doença principalmente sob condições de umidade elevada e temperaturas moderadas (Carmo *et al.*, 1996). Como a maioria das fitobacterioses, a mancha bacteriana do pimentão é de difícil controle, decorrente, dentre outros fatores, da ineficiência dos antibióticos, bem como da ocorrência de estirpes resistentes a produtos à base de cobre e da suscetibilidade das cultivares disponíveis no mercado (Aguiar *et al.*, 2000).

Assim, com relação ao melhoramento genético, pouco progresso tem sido feito no Brasil, embora, a cultivar híbrida Melody de pimentão seja citada como resistente a *Xav* (Lopes & Quezado-Soares, 1997). Ribeiro *et al.* (1981) detectaram resistência recessiva na variedade de pimenta Santaka (*C. annuum*) e disponibilizaram sementes genéticas das linhagens “RMB” (resistentes à mancha-bacteriana) procedentes de cruzamento com cultivares de pimentão. Ao que parece, no entanto, essas linhagens não chegaram a serem utilizadas em programas de melhoramento do pimentão no país.

A resistência de plantas a fitopatógenos pode ser decorrente da capacidade de retardar ou mesmo impedir a entrada ou a colonização de seus tecidos, de forma dinâmica e coordenada, dependendo de vários fatores. A resistência ocorre, desse modo, pela expressão de diferentes mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, em função do potencial genético da planta e que a resposta resistente varia com a interação patógeno-hospedeiro, sofrendo, regra geral, influência da idade da planta, do órgão ou tecido afetado, do estado nutricional e de condições ambientais (Pascholati & Leite, 1994). Nesse sentido, Stall (1993) verificou que altos níveis de nitrogênio diminuíram ou impediam a atividade de *X. vesicatoria* em tomateiro.

Uma das primeiras barreiras que os patógenos precisam transpor para infectar o hospedeiro é representada pela cutícula, que recobre as células epidérmicas. Tricomas e estômatos, dependendo do seu tamanho e formato, podem também dificultar o ingresso do patógeno, bem como a parede celular por sua composição pela presença de fibras e vasos condutores (Pascholati & Leite, 1994). Porém, muitos dos patógenos conseguem penetrar, por aberturas naturais. Alcançado o interior da planta, outros novos mecanismos de defesa passam a operar, com base em

agregação citoplasmática, formação de halos ou papilas e lignificação, geralmente envolvendo as células infectadas. Podem também ocorrer camadas de cortiça, zonas de abscisão e tiloses em tecidos distantes do sítio de infecção (Pascholati & Leite, 1994).

Em relação aos mecanismos estruturais de resistência, o tamanho da abertura, a frequência e a estrutura dos estômatos são importantes no controle à entrada do patógeno, conforme verificado por Ramos *et al.* (1992), em estudos sobre resistência do tomateiro à mancha bacteriana. Esses autores registraram que baixa frequência e menor abertura de estômatos constituem mecanismos morfológicos de defesa, induzindo menor número de lesões por área foliar.

Mew *et al.* (1984) estudaram a interação entre *Xanthomonas oryzae* (*Xor*) e arroz, por meio de microscopia eletrônica de varredura, verificando que as bactérias não estavam distribuídas uniformemente na superfície das folhas, concentrando-se na proximidade dos poros e ao redor dos tricomas; muitas bactérias entravam pelos hidatódios e se multiplicavam no sistema vascular na interação compatível entre a cultivar de arroz e a estirpe bacteriana. Em contrapartida, na interação incompatível, a população de *Xor* era sempre reduzida. Mew *et al.* (1984) reportaram, ainda, a ocorrência de células bacterianas envolvidas por abundante material fibrilar em folhas de cultivares resistentes de arroz infectadas com *Xor*. Em adição, Bashan *et al.* (1981), estudando a interação entre tomateiro e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), por meio de microscopia eletrônica de varredura, observaram micro-colônias do patógeno no estômato e na câmara sub-estomática, representando vias de entrada para a bactéria, assim como no espaço intercelular abaixo das células da epiderme; verificaram-se também, células bacterianas concentradas na base de tricomas quebrados, que acabam se constituindo em sítios alternativos de infecção.

Os estômatos, por ocorrerem em grande número, são tidos como as aberturas naturais mais importantes, para penetração de fitobactérias que incitam enfermidades de parte aérea. Assim, vários estudos usando microscopia ótica e eletrônica de varredura confirmaram o papel relevante dos estômatos como sítios de infecção. Como exemplos, podem ser relacionados *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (Miles *et al.*, 1977) e *P. syringae* pv. *avenae* (Matsuda & Sato, 1983). Próximas ou sobre os estômatos, essas bactérias podem multiplicar-se rapidamente, invadir a câmara sub-estomática e, em seguida, os espaços intercelulares do mesófilo. A câmara sub-estomática funcionaria como via de ingresso e saída para as bactérias, que delas emergem na forma de exsudatos de massa bacteriana, constituindo inóculo secundário para disseminação (Miles *et al.*, 1977).

