**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Histologia da interação entre *Phytophthora capsici* e genótipos de
pimentão com diferentes níveis de resistência**

Thaís Regina Boufleur

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

**Piracicaba
2017**

Thaís Regina Boufleur
Técnicóloga em Biotecnologia

**Histologia da interação entre *Phytophthora capsici* e genótipos de
pimentão com diferentes níveis de resistência**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **NELSON SIDNEI MASSOLA JÚNIOR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração:
Fitopatologia

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Bouffleur, Thaís Regina

Histologia da interação entre *Phytophthora capsici* e genótipos de pimentão com diferentes níveis de resistência / Thaís Regina Bouffleur. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011.- - Piracicaba, 2017.

40 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Capsicum annuum* 2. Suberização 3. Requeima I. Título

À Deus
OFEREÇO

Aos meus pais, Bernardo e Dirce, e meu irmão Eduardo,
por todo amor, compreensão e cuidado

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/USP por ser berço de conhecimento e crescimento pessoal e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Professor Nelson S. Massola Jr. pela orientação, ensinamentos, ajuda, paciência, exemplo, confiança e amizade. Serei sempre grata por suas palavras de apoio, pela acolhida e boa convivência.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP pelos ensinamentos e boa convivência.

Aos colegas do Laboratório de Fungos Fitopatogênicos, Flávia Rogério, Máisa Ciampi, Renata Linhares e Vanessa Vargas, pelo companheirismo, ajuda e momentos de descontração compartilhados. De modo especial à Renata Brito e ao Ricardo Felipini, que me auxiliaram durante o desenvolvimento desse trabalho, obrigada pela ajuda, compreensão e amizade.

Aos colegas de pós-graduação pelo companheirismo, ensinamentos e boa convivência.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia ESALQ/USP, pela ajuda e boa convivência, em especial à Fabiana, Fernanda e Iraídes.

Ao técnico Renato pela ajuda e disponibilidade durante as análises ao microscópio de luz no NAP/MEPA/ESALQ-USP.

A Kátia R. Brunelli da SAKATA pela disponibilização de sementes de pimentão.

Aos amigos Julianne Sbeghen, Renata Brito, Renata Linhares, Ricardo Felipini e Vanessa Vargas, pelas conversas, momentos de descontração, apoio e amizade.

Aos Professores Roberto L. Portz e Vivian C. Missio por terem me despertado o amor pela fitopatologia e pela oportunidade de trabalhar e aprender essa ciência durante a graduação.

Aos meus pais Bernardo e Dirce, ao meu irmão Eduardo, aos meus padrinhos Laércio e Neiva, pela confiança, amor, apoio e presença diária apesar das barreiras impostas pela distância

Ao Eduardo Pereira, pelo amor, carinho, compreensão e companheirismo. Ao Renato e a Angela, pelo apoio e carinhosa acolhida.

Aos amigos do Paraná, Ana Nogueira, Lucimery Gibbert, Manoel Penachio, Renata Thomé e Tatiane Silva pelos encontros e conversas, que nos fizeram sempre estar juntos em coração.

Ao meu primo André Bouffleur, por me apoiar nessa jornada, sempre tendo uma palavra de conforto e otimismo.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho pois as conquistas nunca são individuais.

E finalmente agradeço a Deus, por me proporcionar uma família maravilhosa e amigos sinceros. Deus, que a mim atribuiu missões pelas quais já sabia que eu iria batalhar e vencer, agradecer é pouco. Por isso lutar, conquistar, vencer e até mesmo cair e perder, e o principal, viver, é meu modo de agradecer sempre.

MUITO OBRIGADA

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
2.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO INÓCULO.....	15
2.2 OBTENÇÃO DE PLANTAS DE PIMENTÃO.....	15
2.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	16
3. RESULTADOS.....	19
3.1 QUADRO SINTOMATOLÓGICO.....	19
3.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	20
3.2.1 <i>Colonização de P. capsici</i>	20
3.2.2 <i>Resposta celular</i>	26
4. DISCUSSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	37

RESUMO

Histologia da interação entre *Phytophthora capsici* e genótipos de pimentão com diferentes níveis de resistência

O uso de plantas resistentes no controle da requeima causada por *Phytophthora capsici* L. atende à crescente demanda de uma agricultura sustentável e a preocupação com a saúde humana e com o ambiente. Um isolado de *P. capsici* foi utilizado a fim de comparar a interação em nível histológico, com o auxílio de microscopia de luz, entre esse patógeno e quatro genótipos de *Capsicum annuum* com diferentes níveis de resistência, sendo dois resistentes (AF2169 e AF2191), um moderadamente resistente (AF6529) e um suscetível (AF1418) para a melhor compreensão da forma de colonização e dos mecanismos de resistência encontrados na planta. A microscopia de luz permitiu uma visão geral sobre o desenvolvimento do patógeno e as respostas do hospedeiro após a inoculação com *P. capsici*. Em conclusão, nota-se que AF1418 e AF6529, ao final de 72 HAI, comportaram-se de forma semelhante à inoculação, enquanto os genótipos AF2169 e AF2191 apresentaram diferenças tanto quanto a forma de crescimento do patógeno quanto a respostas de defesa desenvolvidas pela planta. Em ambos os genótipos resistentes não houve o desenvolvimento de haustórios ou vesículas de infecção, apesar de ter ocorrido a colonização intracelular em AF2169. Mesmo não havendo o desenvolvimento de sintomas nos genótipos resistentes, nos cortes histológicos observados, aparentemente, os mecanismos de defesa desenvolvidos pelo AF2191 foram mais eficientes, uma vez que a planta conseguiu impedir a colonização intracelular do patógeno. Experimentos posteriores devem ser realizados para quantificar suberina, espécies reativas de oxigênio e compostos fenólicos, a fim de validar os resultados observados em microscopia de luz com os testes histoquímicos, além de verificar o papel desses compostos na defesa dos genótipos analisados.

Palavras-chave: *Capsicum annuum*; Suberização; Requeima

ABSTRACT

Histology of the interaction between *Phytophthora capsici* and pepper genotypes with different levels of resistance

The use of resistant plants to control blight caused by *Phytophthora capsici* L. attend the growing demand for sustainable agriculture and concern for human health and the environment. A *Phytophthora capsici* isolate was used in order to compare the interaction at the histological level, with the aid of light microscopy, between this pathogen and four genotypes of *Capsicum annuum* with different levels of resistance, two resistant (AF2169 e AF2191), one moderately resistant (AF6529) and one susceptible (AF1418) for a better understanding of the mode of colonization and mechanisms of resistance found in the plant. Light microscopy allowed an overview of the development of the pathogen and host responses after inoculation with *P. capsici*. In conclusion, AF1418 and AF6529, at the end of 72 HAI, behaved similarly to inoculation. While the AF2169 and AF2191 genotypes showed differences as much as the form of growth of the pathogen as to defense responses developed by the plant. In both resistant genotypes there was no development of haustoria or infection vesicles, despite the occurrence of intracellular colonization in AF2169. Even without the development of symptoms in the resistant genotypes, in the observed histological sections, the defense mechanisms developed by AF2191 were apparently more efficient, since the plant was able to prevent the intracellular colonization of the pathogen. Subsequent experiments should be carried out to quantify suberin, reactive oxygen species and phenolic compounds in order to validate the results observed in light microscopy with the histochemical tests, as well as to verify the role of these compounds in the defense of the analyzed genotypes.

