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

Histopatologia dos mecanismos de resistência de pimentão a *Leveillula taurica*,
agente causal de oídio

Vanessa Marcele Macedo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2018

Vanessa Marcelle Macedo
Engenheira Agrônoma

Histopatologia dos mecanismos de resistência de pimentão a *Leveillula taurica*, agente
causal de oídio

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2018

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

Macedo, Vanessa Marcele

Histopatologia dos mecanismos de resistência de pimentão a *Leveillula taurica*, agente causal de oídio / Vanessa Marcele Macedo - - Piracicaba, 2018.

61 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Leveillula taurica* 2. Histopatologia 3. Mecanismos de resistência 4. Pimentão I. Título

Dedicatória

Aos meus pais, Paulo e Marina, e à minha avó Helena, meus exemplos de vida, honestidade e humildade. Minha eterna gratidão pelo amor incondicional e por sempre acreditarem em mim.

*Aos meus queridos irmãos, Paulo e Kleber, por serem a minha força e meus verdadeiros
amigos,*

Aos meus sobrinhos, Maísa, Neto e Gabriel, por serem minha alegria e o pensamento futuro

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Luis Eduardo Aranha Camargo, pela orientação, ensinamentos e pela oportunidade de ter sido sua aluna!

À Professora Beatriz Appezzato da Glória e a Técnica Marli Kasue M. Soares, do Laboratório de Anatomia vegetal, pela estrutura concedida e suporte imprescindível para realizar este trabalho. E aos amigos queridos que fizeram parte desta jornada: Zélia Valente Braga, Alexandre Ferraro, Márcia Gonçalves Dias, Gabriela Santos da Silva, Júlia Boscariol, Magda Tessmer e Yane Caroline dos Anjos (agregada do Lanveg...rsrs) pela amizade, boas risadas e principalmente pelo carinho, reconfortantes nos momentos de dificuldade! Um agradecimento especial para a Zélia, sua amizade foi essencial para mim, obrigada por ter sido meu anjinho da guarda tantas vezes!!

Ao Professor Elliot Watanabe Kitajima do Laboratório de Microscopia Eletrônica, muito obrigada pela estrutura concedida, sem a qual seria impossível realizar meu trabalho. À Aline Daniele Tassi, muito obrigada pelas inúmeras vezes que me ajudou com o microscópio, com boas risadas e seu carinho.

À Professora Simone Daniela Sartorio, da UFSCar/CCA, pelos ensinamentos e ajuda nas análises estatísticas desta pesquisa. Muito obrigada por ser solícita comigo e estar presente na minha trajetória acadêmica desde o Mestrado.

À minha querida cunhada Patrícia Carneiro pelas correções do Inglês.

Aos amigos do LGM: Mariana Cicarelli Cia, Marie Laborde, Lillian Bibiano, Raphael Severo, Tainá Franco, Camila Perdoncini Carvalho, Natália Magri, Fernanda Moretti de Castro, Pedro Confort, Fernando Henrique. Aprendi muito com vocês, muito obrigada pelas boas risadas e momentos de descontração! Marie e Mariana, vou levar vocês em meu coração!

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia por dividirmos uma fase tão especial e importante de nossas vidas. Um agradecimento especial para a Kelly Pazolini, Raphaella Zázera, Alice Landim e Renata Brito pelos momentos de descontração!

Aos Professores e funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia, pelos ensinamentos e pelo bom convívio durante esses anos.

À Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz pela estrutura concedida para a minha formação acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos para a realização do meu Doutorado.

“O grande inimigo do conhecimento não é a ignorância, é a ilusão de ter
conhecimento”