O objetivo do presente trabalho foi de investigar, por meio de microscopias ótica e eletrônica, diferenças estruturais em genótipos de *Capsicum* resistentes e suscetíveis a *Xav* e sua possível contribuição na

expressão da resistência.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi conduzido um ensaio em casa-de-vegetação com os genótipos 'Apolo', BGH 1772, 'Apolo' x BGH 1772, 'Ikeda' e BGH 3071. A cultivar Ikeda, suscetível à mancha-bacteriana e o acesso resistente BGH 3071 foram utilizados para comparação com os genitores 'Apolo' e BGH 1772, por meio de investigações microscópicas.

A semeadura foi efetuada no mês de outubro de 2000 em bandejas de poliestireno expandido contendo substrato comercial. Por ocasião do surgimento do primeiro par de folhas definitivas, cada muda foi transplantada para vaso plástico de cinco litros abastecido com igual substrato. As plantas-teste foram então dispostas em delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por genótipo. No início de janeiro de 2001, procedeu-se à inoculação com *Xav* (isolado ENA 4135), a partir de uma suspensão obtida de cultura pura e contendo cerca de  $10^8$  ufc. ml<sup>-1</sup>. Amostras de tecidos destinadas a preparações para microscopia ótica (MO) e eletrônica de transmissão (MET), corresponderam a folhas inoculadas por infiltração com a suspensão bacteriana. Já, as amostras para exame em microscopia eletrônica de varredura (MEV), originaram-se de folhas cuja inoculação ocorreu mediante pulverização com a mesma suspensão.

As amostras foliares foram coletadas três semanas após infiltração para MO e MET e seis dias após a pulverização com o inóculo para MEV. Em todos os casos, coletou-se uma folha de cada repetição, tomando-se uma parte do limbo inoculado, com auxílio de uma lâmina de aço esterilizada, inserindo-se os cortes, em seguida, na solução fixadora para posterior processamento. Para fins de controle, foi adotado o mesmo procedimento, coletando-se amostras de folhas não inoculadas e de idade fisiológica equivalente, correspondendo a cada genótipo.

**Microscopia ótica (MO):** As amostras destinadas à MO foram imersas numa solução fixadora de glutaraldeído (2,5%) em tampão fosfato (100mM, pH 7,0) por 24h em temperatura ambiente. Após essa fixação primária, as amostras foram lavadas por três vezes em tampão fosfato para remoção do glutaraldeído residual e desidratadas em série etanólica crescente (15, 30, 50, 70, 90 e 100% de etanol em água, v/v), permanecendo por 15 min em cada concentração. Após desidratação, as amostras foram embebidas em soluções de resina acrílica "LR White-medium grade" (London Resin Co. UK) e álcool etílico. Subseqüentemente, as amostras foram cuidadosamente transferidas com pinça fina para cápsulas transparentes de gelatina contendo a mesma resina, para obtenção de cortes transversais, longitudinais e paradermicos, sendo postas a polimerizar em estufa a 60°C, por um período de 18h

(Olivares, 1997). As cápsulas polimerizadas foram então lapidadas para formato trapezoidal, com lâminas novas, sob a lupa do ultramicrotomo. A partir desses blocos, foram obtidas seções semi-finas (0,8 – 1,0 mm) utilizando-se microtomo Reichert Ultracut S (Leica) e facas de vidro preparadas no Reichert Knifemaker (Leica). Para observação ao MO (Axioplan-Zeiss), seções foram transferidas para lâminas de vidro contendo uma gota de água. Posteriormente, foram fixadas em placa metálica aquecida e imediatamente coradas com solução 0,1% de azul de toluidina.

**Microscopia eletrônica de transmissão (MET):** Foram obtidos cortes ultra-finos a partir das cápsulas preparadas para MO. Essas seções foram recolhidas em grades hexagonais de cobre de 200 ou 300 mesh, cobertas com filme de polivinil formol, (Formvar 15/95 - Shawinigan Resins Corp., Springfield, Massachusetts, USA) a 0,3% em cloróformio. Foram, em seguida, postas a secar sobre papel de filtro e posteriormente contrastadas em solução de acetato de uranila, por 10min, e citrato de chumbo (solução a 0,2% em NaOH), por 7 a 10min. Finalmente, foram secas em placas de Petri sobre papel de filtro por 1h e examinadas ao MET EM 900 (Zeiss).