Keywords: *Capsicum annuum*; Suberization; Blight

1. INTRODUÇÃO

O pimentão (*Capsicum annuum* L.) é uma solanácea de grande importância econômica. É cultivado em diversos países, somando produção mundial de 31,1 milhões de toneladas (FAOSTAT 2013). No Brasil é considerado uma das dez olerícolas mais consumidas (Moura et al. 2012), com produção predominante e crescente nos estados de Minas Gerais e São Paulo, sendo esse o maior produtor (Blat e Costa 2007) com cerca de 82 mil toneladas produzidas em 2015 (IEA 2015). No entanto, esses rendimentos poderiam ser maiores caso a cultura não fosse afetada por diversos problemas fitossanitários.

A requeima do pimentão, causada por *Phytophthora capsici* Leonian, é uma das doenças mais severas que acomete a cultura (Lu et al. 2016). Esse patógeno está disseminado na maioria das áreas produtoras de solanáceas do mundo (Babadoost 2005), reproduzindo-se por meio de esporângios assexuais que liberam zoósporos móveis, sob condições de altas temperaturas em áreas com acúmulo de água (Erwin e Ribeiro 1996; Hausbeck e Lamour 2004). Além disso, se ambos os “mating-tipos” (A1 e A2) estiverem presentes no campo, podem ser formadas estruturas de resistência, os oósporos sexuais, que poderão sobreviver sob condições adversas por anos (Hausbeck e Lamour 2004)

P. capsici pode infectar plantas de pimentão em qualquer estágio de desenvolvimento. No campo, a doença aparece em forma de reboleiras e os sintomas são podridão do colo, do sistema radicular e murcha repentina (Santos e Goto 2004), e, em casos mais severos pode causar necrose de órgãos da parte aérea e levar a morte da planta (Martó, Viana e Parente 2007; Pavan et al. 2016), causando até 100% de perda da produção (Babadoost 2005).

Diversas medidas de controle vêm sendo empregadas no manejo dessa doença, dentre elas: o plantio em épocas ou locais desfavoráveis ao patógeno, utilização de mudas e sementes saudáveis, baixa densidade de plantio, rotação de culturas com gramíneas e controle (Martó, Viana e Parente 2007). Entretanto, por *P. capsici* ser habitante do solo e polífaga, acometendo cerca de 50 espécies de plantas de 15 famílias (Hausbeck e Lamour 2004; Babadoost 2005), essas medidas não têm a eficácia esperada (Santos e Goto 2004). Ainda, há relatos de resistência aos principais princípios ativos aplicados no controle químico (Parra e Ristaino 2001; Hausbeck e Lamour 2004; Babadoost 2005). Assim, é importante obter alternativas

de controle da requeima, como o uso de plantas resistentes, que atende à crescente demanda de uma agricultura sustentável e a preocupação com a saúde humana e com o ambiente.

Plantas possuem mecanismos de defesa pré- e pós-formados estruturais e/ou bioquímicos para resistirem ao ataque dos patógeno (Agrios 2005; Kunoh 2008; Pascholati 2011). Dessa forma, patógenos devem ultrapassar barreiras morfológicas e/ou vencer os metabólitos secundários produzidos pela planta para causar doença (Vandana, Suseela Bhai e Azeez 2014). Um estudo realizado por Portz et al, (2011) comprova que a colonização por *Phytophthora citricola*, observada por microscopia de luz, está intimamente ligada a severidade da doença e a alterações fisiológicas em plantas de *Fagus sylvatica* infectadas com esse patógeno. Assim, a histologia da interação patógeno-hospedeiro é de extrema importância para o entendimento das etapas de infecção e colonização pelo patógeno e dos mecanismos resistência da planta hospedeira. Além disso, estudar os mecanismos de resistência de genótipos resistentes torna-se uma ferramenta efetiva no auxílio do manejo da doença a longo prazo (Vandana, Suseela Bhai e Azeez 2014), abrindo portas para a investigação dos genes envolvidos nessa interação, possibilitando o uso desses em programas de melhoramento.

Trabalhos anteriores foram realizados a fim de se investigar aspectos histológicos na interação entre *P. capsici* e *C. annuum* em raiz e colo apenas de genótipos suscetíveis (Hwang, Kim e Kim 1989; Lee et al. 2000) e com plantas 10 dias após a germinação, de genótipos suscetíveis e resistentes (Kim e Kim 2009). Esses autores observaram que nas plantas suscetíveis não houveram mecanismos de resistência das plantas quando em contato com o patógeno. Na linhagem resistente de *C. annuum* (CM-334), foi observada limitação do crescimento de hifas nos tecidos da epiderme e parênquima cortical, atribuindo ao sistema de defesa da planta a formação de novas paredes celulares e engrossamento da lamela média abaixo da epiderme, bem como formação de aposições de parede celular (Kim e Kim 2009). Sabe-se que a ativação de mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos varia de acordo com a idade, local e/ou tecido da planta dentro de um mesmo patossistema (Satangarlin et al. 2011), mas não se tem estudos sobre as respostas de defesa de plantas de pimentão com diferentes níveis de resistência à *P. capsici* à época de transplante dessas para local definitivo de cultivo, que corresponde a mais ou menos 45 dias após a semeadura (Ribeiro 2010).

Assim, o objetivo desse estudo foi comparar a interação em nível histológico entre *P. capsici* e quatro genótipos com diferentes níveis de resistência, sendo dois resistentes (AF2169 e AF2191), um moderadamente resistente (AF6529) e um suscetível (AF1418), para a melhor compreensão dos mecanismos de resistência contra *P. capsici*. Especificamente, objetivou-se: i. Comparar o desenvolvimento de sintomas em plantas de pimentão ao longo do tempo e; ii. Comparar mudanças histológicas ocasionadas pela colonização por *P. capsici* nos diferentes genótipos em diferentes intervalos de tempo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e preparo do inóculo

O isolado de *P. capsici* usado neste estudo pertence à micoteca do laboratório de Fungos Fitopatogênicos do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba/SP. Foi obtido em 1988 de planta de abobrinha (*Cucurbita pepo*) pelo Dr. Nelson Sidnei Massola Jr. e preservado desde então pelo método de Castellani (1939), com reativação, inoculação em abobrinha e reisolamento realizados anualmente. Confirmou-se a identidade do isolado por meio de PCR utilizando-se dois pares de primers espécie-específicos para detecção desse fitopatógeno: CAPFW/CAPRV2 (5'TTTAGTTGGGGGTCTTGTACC3' e 5'TACGGTTCACCAGCCCATCA3') (Silvar et al. 2005) e PC-1/PC-2 (5'GTCTTGTACCCTATCATGGCG3' e 5'CGCCACAGCAGGAAAAGCATT3') (Zhang et al. 2006).