Stephen Hawking

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. A CULTURA DO PIMENTÃO	17
2.2. <i>LEVEILLULA TAURICA</i> COMO AGENTE CAUSAL DE OÍDIO EM PIMENTÃO.....	18
2.3. SINTOMATOLOGIA E CONTROLE	21
2.4. CONTROLE GENÉTICO	24
2.5. HISTOPATOLOGIA DA INTERAÇÃO <i>CAPSICUM ANNUUM</i> - <i>L. TAURICA</i>	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. MATERIAL VEGETAL	27
3.2. ANATOMIA COMPARATIVA DE TECIDOS FOLIARES SADIOS DE ‘HV12’ E ‘MAGALI’ POR MICROSCOPIA DE LUZ	27
3.3. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE INFECÇÃO E REPRODUÇÃO DE <i>L. TAURICA</i> EM FOLHAS DESTACADAS DE PIMENTÃO.....	29
3.4. AVALIAÇÃO DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE <i>L. TAURICA</i> NA SUPERFÍCIE EPIDÉRMICA DE ‘HV12’ E ‘MAGALI’	29
3.5. HISTOPATOLOGIA DE TECIDOS INFECTADOS DE ‘HV12’ E ‘MAGALI’	30
4. RESULTADOS	31
4.1. ANATOMIA COMPARATIVA DOS TECIDOS SADIOS DAS VARIEDADES DE PIMENTÃO ‘HV12’ E ‘MAGALI’ POR MICROSCOPIA DE LUZ.....	31
4.2. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA DE INFECÇÃO E REPRODUÇÃO DE <i>L. TAURICA</i> EM FOLHAS DESTACADAS <i>IN VITRO</i>	34
4.3. MÉDIA DE ESPOROS GERMINADOS NA SUPERFÍCIE EPIDÉRMICA DE ‘HV12’ E ‘MAGALI’	36
4.4. HISTOPATOLOGIA DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DAS VARIEDADES ‘HV12’ E ‘MAGALI’ INFECTADOS POR <i>L. TAURICA</i>	37
5. DISCUSSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	53
ANEXO.....	61

RESUMO

Histopatologia dos mecanismos de resistência de pimentão a *Leveillula taurica*, agente causal de oídio

Leveillula taurica, agente causal de oídio, é o patógeno mais importante da cultura do pimentão, tanto em cultivo protegido como em campo. A variedade 'HV12' é a única fonte estável de resistência de *C. annuum* ao fungo, amplamente utilizada em programas de melhoramento, cuja herança genética é de natureza complexa, oligogênica, com dominância parcial ou aditiva. Ainda não há estudos histopatológicos sobre a interação entre variedades de pimentão e *L. taurica*. Assim, o presente estudo visou comparar a anatomia do sistema dérmico, vascular e fundamental de folhas da variedade 'HV12' com a variedade suscetível 'Magali' e também as respostas histopatológicas destas variedades frente à infecção por *L. taurica*, aos cinco, dez e vinte dias após a inoculação. As variedades apresentam semelhanças anatômicas entre si, porém 'HV12' possui maior número médio de estômatos que 'Magali'. Em relação à morfometria, a variedade suscetível possui maior comprimento e largura médio de estômatos. *L. taurica* infecta e coloniza a variedade 'HV12' através da emissão de haustórios em todos os tempos de infecção (5, 10 e 20 d.a.i.) demonstrando que a resistência pré-haustorial não é capaz de barrar a infecção. Na variedade 'Magali', também visualizamos haustórios em todos os tempos estudados. No entanto, diferente da variedade resistente, verifica-se a hipertrofia de células do parênquima esponjoso de modo a descaracterizar este tecido e obstruir significativamente os espaços intercelulares. Os testes histoquímicos apontaram corpos proteicos no citoplasma das células do mesofilo em ambas as variedades, porém de maiores dimensões em 'HV12' principalmente aos 20 d.a.i., indicando que estes podem estar relacionados a defesa. Grãos de amido foram observados somente aos 05 d.a.i. em 'Magali', ao passo que em 'HV12' estes foram observados em todos os tempos, indicando que o patógeno não foi capaz de desviá-los, bem como, sua capacidade de manter o metabolismo de carboidratos e a atividade de seus cloroplastos. O presente estudo refuta o conceito de que a variedade 'HV12' é imune ao patógeno, mostrando que *L. taurica* consegue estabelecer uma relação de "compatibilidade básica" com esta variedade e que seus mecanismos de defesa devem ser de resistência pós-haustorial.