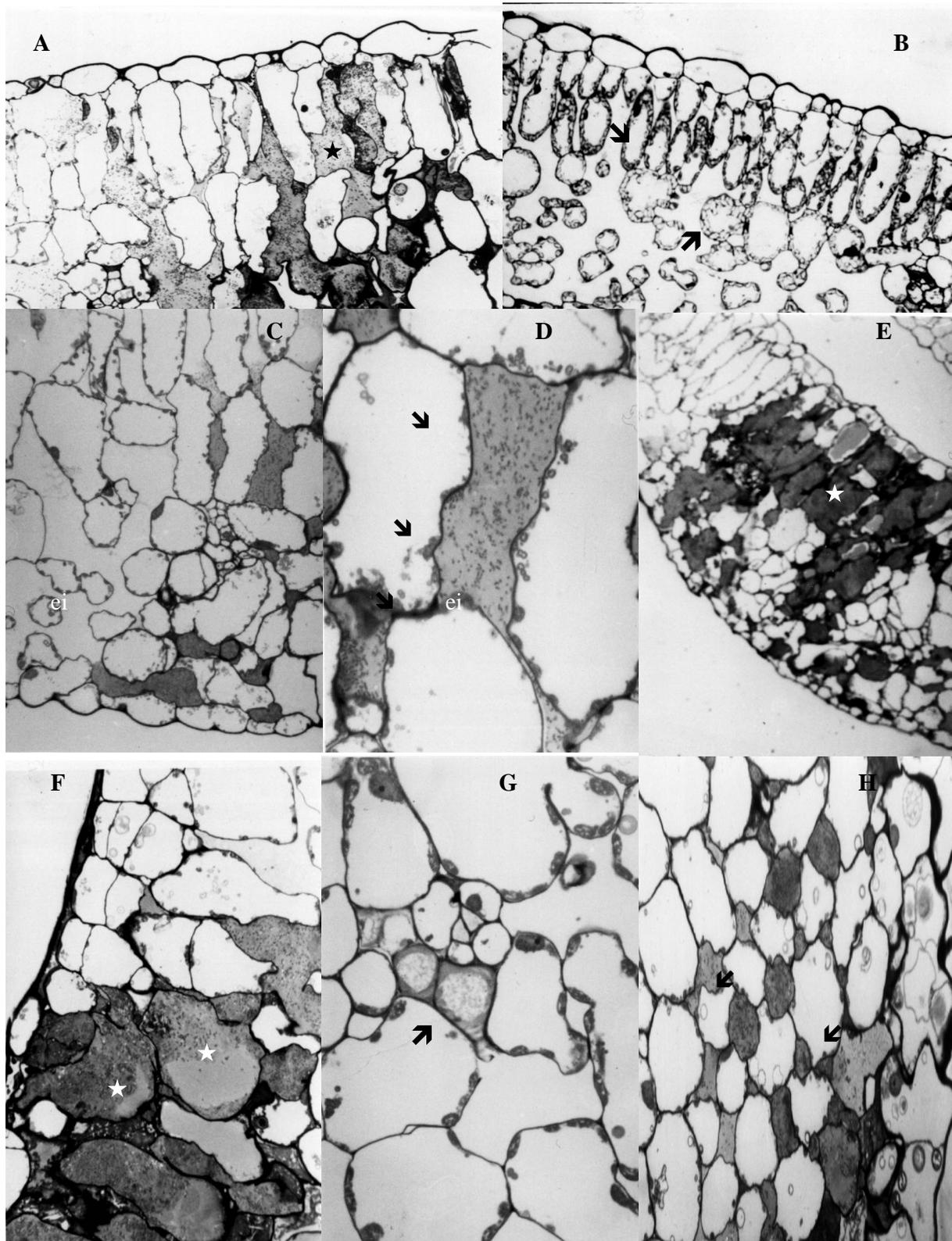
**Microscopia eletrônica de varredura (MEV):** As amostras para MEV foram inicialmente processadas de maneira idêntica àquelas direcionadas à MO. Foram então pós-fixadas por 30 min em solução aquosa de tetróxido de ósmio (1%), lavadas por três vezes em água destilada, com subseqüente desidratação em série acetônica. As seções obtidas foram armazenadas em freezer, completando-se a desidratação no equipamento Critical Point Dryer BAL-TEC, quando prestes a serem examinadas. Após a secagem final, as seções foram montadas em suportes metálicos e cobertas com película de ouro, visando a amplificar a condutividade eletrônica, utilizando o Sputter Coater SCD 050 (BAL-TEC). Aplicou-se uma corrente de 18mA e tempo de deposição de ouro de 240seg. Finalizado, as amostras foram observadas ao MEV DSM 962 (Zeiss), com voltagem de trabalho de 15 a 25 KV.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Microscopia ótica (MO)

O exame microscópico das seções transversais de folhas do cultivar Apolo (suscetível), inoculada com *Xav*, revelou que a bactéria colonizou intensamente os espaços intercelulares do mesófilo (Figura 1A).