A multiplicação do inóculo foi feita em placas de Petri contendo meio de cultura V8 (100 mL de suco de vegetais V8, 1 g de CaCO₃, 15 g de ágar e 900 mL de água destilada) (Kim e Kim 2009), incubadas a 25 ± 1°C sob luz constante. Dez dias após, preparou-se uma suspensão de esporângios colocando-se água destilada esterilizada (ADE) nas placas com o patógeno crescido e raspando-as com um pincel de cerdas macias. A suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze e mantida por 30 min a 4°C, a fim de induzir a liberação dos zoósporos após a transferência da suspensão para temperatura ambiente (Hwang, Kim e Kim 1989). A concentração de zoósporos foi quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para 5x10⁴ zoósporos/mL.

2.2 Obtenção de plantas de pimentão

Os ensaios foram conduzidos utilizando-se quatro genótipos de *C. annuum* com graus distintos de resistência à *P. capsici*, sendo três de pimentão do tipo Lamuyo para mercado de fruto verde: suscetível (S) (AF1418), moderadamente resistente (MR) (AF6529) e resistente (R1) (AF2169); e um de pimenta para porta-enxerto resistente (R2) (AF2191). O cultivo foi feito por semeadura a 0,5 cm de

profundidade em tubetes de 50 mL contendo vermiculita esterilizada e, posteriormente, foram mantidos em casa de vegetação sob luz natural.

2.3 Análises histológicas

Plantas com 45 dias de cada genótipo foram cuidadosamente removidas dos tubetes, a fim de se evitar ferimentos. Em seguida, foram lavadas em água corrente, para retirar a vermiculita das raízes, e colocadas por três dias em tubos de 25 mL contendo ADE, para ambientação à nova condição. Após, cinco plantas de cada genótipo foram inoculadas imergindo as raízes em 5×10^4 zoósporos/mL e mantidas nessa suspensão a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 h. Plantas mantidas em ADE serviram como testemunha.

Dez fragmentos de cerca de 1 cm foram seccionados das raízes laterais da região que compreende coifa, zona de crescimento e zona pilífera em quatro intervalos de tempo 12; 24; 48 e 72 h após a inoculação (HAI) e armazenados em microtubos de 2 mL contendo 1 mL de fixador Karnovsky modificado (glutaraldeído 25%, paraformaldeído 10%, tampão cacodilato 0,2 M e CaCl_2 0,1 M) (Kraus e Arduin 1997). Posteriormente, os microtubos foram mantidos a 4°C por 24 h. Após esse período, os fragmentos foram lavados com tampão cacodilato 0,25 M por três vezes, em intervalos de 15 min e armazenados em microtubos de 2 mL contendo 0,5 mL do mesmo tampão.

As raízes fixadas foram desidratadas em série etanólica crescente, permanecendo 20 min em cada concentração, na sequência 50%, 70%, 90% e três vezes em 100%. As raízes desidratadas foram emblocadas em Kit de Resina “Leica Historesin 7022 31731”, seguindo as instruções do fabricante. Os blocos foram seccionados transversalmente e longitudinalmente em 5 μm em micrótomo rotativo Spencer® mod. 800, com navalha de 16 cm tipo C Leica®. Os cortes foram fixados em lâmina com o auxílio de chapa aquecedora e corados. Para a preparação das lâminas permanentes, utilizou-se o meio de montagem Permout® que foi sobreposto com lamínulas. Os corantes utilizados foram azul de toluidina, pH 5,2; cloreto férrico, para compostos fenólicos e Sudan IV, para evidenciar lipídios, como a suberina. O azul de toluidina é indicado para visualização de *P. capsici* e dos tecidos celulares. As paredes suberificadas ou lignificadas apresentam coloração azul esverdeada (Moraes, Moraes e Moreira 2002), compostos fenólicos aparecem

em forma de vesículas verde brilhantes no interior das células (Cahill 1989) e paredes celulósicas são coradas em tons de roxo. O reagente cloreto férrico, produz coloração negro-azulada ou verde escuro com compostos fenólicos (Zorzal 2009), e Sudan IV cora suberina em tons de amarelo-alaranjado ou vermelho (Rittinger 1986).

As imagens dos detalhes referentes ao desenvolvimento do patógeno nas raízes e respostas celulares da planta à colonização foram obtidas digitalmente com câmera modelo AxioCam MCR ZEISS® em microscópio de luz ZEISS Axioskop® e, posteriormente, processadas com o programa AxioVision Release 4.8.2.

3. RESULTADOS

3.1 Quadro sintomatológico

Durante as primeiras 24 horas após a inoculação (HAI) não foram observados sintomas em nenhum dos genótipos inoculados com *P. capsici*. O desenvolvimento da doença em S, aparentemente, foi semelhante ao observado em MR. Nesses genótipos, observaram-se sintomas típicos causados por *P. capsici* 48 HAI, quando as plantas inoculadas tiveram desfolha e escurecimento da raiz (Dados não mostrados). Após 72 HAI a severidade da doença aumentou, levando à murcha, necrose do sistema radicular e morte das plantas (Figura 1). Para R1, R2 e testemunhas não inoculadas não se observaram sintomas ou morte das plantas até o final do experimento (72 HAI) (Figura 1).

Figura 1: Sintomas em plantas de pimentão 72 HAI com *P. capsici*. Podridão de raiz e murcha nos genótipos suscetível (S) e moderadamente resistente (MR) inoculados (I). Genótipos resistentes (R1 e R2) não apresentaram sintomas quando comparados aos controles (C).

3.2 Análises histológicas

3.2.1 Colonização de *P. capsici*

Em R2, 12 HAI (Figura 5B) foram observados zoósporos encistados externamente a epiderme, e a tentativa de entrada de hifas pelas paredes anticlinais das células desse tecido. O desenvolvimento de *P. capsici* em S foi semelhante ao observado em MR. Nos tempos de 12 e 24 HAI não foi observado o crescimento de hifas no parênquima cortical (Figuras 2B-C e 3B-C). No tempo de 48 HAI,

observaram-se hifas crescendo nos espaços intercelulares do parênquima cortical, principalmente na região próxima ao cilindro vascular (Figuras 2D e 3D), coincidindo com o aparecimento dos primeiros sintomas em plantas. Com 72 HAI, essas já foram encontradas colonizando o parênquima cortical, a endoderme e o cilindro vascular, de forma inter- e intracelular com o auxílio de haustórios e vesículas de infecção, (Figuras 2E-F, 3E-F, 6A e 6B) e crescendo no interior dos vasos do floema, ao mesmo tempo, plantas de ambos os genótipos apresentavam sintomas de murcha e necrose do sistema radicular (Figura 1).