Palavras-chave: Oidiopsis; Respostas de defesa; *Capsicum annuum*; Anatomia

ABSTRACT

Histopathology of the resistance mechanisms of bell pepper to *Leveillula taurica*, the causal agent of powdery mildew

Leveillula taurica, causal agent of powdery mildew, is the major pathogen of the bell pepper, both in field and greenhouse crops, causing serious losses. 'HV12' is the unique source of resistance of *C. annuum* to the pathogen, widely used in breeding programs and resistance studies. The inheritance of its resistance is complex, oligogenic with partial or additive dominance effects. There are no histopathological studies on the interaction between bell pepper varieties and *L. taurica*. Thus, the aim of the present study was to anatomically compare the leaves of 'HV12' with those of the susceptible variety 'Magali' as well as the histological responses on these varieties to infection with *L. taurica* at five, ten and twenty days after inoculation. There are no anatomical differences between the varieties, but 'HV12' has a greater average number of stomata than 'Magali'. In relation to morphometry, the stomata of 'Magali' are longer and wider. *L. taurica* infects and colonizes 'HV12' by emitting haustoria, which were observed at all time points (5, 10 and 20 d.a.i.) demonstrating that its resistance does not operate at the pre-haustorial stage. In 'Magali', haustoria were also observed at all times. However, unlike the resistant variety, the cells of the spongy parenchyma displayed hypertrophy to the point of obstructing the intercellular spaces of this tissue. Histochemical tests revealed protein bodies in the cytoplasm of the mesophyll cells on both varieties, but they were larger in 'HV12' mainly at 20 d.a.i., indicating that these may be related to plant defense. Starch grains were observed only at 05 d.a.i. in 'Magali', whereas in 'HV12' these were observed at all times, indicating that the pathogen was not able to divert them, as well as their ability to maintain carbohydrate metabolism and the activity of their chloroplasts. The present study refutes the concept that the 'HV12' variety is immune to the pathogen, showing that *L. taurica* can establish a "basic compatibility" relationship with this variety and that its defense mechanisms must be post-haustorial in nature.

Keywords: Oidiopsis; Defense responses; *Capsicum annuum*; Anatomy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletromicrografias: **A.** Germinação do conídio de *Leveillula taurica* pela emissão de tubo germinativo e produção de corpos de adesão primário e secundários (**setas**). Notar que antes de penetrar pelo estômato mais próximo, às vezes, a hifa cresce epifiticamente na superfície abaxial da folha; **B.** Visão aproximada dos corpos de adesão; **C.** Penetração pelo estômato (seta); **D.** Conidióforos emergindo pelos estômatos, ramificados e não ramificado. Barras: A – 30 µm, B- 20 µm, C e D – 100 µm (MACEDO, 2016). 19

Figura 2. Comparação de sintomas entre 'HV12' (resistente) e 'Magali' (suscetível). **A-B.** 'Magali' com sintomas: clorose na face adaxial das folhas (setas). **C.** 'Magali': sinais do patógeno na face abaxial da folha: pontos proeminentes (setas). **D.** Face abaxial: folha de 'Magali' (lado esquerdo) com sinais do patógeno em comparação com a ausência de sinais em 'HV12' (lado direito). **E-F.** Folhas de 'HV12' sem sintomas. **G-H.** 'Magali' (lado esquerdo) e 'HV12' (lado direito) lado a lado dentro da casa de vegetação. Notar a desfolha e clorose acentuada na variedade suscetível (lado esquerdo), sintoma característico de *L. taurica*, em contraposição à variedade resistente que mantém as folhas e sem clorose (MACEDO, 2016). 22

Figura 3. A-B. Sinais de *L. taurica* na face abaxial das folhas da variedade 'Magali' - suscetível. **A.** Visão frontal da folha – esporulação pulverulenta branca; **B.** Conidióforos e conídios primário (lanceolados) e secundários (cilíndricos e calvóides). Barras: A – 2000 µm, B – 20 µm. Co - conidióforo, Cp – conídio primário Cs – conídio secundário (MACEDO, 2016). 23

Figura 4. Cortes transversais de folhas sadias de 'HV12': **A.** Visão geral da lâmina foliar - epiderme unisseriada, mesofilo dorsiventral (Barra – 50 µm); **B.** Visão frontal da superfície epidérmica adaxial (Barra – 50 µm); **C.** Visão frontal da superfície epidérmica abaxial (Barra – 50 µm). Notar que em ambas as superfícies os estômatos são anomocíticos; **D.** Idioblastos cristalíferos no mesofilo - setas (Barra – 200 µm). Testes histoquímicos: **E.** Xylidine ponceau (Barra – 20 µm); **F.** Aniline blue black (Barra – 20 µm); **G.** Cloreto de zinco iodado (Barra – 100 µm); **H.** Vermelho de rutênio (Barra – 100 µm). Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Fv – Feixe vascular.32