Cortes do tecido foliar de 'Apolo', corados com azul de toluidina, revelaram, ainda, a presença de material denso, de origem e composição desconhecidas, associado às bactérias. Grimault *et al.* (1994), em estudos histológicos comparativos entre cultivares de tomateiro resistentes e suscetíveis a *Pst*, também observaram a presença de material similar, assumindo coloração azul escura.



(A). Espaços intercelulares do mesófilo do genótipo suscetível 'Apolo', intensamente colonizados por *Xav*. («). (400x); (B). Espaços intercelulares do mesófilo da cv. 'Apolo' sem inoculação bacteriana. Presença de inúmeros cloroplastos (setas). (20x); (C). Espaços intercelulares do mesófilo (ei) do genótipo resistente BGH 1772, com pouca colonização por *Xav*. (200x); (D). Espaços intercelulares (ei) expandidos pela colonização por *Xav* no genótipo resistente BGH 1772. Presença de corpos vesiculares (setas). (1260x); (E e F). Espaços intercelulares do mesófilo do híbrido 'Apolo' x BGH1772, intensamente colonizados por *Xav*. («). (200x e 630x, respectivamente); (G). Espaços intercelulares do mesófilo do genótipo resistente BGH 3071. Notar presença de bactérias apenas nos vasos do xilema (seta). (63x); (H). Espaços intercelulares do mesófilo da cultivar suscetível Ikeda, expandidos pela colonização por *Xav*, (setas). (63x).

**Figura 1-** Fotomicrografias óticas (FMO) de seção transversal do limbo foliar de genótipos de *Capsicum annuum* inoculados *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xav*).

Houve pronunciada degradação de cloroplastos, melhor visualizada quando em comparação com o material não inoculado (Figura 1B). Também houve degradação de paredes celulares no mesófilo provocando colapso do tecido. Esses resultados concordam com os relatos de Stall (1993), de que a infecção por *Xav* em pimentão causa desorganização celular, danificando cloroplastos e membranas mitocondriais. Em relação aos sintomas, a cv. Apolo apresentou média de 62 lesões/cm<sup>2</sup> de área foliar, circundadas de tecido clorótico.

O acesso BGH 1772 inoculado apresentou colonização bacteriana mais restrita nos espaços intercelulares do mesófilo (Figura 1C), à semelhança dos resultados de Bashan et al. (1981), que observaram menor população de bactérias em tecidos de cultivares resistentes do que em cultivares suscetíveis, no patossistema tomateiro-*Pst*. Em BGH 1772, houve menor degradação, estando às células do tecido foliar inoculado com aspecto aparentemente sadio. Foram observados, ainda, corpos vesiculares em células do mesófilo adjacentes aos espaços intercelulares, colonizado por células bacterianas (Figura 1D), sugerindo intensa atividade secretora pelo hospedeiro. Stall (1993) também detectou a formação de vesículas esféricas na interação *Xav-Capsicum annuum*. O genótipo BGH 1772 apresentou média de 48 lesões.cm<sup>-2</sup> de área foliar.

O híbrido 'Apolo' x BGH 1772, mostrou comportamento similar ao do genitor 'Apolo', ocorrendo, porém, maior densidade populacional de bactérias nos espaços intercelulares, o que corroborou a alta suscetibilidade que caracteriza esse genótipo (Figuras 1E e 1F). Nos tecidos inoculados da cv. Apolo também foi encontrado o material denso, de composição desconhecida associado às bactérias, nos cortes corados com azul de toluidina. Aparentemente, houve maior degradação celular no híbrido do que em ambos os progenitores. O híbrido 'Apolo' x BGH 1772 apresentou média de 75 lesões.cm<sup>-2</sup> de área foliar, envolvidas por tecido necrosado.

As observações comparativas entre genitores e seu respectivo híbrido indicaram clara correlação entre presença de sintomas macroscópicos e alterações histológicas nas folhas inoculadas com *Xav*. De fato, após a inoculação, observou-se modificações estruturais mais freqüentes e severas nos tecidos foliares do híbrido, de grau intermediário no genitor suscetível e menos intensa ainda no genitor resistente.

O acesso BGH 3071 não manifestou quaisquer sintomas externos após inoculação com *Xav*. Observações de cortes foliares semi-finos ao microscópio ótico, revelaram a presença de células da bactéria limitadas ao metaxilema (Figura 1G), apesar da ausência de degradação celular e de colonização do mesófilo, assim como Varvaro et al. (1993) constataram em cultivares resistentes de tomateiro, quando infectadas por *Pst*. Todos os tecidos de BGH 3071 mostraram-se íntegros, inclusive organelas celulares

como os cloroplastos. Em avaliações preliminares, o referido acesso demonstrou reação de hipersensibilidade ao ser inoculado com suspensão de aproximadamente 10<sup>8</sup> ufc.ml<sup>-1</sup> de *Xav* (Leal et al., 2001).