Nos genótipos resistentes, somente R1 teve colonização inter- e intracelular de células do parênquima cortical em 72 HAI (Figura 4F e 6C), no entanto, de forma menos frequente do que em S e MR, enquanto em R2 houve apenas crescimento do patógeno nos espaços intercelulares do parênquima cortical em 72 HAI (Figuras 5F e 6D). Em ambos os genótipos, não houve formação de haustórios, vesículas de infecção e colonização dos vasos do floema, além disso, ao final do experimento as plantas apresentavam aparência semelhante às testemunhas não inoculadas.

Figura 2: Cortes transversais de raízes suscetíveis de *C. annuum* corados com azul de toluidina. Testemunha mantida em água destilada esterilizada (ADE) (A); raízes inoculadas com *P. capsici* (B-F). Corte 12 horas após a inoculação (HAI) (B), tecidos celulares sem alterações visíveis; corte 24 HAI (C), setas indicam células com paredes celulares distorcidas, necrose celular (n); corte 48 HAI (D), hifas (h) crescendo nos espaços intercelulares do parênquima cortical (PC) e plasmólise celular (p) de todos os tecidos. Cortes 72 HAI (E; F), hifas (h) colonizando o parênquima cortical de forma intracelular, com a emissão de haustórios (ha) e vesículas infecciosas (v). Epiderme (EP); endoderme (EN); cilindro vascular (CV), suberina constituinte natural da raiz (S).

Figura 3: Cortes transversais de raízes moderadamente resistentes de *C. annuum* coradas com azul de toluidina. Testemunha mantida em água destilada esterilizada (A); raízes inoculadas com *P. capsici* (B-F). Corte 12 horas após a inoculação (HAI) (B), plasmólise (p) de algumas células do parênquima cortical (PC); corte 24 HAI (C), setas indicam a presença de paredes celulares recém formadas na camada de células abaixo da epiderme (EP); corte 48 HAI (D), hifas (h) crescendo nos espaços intercelulares do parênquima cortical (PC) e próximas a endoderme (EN), plasmólise celular (p) de todos os tecidos; cortes 72 HAI (E; F), hifas (h) colonizando os tecidos da raiz de forma inter- e intracelular, com a emissão de haustórios (ha) e plasmólise celular (p). Cilindro vascular (CV), suberina constituinte natural da raiz (S).

Figura 4: Cortes transversais de raízes resistentes (R1) de *C. annum* corados com azul de toluidina. Testemunha mantida em água destilada esterilizada (ADE) (A); raízes inoculadas com *P. capsici* (B-F). Corte 12 horas após a inoculação (HAI) (B), com nenhuma alteração celular visível; cortes 24 HAI (C; D), espessamento parietal (ep) de células de todos os tecidos da raiz presença de compostos fenólicos (f) em células do parênquima cortical (PC) e presença de hifas (h) no interior de células da epiderme (ep); corte 48 HAI (E), espessamento parietal (ep), não há presença de hifas; corte 72 HAI (F), plasmólise celular (p) presente em todos os tecidos da raiz, hifas (h) crescendo nos espaços intercelulares; setas desacompanhadas de letras indicam a deposição de suberina em células do parênquima cortical (PC) e endoderme (EM). Cilindro vascular (CV).

Figura 5: Cortes transversais de raízes resistentes (R2) de *C. annuum* corados com azul de toluidina. Testemunha mantida em água destilada esterilizada (ADE) (A); raízes inoculadas com *P. capsici* (B-F). Corte 12 horas após a inoculação (HAI) (B), presença de material não identificado (*) em torno da epiderme (EP) da raiz, zoósporos encistados (z); tentativa de entrada do patógeno pelas paredes anticlinais da exoderme (ex) impedida pela deposição de suberina (indicada por setas desacompanhadas de letras). Corte 24 HAI (C; D), plasmólise celular presente em todos os tecidos, note que não há presença de hifas (h), deposição de suberina em paredes celulares do parênquima cortical (PC), indicada por setas desacompanhadas de letras. Corte 48 HAI (E), deposição de suberina (s) em células do parênquima cortical (PC), detalhe (E1), não há presença de hifas. Corte 72 HAI, hifas (h) nos espaços intercelulares do parênquima cortical, note que não há colonização intracelular. Suberina (S) constituinte da raiz; endoderme (EN); floema (FL).

Figura 6: Cortes transversais de raízes inoculadas com *P. capsici* 72 horas após inoculação (HAI). (A) genótipo suscetível com crescimento de hifas (h) nos espaços intercelulares do parênquima cortical (PC) e colonização intracelular com emissão de haustórios (ha). (B) Genótipo MR com crescimento de hifas (h) nos espaços intercelulares e colonização intracelular do parênquima cortical (PC), presença de vesículas de infecção (v). (C) Genótipo R1 com crescimento de hifas (h) no espaços intercelulares e colonização intracelular, setas indicam paredes celulares suberizadas. (D) Genótipo R2, com crescimento de hifas (h) apenas nos espaços intercelulares do parênquima cortical (PC), presença de compostos fenólicos (f). Endoderme (EN), epiderme (EP) e cilindro vascular (CV).

3.2.2 Resposta celular

As figuras 2A, 3A, 4A e 5A mostram secções transversais de raízes dos genótipos S, MR, R1 e R2 mantidas em ADE 72 HAI, respectivamente. Células da epiderme, parênquima cortical, endoderme e cilindro vascular permaneceram sem alterações, enquanto células dos tecidos das raízes inoculadas tiveram diferentes respostas à inoculação com o patógeno.

No genótipo S houve distorção de paredes celulares, evidenciada pelos espaços intercelulares irregulares, observadas 24 HAI (Figura 2C), mesmo sem a

presença de hifas nos tecidos. Em MR, 24 HAI, foram encontradas paredes celulares recém formadas (Figura 3C). A plasmólise das células ocorreu em todos os genótipos. Em MR foi observada a partir de 12 HAI (Figura 3B), em R2 a partir de 24 HAI (Figuras 5C e 5F), em S a partir de 48 HAI (Figura 2D) e em R1, 72 HAI (Figura 4F).

Compostos fenólicos são caracterizados por apresentarem coloração verde brilhante quando corados com azul de toluidina, ou, negro-azulada a verde escuro quando corados com cloreto férrico (Figura 7). Nos genótipos S e MR, compostos fenólicos foram encontrados apenas no cilindro vascular e endoderme de plantas inoculadas e não inoculadas. Em R1 e R2 observou-se a presença desses por todos os tecidos da raiz, aparentemente, em maior quantidade em raízes inoculadas quando comparadas às não inoculadas.