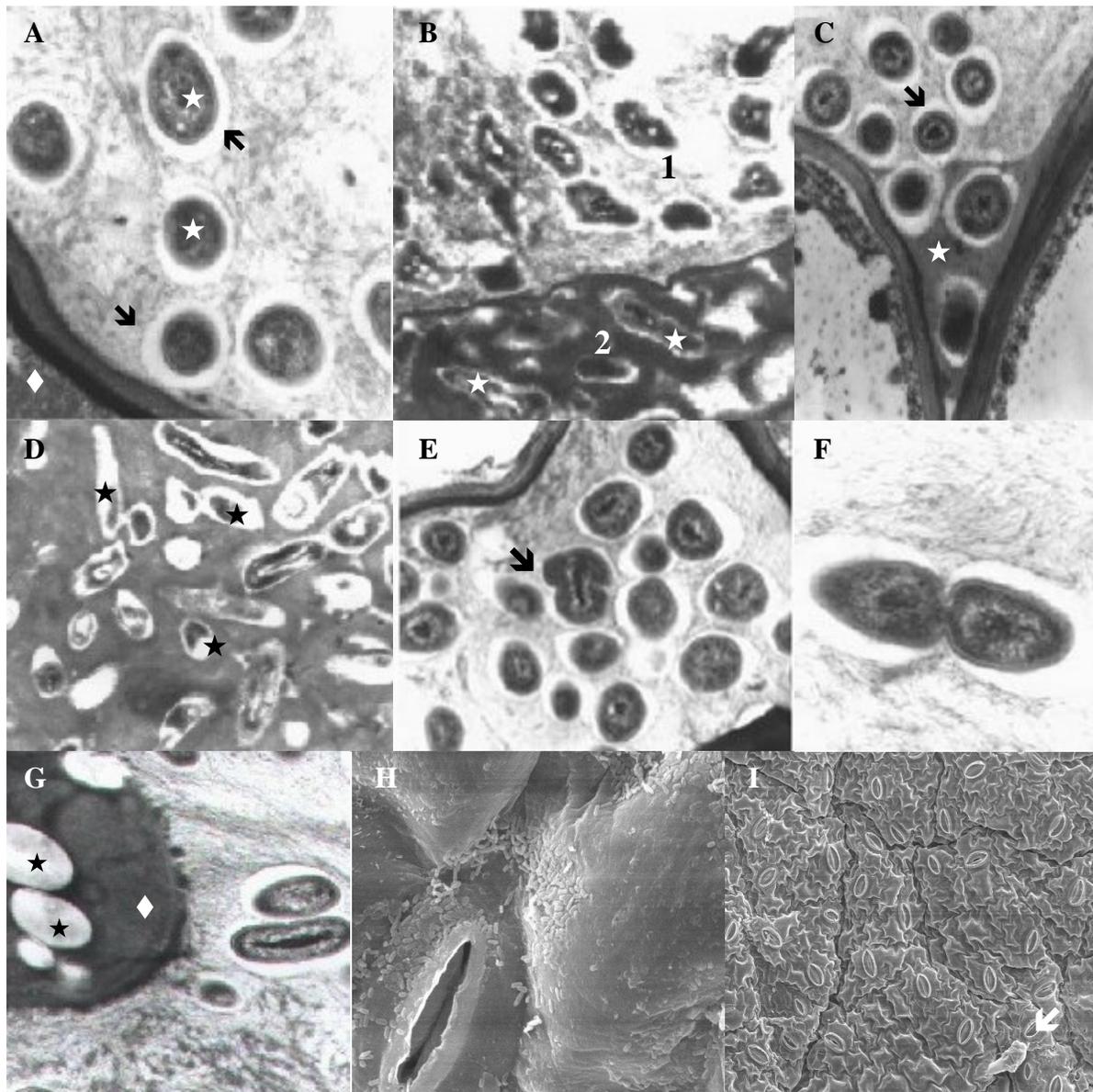
A cultivar Ikeda (padrão suscetível), expressou sintomas similares aos da cv. Apolo, acompanhados de intensa colonização dos espaços intercelulares do mesófilo, resultando na expansão destes espaços, e conseqüente compressão das células parenquimatosas (Figura 1D). Os cloroplastos, entretanto, foram menos danificados do que na cv. Apolo.

Através de microscopia eletrônica de transmissão, Varvaro et al. (1993) verificaram que cinco dias após a inoculação, as folhas de tomates suscetíveis a *Pst* estavam amplamente invadidas pela bactéria. No décimo dia, já ocorria desorganização citoplasmática, com ruptura da membrana celular, degeneração do núcleo e de cloroplastos; por fim, com 15 dias da inoculação, as células apresentavam-se completamente plasmolisadas não sendo detectadas alterações citológicas nos tecidos foliares da cultivar resistente incluída na investigação.

#### Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os estudos ao MET foram realizados apenas com amostras correspondentes aos genitores 'Apolo' e BGH 1772, além do respectivo híbrido. Em 'Apolo', observou-se intensa colonização nos espaços intercelulares do mesófilo, estando as bactérias envolvidas pela matriz eletrondensa, de origem e composição desconhecidas. Brown et al. (1993), também registraram a presença dessa matriz eletrondensa ao redor das células de *Xav*, em algumas regiões do mesófilo foliar de cultivar suscetível de pimentão inoculada. No presente estudo, verificou-se, ainda, degradação da parede celular e do citoplasma, bem como maceração de cloroplastos, similarmente às observações de Dai et al. (1996), em cotilédones de algodoeiro, suscetível a *X. axonopodis* pv. *malvacearum* (*Xam*).

Através da MET, foi possível visualizar um halo eletrtransparente ao redor das bactérias e material eletrondenso depositado próximo à parede celular nos tecidos de 'Apolo' (Figura 2A). Nesse genótipo, foi também observada a presença de material fibrilar de densidade diferenciada, envolvendo as células bacterianas (Figura 2B). Bactérias associadas a matriz mais eletrondensa mostravam morfologia alterada, sugerindo lise celular. Exames ultraestruturais de cotilédones de algodoeiro, infectados por *Xam* também revelaram material fibrilar ao redor de células bacterianas nos espaços intercelulares de tecidos necrosados (Dai et al., 1996). Anomalias idênticas foram assinaladas por Brown et al. (1993) nas interações entre pimentão e *Xav*, 2h após inoculação, assim como ocorreu interação incompatível entre tomateiro e *Pst* (Bashan et al., 1981).



A). FMT de espaços intercelulares do mesófilo da cultivar 'Apolo'. Notar a presença de halo eletrtransparente (seta) ao redor da bactéria e material eletrondenso depositado próximo à parede da célula do mesófilo (t). (30.000x); (B). FMT do mesófilo da cultivar 'Apolo', mostrando bactérias envolvidas por material fibrilar de densidade eletrondensa diferenciada (1 e 2). Notar que as bactérias associadas à matriz mais eletrondensa apresentam morfologia alterada, indicativa de lise celular do genótipo resistente (é). (20.000x); (C). FMT de espaços intercelulares do mesófilo do genótipo resistente BGH 1772, colonizados por bactérias (setas). Células do hospedeiro com deposição de material eletrondenso, circundando os sítios de colonização. Notar diferenciação do material eletrondenso na porção inferior, envolvendo células bacterianas (é). (20.000x); (D). FMT mostrando bactérias com alteração de morfologia (é), aparentemente lisadas e envolvidas por matriz eletrondensa. (20.000x); (E). FMT de espaços intercelulares do mesófilo do híbrido 'Apolo' x BGH 1772, com intensa colonização de bactérias. Notar atividade de divisão da bactéria (seta) e desfibrilação da parede celular. (20.000x); (F). Detalhe da fotomicrografia anterior: bactéria em plena atividade de divisão celular. (50.000x); (G). FMT mostrando bactéria colonizando células degeneradas do mesófilo do híbrido 'Apolo' x BGH 1772. Notar cloroplastos com perda de integridade do sistema de membranas dos tilacóides (t) e presença de amido em quantidade (é). (20.000x); (H). FMV de bactérias aderidas à superfície foliar do cv. 'Apolo', ao redor dos estômatos (5.000x); (I). Frequência de estômatos do limbo foliar do híbrido 'Apolo' x BGH 1772. Notar presença de tricoma (seta) (500x).

**Figura 2** - Fotomicrografias de transmissão (FMT) e de varredura (FMV) de seções transversais do limbo foliar de genótipos de *Capsicum annuum* inoculados com *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav).

Nos espaços intercelulares do mesófilo do genótipo resistente BGH 1772 também se observou colonização por bactérias envolvidas pela matriz eletrondensa. Células do hospedeiro continham deposição de material eletrondenso, circundando os sítios de colonização,

notando-se diferenciação desse material na porção inferior, envolvendo as células bacterianas (Figura 2C). Na Figura 2D, observam-se bactérias com morfologia alterada, aparentemente lisadas e envolvidas pela matriz eletrondensa. O confinamento do patógeno

nessa matriz talvez esteja relacionado a um mecanismo de resistência (Brown *et al.*, 1993).