A suberina, quando corada com azul de toluidina apresenta coloração azul esverdeada, e, quando corada com Sudan IV, amarelo-alaranjada (Figura 8). A deposição de suberina foi observada em células dos genótipos R1 e R2, após a inoculação. Em R2, 12 HAI foi encontrada nas paredes anticlinais da exoderme, aparentemente servindo como barreira estrutural à penetração do patógeno (Figura 5B). A partir de 24 HAI, essa alteração foi detectada em paredes de células do parênquima cortical de raízes inoculadas de R2 (Figuras 5D e 5E) e em células do parênquima cortical, endoderme e periciclo de R1 72 HAI (Figuras 4F e 8). Nos genótipos S e MR não ocorreu deposição de suberina.

Em R1, nos cortes de 24 e 48 HAI foi observado espessamento parietal em todas as células dos tecidos da raiz (Figura 4C e 4E). Não foram encontradas hifas colonizando as raízes de R1 quando esse tipo de resposta estava presente.

Figura 7: Compostos fenólicos presentes no cilindro vascular (CV) e parênquima cortical (PC) do genótipo R2. Corte transversal de raiz corado com cloreto férrico, para detecção de compostos fenólicos, caracterizados como vesículas negro-azuladas a verde escuras no interior das células. Corte transversal de raiz corado com azul de toluidina, apresentando compostos fenólicos, caracterizados como vesículas verde brilhantes (B).

Figura 8: Cortes transversais do genótipo R1 72 horas após a inoculação. (A) Suberização das paredes celulares de células do parênquima cortical (PC) indicada pela coloração amarelo-alaranjada (setas) quando coradas com Sudan IV; suberina (S) natural da planta presente na exoderme (EX) e nos vasos do xilema (X). Note que em (B) a suberização das paredes celulares de células do parênquima cortical (PC) é indicada pela coloração azul esverdeada (setas) quando coradas com azul de toluidina; suberina natural da planta presente na exoderme (ex) e nos vasos do xilema (X).

4. DISCUSSÃO

Levando em consideração o desenvolvimento dos sintomas em plantas, aparentemente, os genótipos S e MR se comportaram de maneira semelhante, diferindo dos genótipos R1 e R2. Os primeiros sintomas foram registrados em plantas de S e MR 48 HAI e coicindiram com o aparecimento de hifas nos espaços intercelulares do parênquima cortical nesses genótipos. Esses resultados são semelhantes aos relatados por Sarria et al. (2016) em dendezeiro inoculado com *P. palmivora*. Ao final de 72 HAI todas as plantas de S e MR inoculadas estavam mortas, enquanto plantas de R1 e R2 não apresentaram sintomas. Nas observações dos cortes histológicos por microscopia de luz, nota-se que o crescimento do patógeno ocorreu em todos os genótipos, no entanto, a velocidade e a forma de desenvolvimento de *P. capsici* no interior das raízes ocorreu de formas diferentes entre eles.

Vesículas de infecção, haustórios e crescimento de hifas de forma intracelular são estágios de desenvolvimento do patógeno em contato íntimo com o hospedeiro, determinantes da forma de infecção e colonização (Whisson et al. 2016). Quando *Phytophthora* spp. penetra na célula do hospedeiro ocorre a formação de uma vesícula de infecção (Whisson et al. 2016), dilatação da hifa de onde parte o tubo de penetração (Luz et al. 2008).

Os haustórios são estruturas especializadas de infecção e interação com células da planta hospedeira através do rompimento da parede celular, mantendo a membrana citoplasmática intacta, facilitando a troca de moléculas entre o patógeno e a planta, sem causar morte celular (Whisson et al. 2016). Jupe et al. (2013) afirmam que essas estruturas são essenciais para o estabelecimento de *P. capsici* e fazem parte da fase biotrófica do ciclo da doença, após a qual, ocorre a colonização e reprodução, dando início a novos ciclos, esses autores, comprovaram o estilo de vida biotrófico com a observação de haustórios através de microscopia confocal em folhas de tomate infectadas com *P. capsici* e transcriptoma. Whisson et al. (2016), observaram por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) que haustórios de *P. infestans* são projeções contínuas de hifas, não formando a estrutura chamada de “neck band”, comumente observada em haustórios de fungos. Diferentes autores registraram a formação de haustórios por *P. capsici* (Jones, Graham e Ward 1974; Hwang, Kim e Kim; 1989; Lee et al. 2000; Kim e Kim 2009;

Jupe et al. 2013), *P. infestans* (Jones, Graham e Ward 1975), *P. sojae* (Stössel, Lazarovits e Ward 1980; Enkerli, Mims e Hahn 1997), *P. palmivora* (Sarria et al. 2013) e *P. cambivora* (Casares, González e Tamés 1994).

No genótipo R2, 12 HAI, foram observados zoósporos encistados na superfície da epiderme das raízes, além da tentativa de penetração nessas pelas paredes anticlinais desse tecido. Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente em raízes de pimentão resistentes à *P. capsici*, onde aparentemente, os zoósporos encistados estavam sendo impedidos de germinar devido a uma grande quantidade de exsudatos radiculares presente (Kim e Kim 2009). No presente estudo, observa-se que há presença de algum tipo de material na superfície externa da raiz, no entanto, não se pode concluir a natureza desse.

Em S e MR, *P. capsici* avançou de forma semelhante, crescendo nos espaços intercelulares do parênquima cortical durante as primeiras 48 HAI, e após, no corte de 72 HAI, pode ser visualizada a colonização das células de forma intracelular, com a emissão de haustórios e vesículas de infecção, que deram origem a hifas ramificadas, além disso, houve colonização dos vasos do floema. As vesículas de infecção e haustórios dos genótipos S e MR, 72 HAI são semelhantes às observadas com o auxílio de microscopia de luz por Avrova et al. (2008) em folhas de batata inoculadas com *P. infestans*. Além desses, outros autores observaram haustórios de *Phytophthora* sp. com o auxílio de microscopia de luz anteriormente, Sarria et al. (2016), em folhas de dendezeiro inoculadas com *P. palmivora*, Guest (1986) em tecidos de tabaco inoculados com *P. nicotianae* var. *nicotianae*, Kim e Kim (2009) em raízes suscetíveis de pimentão inoculadas com *P. capsici* e Lee et al. (2000) em caules de pimentão inoculados com *P. capsici*. A formação de haustórios por *P. capsici* no interior de células do hospedeiro indica que ocorreu o estabelecimento de relações parasitárias estáveis (Kim e Kim 2009).