O híbrido 'Apolo' x BGH 1772, apresentou colonização mais intensa do mesófilo, com alto grau de degradação de paredes celulares do hospedeiro, tal como observado ao microscópio ótico. Observou-se, também, intensa multiplicação de bactérias, com desfibrilação da parede celular (Figuras 2E e 2F). Nesse híbrido, ocorreu o maior nível de degradação dos cloroplastos, que exibiam perda de integridade do sistema de membranas dos tilacóides e abundância de grãos de amido (Figura 2G).

O genótipo resistente (BGH 1772) caracterizou-se por uma rápida resposta à inoculação induzindo o confinamento e lise das células bacterianas, acelerando a inativação do patógeno e assim retardando sua multiplicação e conseqüente invasão dos tecidos foliares.

#### Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na superfície das folhas inoculadas, foi observada uma distribuição desuniforme de células bacterianas, assim como Mew *et al.* (1984) verificaram na interação arroz-eiro-*Xor*, em que as bactérias concentravam-se próximas aos poros e aos tricomas.

O comprimento do ostíolo (CO) de 10 estômatos correspondentes a cada um dos genótipos analisados foi estimado com base nas imagens obtidas por MEV. Os estômatos de 'Apolo' e do híbrido 'Apolo' x BGH 1772 foram avaliados nas superfícies adaxial e abaxial. Verificou-se, pelo teste t, que não houve diferença significativa no CO entre estômatos das faces do limbo foliar da cv. Apolo. No híbrido, estômatos da face abaxial tinham maior CO do que os da face adaxial (Teste t, a 1% de probabilidade). Não houve diferença significativa com respeito ao CO dos estômatos da face adaxial entre os genótipos 'Apolo', BGH 3071 e 'Apolo' x BGH 1772. Contudo, quanto ao daqueles situados na face abaxial, a análise de variância indicou diferenças significativas (Teste F a 1% de probabilidade) entre 'Apolo', BGH 1772, 'Ikeda' e 'Apolo' x BGH 1772. A análise de médias utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade mostrou diferenças também significativas. O híbrido teve a maior média em relação ao CO, enquanto BGH 1772 foi intermediário, porém superior as duas cultivares suscetíveis (Tabela 1).

O CO, portanto, não deve estar relacionado a mecanismos estruturais de resistência a *Xav* em *C. annuum*, sendo necessário pesquisar outras formas de resistência.

Por outro lado, pela Figura 2H, é possível visualizar-se a intensa multiplicação bacteriana na superfície do limbo foliar do progenitor 'Apolo' após inoculação com *Xav*. Mesmo padrão foi também observado em amostras examinadas de outros cultivares. Dessa forma, as bactérias encontravam-se associadas aos estômatos, indicando que o patógeno realmente pode infectar a planta através dessas aberturas naturais (Lopes & Quezado-Soares, 1997; Pascholati & Leite, 1994; Stall,

1993). Adicionalmente, no híbrido 'Apolo' x BGH 1772, foi notada uma ocorrência rara de tricomas na superfície foliar (Figura 2I), reforçando a existência de outra(s) via(s) de infecção para a bactéria.

São vários os mecanismos de resistência capazes de restringir a invasão e a multiplicação de patógenos nas plantas hospedeiras. Até o presente momento, torna-se difícil consignar as diferentes barreiras porventura envolvidas na reação de resistência de *Capsicum* a *Xav*. Estudos subsequentes serão necessários para avaliação aprofundada dos acessos de BGH aqui descritos, buscando identificar mecanismos de distinta natureza que governam à bactéria incitante da mancha-bacteriana em pimentão.

**Tabela 1** – Análise de médias relativas a comprimento do ostíolo medido ao MEV, em estômatos da face abaxial do limbo foliar dos genótipos 'Apolo', BGH 1772, 'Ikeda' e híbrido 'Apolo' x BGH 1772 de *Capsicum annuum*.

Genótipo	Média
'Apolo' x BGH 1772	33,01 a
BGH 1772	19,26 b
'Apolo'	16,11 c
'Ikeda'	12,20 d
DMS = 5,18	

\* médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## CONCLUSÕES

Avaliações por MO de cortes semi-finos de folhas de *C. annuum* inoculadas com *Xav* permitiram estabelecer que a colonização bacteriana ocorre principalmente nos espaços intercelulares do mesófilo, estando o grau dessa colonização relacionado ao nível de suscetibilidade do genótipo ao agente da mancha-bacteriana.

Exames de cortes ultrafinos, por MO e MET, indicaram alterações estruturais similares, porém mais intensas no genótipo resistente do que no suscetível a *Xav*.