Em R1 e R2, o crescimento do patógeno foi observado apenas nos cortes de 72 HAI e ficou restrito a epiderme e parênquima cortical, não atingindo o cilindro vascular. Em R1 ocorreu a colonização intracelular, porém, em menor frequência do que em S e MR, e em R2, o patógeno ficou restrito aos espaços intercelulares. Resultados semelhantes foram observados por Kim e Kim (2009) e Lee et al. (2000), onde nas interações suscetíveis com *P. capsici* ocorreu colonização de todos os tecidos da raiz, de forma inter e intracelular, enquanto em interações que envolveram resistência, o crescimento de hifas ficou restrito a epiderme e

parênquima cortical, raramente atingindo o cilindro vascular. Em ambos os genótipos resistentes não houve a emissão de haustórios, mesmo após a colonização intracelular em R1. Enkerli et al. (1997) notaram que em interações incompatíveis de *P. sojae* e soja, a formação de haustórios não ocorria, ou então, ocorria raramente e de forma irregular, enquanto em interações compatíveis, a formação de haustórios era comum. Lee et al. (2000) observaram que em plantas de pimentão tratadas para a indução de resistência e inoculadas com um isolado virulento de *P. capsici* não ocorreu a formação de haustórios mesmo havendo crescimento intracelular.

O conceito de infecção, de acordo com Gäumann (1950) envolve as etapas de pré-penetração, penetração e estabelecimento de relações parasitárias estáveis. A relação parasitária estável entre *P. capsici* e seus hospedeiros é estabelecida após a entrada do patógeno nos tecidos, através do crescimento nos espaços intercelulares com a emissão de haustórios ou hifas no interior das células (Lee et al. 2000; Hausbeck e Lamour 2004; Kim e Kim 2009; Jupe et al. 2013). Nesse contexto, o não estabelecimento de relações parasitárias estáveis entre *P. capsici* em R2, indicado pela ausência de haustórios e crescimento intracelular leva a crer que os mecanismos de resistência observados nesse genótipo atuaram na defesa da planta de forma a limitar o crescimento do patógeno aos espaços intercelulares do parênquima cortical, evitando a retirada de nutrientes das células do hospedeiro. Além disso, nos genótipos resistentes, mesmo após o crescimento do patógeno nos espaços intercelulares (R1 e R2) e colonização intracelular (R2) não houve o registro de sintomas típicos da doença em plantas. Contrariamente, os resultados encontrados por Kim e Kim (2009), onde após a colonização intracelular, a linhagem resistente de *C. annuum* apresentou necrose das células e sintomas típicos da doença, de forma semelhante ao genótipo suscetível.

P. capsici é capaz de produzir uma série de efetores (Lamour et al. 2012) os quais podem ser expressos em diferentes fases do ciclo da doença (Feng et al. 2014). É possível que a desorganização dos tecidos observada em S, 24 HAI esteja relacionada a ação dos efetores de *P. capsici*, uma vez que não foram encontradas hifas próximas a esses tecidos, esse sintoma pode acarretar no desaparecimento das atividades de defesa mediadas pela parede celular. No presente estudo, em ambos os genótipos resistentes, não houve desorganização dos tecidos mesmo após a colonização intracelular em R1.

As membranas celulares plasmolisadas observadas em MR, S, R1 e R2 podem ser indicativo de ocorrência de reação de hipersensibilidade (RH) ou então, sintoma da planta devido ao ataque do patógeno. Égea et al. (1996) sugerem que a inibição do crescimento de *P. capsici*, quando há ocorrência de RH em *C. annuum* é controlada pelo acúmulo (local) da fitoalexina capsidiol em regiões necróticas. Dessa forma, se a plasmólise observada nos genótipos avaliados for relacionada a RH, indica que houve reconhecimento do patógeno e ativação dos mecanismos de defesa, no entanto, eficiente apenas no em R2, onde não ocorreu colonização intracelular. É possível que o acúmulo de capsidiol nesses genótipos tenha ocorrido em regiões desfavoráveis ao sucesso desse mecanismo de defesa. Portz et al. (2011) observaram plasmólise em células do parênquima cortical de raízes de *Fagus sylvatica* inoculadas com *P. citricola*, atribuindo essa alteração celular a um sintoma causado pelo patógeno. Testes bioquímicos e histoquímicos complementares devem ser realizados a fim de elucidar a natureza da plasmólise observada no presente estudo.

Dentro do contexto da fisiologia do parasitismo, a resistência pode ser definida como “capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos” (Pascholati 2011). É expressa através de uma sequência de eventos lógicos, após o reconhecimento do patógeno pela planta, e composta de diversos mecanismos (estruturais e/ou bioquímicos) pré- (passivos) ou pós-formados (ativos) (Pascholati 2011). Foram observados diferentes mecanismos de defesa nos genótipos avaliados, dentre eles presença de compostos fenólicos, suberização, espessamento parietal e paredes celulares recém formadas.

A presença de compostos fenólicos é indicada por vesículas verde brilhantes no citoplasma quando corados com azul de toluidina (Cahill 1989), confirmadas pelo uso de cloreto férrico como corante específico para fenóis. Aparentemente, apesar dos compostos fenólicos terem sido encontrados em plantas não inoculadas de R1 e R2, esses estavam presentes em maior quantidade após a inoculação nesses genótipos. No entanto, não há como afirmar se são pré- ou pós-formados e dessa forma, seu papel na defesa da planta, uma vez que não foram realizados testes complementares de quantificação de fenóis.

Além de sua presença natural em tecidos específicos da planta, como xilema e exoderme, a suberina, normalmente é sintetizada em resposta a ferimentos ou

estresse (Pollard et al. 2008), como por exemplo, o ataque de patógenos. Todos os genótipos avaliados apresentam suberina em locais similares, como nos feixes do xilema e exoderme. A suberização, observada em R1 e R2, após a inoculação, pode atuar de duas formas: como barreira estrutural de defesa, ou ainda, por meio de toxicidade ao patógeno e inibindo o desenvolvimento desse no interior do tecido (Thomas et al. 2007). Esse mecanismo de defesa foi observado anteriormente por Thomas et al. (2007) em células do parênquima cortical de raízes de soja após a inoculação com *P. sojae*. Em R2, não foram observadas hifas próximas aos pontos de suberização do parênquima cortical. Essa reação, pode ser atribuída ao fato de a biossíntese de suberina ser ativada pela via do ácido salicílico, tendo caráter sistêmico. No entanto, a forma pela qual esse mecanismo atua na defesa do hospedeiro em R2 após 24 HAI não está clara. Por outro lado, em R1 hifas nos espaços intercelulares de células com paredes suberizadas não foram capazes de colonizar essas de forma intracelular. Dessa forma, é possível que a deposição de suberina nas células do parênquima cortical observada em R1 72 HAI esteja relacionada à formação de camadas de cortiça. Esse mecanismo de defesa é ativado após o estabelecimento de relações parasitárias estáveis pelo patógeno (Stangarlin et al. 2011), o qual ocorreu em R1. Nesse contexto, a planta forma uma camada de cortiça em torno do patógeno, modificando o metabolismo de células sadias para produzir uma grande quantidade de suberina, a qual, paralisa a atividade biológica do patógeno, limitando seu avanço e interrompendo o fluxo de toxinas e enzimas desse para os tecidos da planta e o fluxo de nutrientes em direção ao patógeno (Pascholati 2011, Stangarlin et al. 2011).

Apesar de não ser registrada a suberização até 72 HAI em R1, outro mecanismo de defesa foi ativado durante as primeiras 24 HAI nesse genótipo: o espessamento parietal de células de todos os tecidos. Observou-se que não houve crescimento de hifas associado a essa alteração, indicando que a mesma é ativada de forma sistêmica. Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente em patossistemas envolvendo *Phytophthora* sp. e raízes de abacate (Phillips, Grant e Weste 1987), cedro (Oh e Hansen 2007), pimenta malagueta (Kim e Kim 2009) e em suspensão de células de *C. annuum* (Egea et al. 2001). Lee et al., (2000) observaram que caules de plantas suscetíveis de *C. annuum* tratadas com ácido β -amino-*n*-butírico para a indução de resistência, inoculados com *P. capsici* apresentavam espessamento parietal, ao contrário de plantas não tratadas. Tais

estudos sugerem que o espessamento parietal está relacionado com resposta de defesa da planta, podendo ser associado a limitação de colonização pelo patógeno nesses genótipos, servindo como barreira estrutural contra a penetração por força mecânica e a degradação por enzimas.

As paredes celulares recém formadas encontradas abaixo da epiderme após a inoculação com *P. capsici* em MR são semelhantes àquelas encontradas na linhagem resistente de pimenta malagueta (CM334) por Kim e Kim (2009). É possível que essas paredes atuem como barreira estrutural a infecção pelo patógeno.

Nos últimos anos, foi constatada uma série de novos hospedeiros de *P. capsici* de importância econômica entre solanáceas e cucurbitáceas (Babadoost, 2005; Lamour et al., 2012), no entanto, apenas plantas de *C. annuum* possuem cultivares comerciais resistentes a doença. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos de infecção e colonização pelo patógeno e resistência do hospedeiro em genótipos disponíveis é essencial. O presente estudo mostrou que claramente há diferenças entre os genótipos S e MR e R1 e R2 na interação com *P. capsici*. Essas diferenças podem estar fortemente correlacionadas com os diferentes mecanismos de defesa observados em R1 e R2, além da ausência de colonização do cilindro vascular nesses genótipos.

A microscopia de luz permitiu uma visão geral sobre o desenvolvimento do patógeno e as respostas do hospedeiro após a inoculação com *P. capsici*. Em conclusão, nota-se que S e MR, ao final de 72 HAI, comportaram-se de forma semelhante à inoculação, enquanto os genótipos R1 e R2 apresentaram diferenças tanto quanto a forma de crescimento do patógeno e quanto às respostas de defesa da planta. Em ambos os genótipos resistentes não houve o desenvolvimento de haustórios ou vesículas de infecção, apesar de ter ocorrido a colonização intracelular em R1. Mesmo não havendo o desenvolvimento de sintomas nos genótipos resistentes, nos cortes histológicos observados, aparentemente os mecanismos de defesa desenvolvidos por R2 foram mais eficientes, uma vez que a planta conseguiu impedir a colonização intracelular do patógeno. Experimentos posteriores devem ser realizados para quantificar suberina, espécies reativas de oxigênio e compostos fenólicos, a fim de validar os resultados observados em microscopia de luz com os testes histoquímicos, além de verificar o papel desses compostos na defesa dos genótipos analisados.

REFERÊNCIAS

- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5^o. ed. G. N. Agrios. Elsevier Academic Press.
- Avrova, A. O., Boevink, P. C., Young, V., Grenville-Briggs, L. J., West, P. V., Birch, P. R. J., e Whisson, S. C. 2008. A novel *Phytophthora infestans* haustorium-specific membrane protein is required for infection of potato. *Cellular Microbiology*. 10:2271-2284.
- Babadoost, M. 2005. Phytophthora blight of cucurbits. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2005-0429-01
- Blat, C., e Costa, S. F. 2007. A Cultura do Pimentão. Piracicaba - SP: USP/ESALQ. 34 p.
- Casares, A., González, A., and Tamés, R. S. 1994. Ultrastructure of calli from resistant and susceptible chestnut inoculated with *Phytophthora cambivora*. *Journal Phytopathology*. 142:19–26.
- Cahill, D. 1989. Cellular and histological changes induced by *Phytophthora cinnamomi* in a group of plant species ranging from fully susceptible to fully resistant. *Phytopathology*. 79:417–424 Available at: http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1989Abstracts/Phyto79_417.htm.
- Castellani, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.*, 42, 225.
- Egea, C., Ahmed, A. S., Candela, M., e Candela, M. E. 2001. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol*. 158:151–158.
- Egea, C., García Pérez, M. D., e Candela, M. E. 1996. Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol*. 149:762–764.
- Enkerli, K., Mims, C., e Hahn, M. 1997. Ultrastructure of compatible and incompatible interactions of soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. *Canadian Journal of Botany*. 75:1493–1508 Disponível em: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b97-864>.
- Erwin, D. C., e Ribeiro, O. K. 1996. *Phytophthora capsici*. In *Phytophthora Diseases Worldwide*, St. Paul, Minnesota, USA: APS PRESS, p. 262–269.
- FAOSTAT: Food and Agriculture Organization of the United Nations 2013. Disponível em < <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em 25 de novembro de 2016.

Feng, B. Z., Zhu, X. P., Fu, L., Lv, R. F., Storey, D., Tooley, P., et al. 2014. Characterization of necrosis-inducing NLP proteins in *Phytophthora capsici*. BMC Plant Biol. 14:126 Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84900825435&partnerID=40&md5=2da0f93d66289ffc010593746d88bf57>.

Gaumann, E. 1950. Principles of Plant Infection. London: Crosby Lockwood & Son.

Guest, D. I. 1986. Evidence from light microscopy of living tissues that Fosetil-Al modifies the defence response in tobacco seedlings following inoculation by *Phytophthora nicotianae* var *nicotianae*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 29:251-261.

Hausbeck, M. K., e Lamour, K. H. 2004. Research progress and management challenges *Phytophthora capsici* on vegetable crops : Plant Dis. 88:1292–1303.

Hwang, B. K., Kim, W. B., e Kim, W. K. 1989. Ultrastructure at the host-parasite interface of *Phytophthora capsici* in roots and stems of *Capsicum annuum*. J. Phytopathol. 127:305–315.