O comprimento do ostíolo, estimado por meio de MEV, não indicou relação entre essa característica morfológica e resistência à mancha-bacteriana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L. A.; KIMURA, O.; CASTILHO, A.M.; CASTILHO, K.S.C.; RIBEIRO, R.L.D.; AKIBA, F.; CARMO, M.G.F. Resistência ao cobre em isolados nacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* de pimentão e tomateiro. *Agronomia*. v. 34, n. 1/2, p. 78-82. 2000.
- ARAUJO, J. S. DE P.; ROBBS, CHARLES FREDERICK; RIBEIRO, R. L. D. Manejo Integrado de Fitobacterioses de Importância Econômica no Brasil. Parte 2. Revisão anual de patologia de plantas, Passo Fundo-RS, v. 12, p. 147-200, 2004.
- BASHAN, Y.; SHARON, E.; OKON, Y.; HENIS, Y. Scanning electron and light microscopy of infections and symptom development in tomato leaves infected with *Pseudomonas tomato*. *Physiological Plant Pathology*, v. 19, p. 139-144. 1981.
- BROWN, I.; MANSFIELD, J.; IRLAM, I.; CONRADSTRAUCH, J.; BONAS, U. Ultrastructure of interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* and pepper, including immunocytochemical localization of extracellular polysaccharides and the *AvrBs3* protein. *The American Phytopathological Society*, v. 6, n. 3, p. 376-386. 1993.
- CARMO, M. G. F.; KIMURA, O.; MAFFIA, L. A.; CARVALHO, A. O. Progresso da pústula bacteriana do pimentão, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, em condições de viveiro. *Fitopatologia Brasileira*. v. 21, n. 1, p. 62-70. 1996.
- DAI, G. H.; NICOLE, M.; ANDARY, C.; MARTINEZ, C.; BRESSON, E.; BOHER, B.; DANIEL, J. F.; GEIGER, J.P. Flavonoids accumulate in cell walls, middle lamellae and callose-rich papillae during an incompatible interaction between *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* and cotton. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. v. 49, p. 285-306. 1996.
- GRIMAUULT, V.; GÉLIE, B.; LEMATTRE, M.; PRIOR, P.; SCHMIT, J. Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas*. *Physiological and Plant Pathology*. v. 44, p. 105-123. 1994.
- HIBBERD, A. M.; STALL, R. E.; BASSET, M. J. Quantitatively assessed resistance to bacterial leaf spot in pepper that is simply inherited. *Phytopathology*. v. 78, p. 607-612. 1988.
- LEAL, F. C.; RODRIGUES, R.; DUTRA, G. A. P.; JUHÁSZ, A. C. P.; SUDRÉ, C. P.; RIVA, E. M.; GONÇALVES, I. A. Reação à mancha bacteriana em folhas de acessos de *Capsicum* spp. Resumos, VI Encontro de Inic. Científica e I Mostra de Pós-Graduação, Campos dos Goytacazes, RJ. 2001. p. 117.
- LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Doenças bacterianas das hortaliças. Brasília: DF. EMBRAPA. 1997.
- MATSUDA, I. ; SATO, Z. Bending symptoms of young rice seedlings grown in nursery flat caused by *Pseudomonas avenae*, the causal agent of bacterial stripe of rice. III. Mode of infection. *Bull. Nat. Inst. of Agric. Res. Service Center*. v. 38, p. 169-180. 1983.
- MEW, T. W.; MEW, I. C.; HUANG, J. S. Scanning electron microscopy of virulent and avirulent strains on *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* on rice leaves. *The American Phytopathological Society*, v. 74, n. 6, p. 635-641. 1984.
- MILES, W. G.; DAINES, R. H.; RUE, J. W. Presymptomatic egress of *Xanthomonas prunii* from infected peach leaves. *Phytopathology*, v. 67, p. 895-897. 1977.
- OLIVARES, F. L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. (Tese de Doutorado em Ciência do Solo), Seropédica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1997.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. *Rev. Anual de Patol. Plantas*, v. 2, p.1-49. 1994.
- RAMOS, L.J.; NARAYANAN, K.R. ; MCMILLAN, R.T. Association of stomatal frequency and morphology in Lycopersicon species with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Pathology*, v. 41, p. 157-164. 1992.
- RIBEIRO, R. L. D. Melhoramento do pimentão para resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro*. v. 5, n. 2, p.129-139. 1981.
- STALL, R. E. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. In: Chapman e Hall, *Xanthomonas*. Ed. J.G. Swings e E. L. Civerolo. (1993). pp. 167-184.
- VARVARO, L.; FANIGLIULO, R.; BABELEGOTO, N.M. Transmission electron microscopy of susceptible and resistant tomato leaves following infection with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal Phytopathology*, v. 138, p. 265-273. 1993.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.