IEA: Instituto de Economia Paulista 2015. Disponível em < http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/subjetiva.aspx?cod_sis=1&idioma=1>. Acesso em: 16 de maio de 2016.7

Jones, D. R., Graham, W. G., e Ward, E. W. B. 1974. Ultrastructural changes in pepper cells in a compatible interaction with *Phytophthora capsici*. Phytopathology. 64:1084–1090.

Jones, D. R., Graham, W. G., e Ward, E. W. B. 1975. Ultrastructural changes in pepper cells in an incompatible interaction with *Phytophthora infestans*. Phytopathology. 65:1274–1285.

Jupe, J., Stam, R., Howden, A. J. M., Morris, J. a, Zhang, R., Hedley, P. E., et al. 2013. *Phytophthora capsici*-tomato interaction features dramatic shifts in gene expression associated with a hemibiotrophic lifestyle. Genome Biol. 14:1–18 Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4054836&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Kim, S. G., e Kim, Y. H. 2009. Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. Plant Pathol. J. 252:113–120.

Kraus, J. E.; Arduin, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Universidade Rural,1997. 198p.

Kunoh, H. 2008. Aspectos celulares das interações planta-patógeno. In: *Interação Planta-Patógeno Fisiologia, bioquímica e biologia molecular*, eds. Sergio Florentino; Paschoalati, Breno; Leite, José Renato; Stangarlin, e Patrícia Cia. Piracicaba, SP: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ, p. 153–176.

Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., e Huitema, E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. Mol. Plant Pathol. 13:329–337.

- Lee, Y. K., Hong, J. K., Hippe-Sanwald, S., e Hwang, B. K. 2000. Histological and ultrastructural comparisons of compatible , incompatible and DL - b -amino- n -butyric acid-induced resistance responses of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57:269–280.
- Lu, J., Guo, M., Zhai, Y., Gong, Z., e Lu, M. 2016. Differential responses to the combined stress of heat and *Phytophthora capsici* infection between resistant and susceptible germplasms of pepper (*Capsicum annuum* L.). *J. Plant Growth Regul.*
- Luz, E. D. M. N., Silva, S. D. V. M., Bezerra, J. L., Souza, J. T., e Santos, A. F. 2008. Glossário ilustrado de *Phytophthora*: Técnicas especiais para o estudo de oomicetos. Itabuna, BA: FABESP. 204 p.
- Marto, F., Viana, P., e Parente, G. B. 2007. Controle das principais doenças do pimentão cultivado nas regiões serranas do estado do Ceará.
- Moraes, L. A. C., Moraes, V. H. D. F., e Moreira, A. 2002. Relação entre a flexibilidade do caule de seringueira e a carência de boro. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 37:1431–1436.
- Moura, M. F., Marubayashi, J. M., Mituti, T., Gioria, R. Kobori, R. F., Pavan, M. A., e Krause-Sakate, R. 2012. Análise comparativa da região codificadora para proteína capsidial de isolados de PepYMV e PVY coletados em pimentão. *Summa Phytopathologica.* 38:93-96
- Oh, E., e Hansen, E. M. 2007. Histopathology of infection and colonization of susceptible and resistant Port-Orford-Cedar by *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology.* 97:684–693.
- Parra, G., e Ristaino, J. B. 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight of bell pepper. *Plant Dis.* 85:1069–1075.
- Pascholati, S. F. 2011. Fisiologia do parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*, eds. L. Amorim, J. A. M. Rezende, e A. Bergamin Filho. Piracicaba, SP: Ceres, p. 593–633.
- Pavan, M. A., Krause-sakate, R., Moura, M. F., eKurozawa, C. 2016. Doenças das solanáceas. In: *Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*, eds. Lilian; Amorim, Jorge A. M. Rezende, Armando; Bergamin Filho, e L. E. A Camargo. Ourofino, MG: CERES.
- Phillips, D, Grant, B.R and Weste, G. 1987. Histological changes in the root of an avocado cultivar, Duke 7 Infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Cytol. Histol.* 77:691–698.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., e Ohlrogge, J. B. 2008. Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci.* 13:236–246.

Portz, R. L., Fleischmann, F., Koehl, J., Fromm, J., Ernst, D., Pascholati, S. F., Osswald, W. F. 2011. Histological, physiological and molecular investigations of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola*. Forest Pathology. 41:202-211.

Rittinger, P. A., Biggs, A. R., e Peirson, D. R. 1986. Histochemistry of lignin and suberin deposition in boundary layers formed after wounding in various plant species and organs. Canadian Journal of Botany. 65:1886-1892.

Santos, H. S., e Goto, R. 2004. Enxertia em plantas de pimentão no controle da murcha de fitóftora em ambiente protegido. Hortic. Bras. 22:45-49.

Sarria, G. A., Martinez, G., Varon, F., Drenth, A., e Guest, D. I. 2016. Histopathological studies of the process of *Phytophthora palmivora* infection in oil palm. Eur. J. Plant Pathol. 145:39-51. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-015-0810-9>.

Silvar, C., Duncan, J. M., Cooke, D. E. L., Williams, N. A., Díaz, J., e Merino, F. 2005. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. Eur. J. Plant Pathol. 112:43-52.

Stangarlin, J. R., Kuhn, O. J., Toledo, M. V., Portz, R. L., Schwan-Estrada, K. R. F., e Pascholati, S. F. 2011. A defesa vegetal contra fitopatógenos. Sci. Agrar. Parana. 10:18-46.

Stössel, P., Lazarovits, G., e Ward, E. 1980. Penetration and growth of compatible and incompatible races of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean hypocotyl tissue differing in age. Can. J. Bot. 58:2594-2601.

Thomas, R., Fang, X., Ranathunge, K., Anderson, T. R., Peterson, C. A., e Bernards, M. A. 2007. Soybean root suberin: anatomical distribution, chemical composition, and relationship to partial resistance to *Phytophthora sojae*. Plant Physiology. 144:299-311

Vandana, V. V., Suseela Bhai, R., e Azeez, S. 2014. Physiological and Molecular Plant Pathology Biochemical defense responses of black pepper (*Piper nigrum* L.) lines to *Phytophthora capsici*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 88:18-27 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.06.003>.

Whisson, S. C., Boevink, P. C., Wang, S., e Birch, P. R. J. 2016. Science Direct The cell biology of late blight disease. Curr. Opin. Microbiol. 34:127-135 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.09.002>.

Zhang, Z. G., Li, Y. Q., Fan, H., Wang, Y. C., e Zheng, X. B. 2006. Molecular detection of *Phytophthora capsici* in infected plant tissues, soil and water. Plant Pathol. 55:770-775.

Zorzal, P. B. 2009. Identificação de mecanismos relacionados à resistência à Fusariose do abacaxizeiro. 99 p.