Figura 5. Cortes transversais de folhas sadias de 'Magali': **A.** Visão geral da lâmina foliar: epiderme unisseriada, mesofilo dorsiventral (Barra – 20 µm). **B.** Visão frontal da superfície epidérmica adaxial (Barra – 50 µm). **C.** Visão frontal da superfície epidérmica abaxial (Barra – 50 µm). Notar que em ambas as superfícies os estômatos são anomocíticos. **D.** Visão geral dos idioblastos cristalíferos no mesofilo - setas (Barra – 200 µm). Testes histoquímicos: **E.** Xylidine ponceau; **F.** Aniline blue black; **G.** Cloreto de zinco iodado; **H.** Vermelho de rutênio. (Barras E,F,H - 20 µm; G – 100 µm). Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Fv – Feixe vascular. 33

Figura 6. Metodologia de inoculação: **A.** Disco de inoculação; **B.** Local de inoculação na face abaxial da folha sadia da variedade 'Magali' (Dois quadrados de 1 cm²); **C.** Folha inoculada: sinais (estruturas reprodutivas) de *Leveillula taurica* aos vinte dias após a inoculação (Detalhe: pontos cloróticos na folha – setas); **D.** Folhas destacadas inoculadas, acondicionadas em tubo falcon com água destilada; **E.** Câmara úmida após a inoculação – folhas expostas à luz por 12 horas e, nas 12 horas seguintes, ao escuro; **F.** Resultado da inoculação, visto em Microscópio estereoscópico: conidióforos e conídios emergindo pelos estômatos da face abaxial; **G.** Esporulação pulverulenta branca em visão frontal aos vinte dias após inoculação. Barras: F,G – 1000. µm. **H.** Número médio de conídios por disco de inoculação (número de conídios X 10⁵ mL)..... 35

Figura 7. Proporção média de conídios de *Leveillula taurica* germinados na superfície epidérmica de 'HV12' e 'Magali', 12 e 24 horas após a inoculação. **A.** Representação gráfica. **B.** Visão frontal de conídios germinados (tubos germinativos apontados pelas setas) e não germinados. (Barras - 200 µm). 36

Figura 8. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* 'HV12' infectados por *Leveillula taurica*, 05 dias após a inoculação. **A.** Secção transversal dos tecidos sadios. **B-D.** Secções transversais dos tecidos infectados. **B.** Vista geral do limbo foliar evidenciando o ponto de infecção (destaque). **C.** Observar hifa no estômato e formação de haustório. **D.** Detalhe do destaque em B evidenciando a hipertrofia nas células do parênquima esponjoso espessamento parietal (setas). Observar a diminuição dos espaços intercelulares. **A-D:** Coloração com Azul de Toluidina. Barras: A,B – 100 µm; C – 10 µm; D - 20 µm. Ep – Epiderme; Et – Estômato; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa; Ha – haustório..... 39

Figura 9. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* 'HV12' infectados por *Leveillula taurica*, 10 dias após a inoculação. **A.** Secção transversal dos tecidos sadios. **B-F.** Secções transversais dos tecidos infectados. **B.** Vista geral do limbo indicando o ponto de infecção (destaque). **C.** Observar o colapso das células epidérmicas (setas vermelhas) e hiperplasia do parênquima esponjoso (setas pretas). **D.** Detalhe evidenciando a hiperplasia da célula da bainha do feixe vascular (seta). **E-F.** Colonização inter (setas) e intracelular (haustórios) nas células da bainha do feixe vascular. **A-C:** Coloração com Azul de Toluidina **E.** Dupla coloração com Azul de Algodão e Safranina **F.** Reação após teste histoquímico com Vermelho de Rutênio. Barras: A- B – 100 µm; C-F – 10 µm. Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; Ha – haustório..... 40

Figura 10. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* ‘HV12’ infectados por *Leveillula taurica*, 20 dias após a inoculação. **A.** Secção transversal dos tecidos sadios. **B-D.** Secções transversais dos tecidos infectados. **B.** Vista geral do limbo foliar evidenciando o ponto de infecção (destaque). **C.** Detalhe do destaque em B. Observar o adensamento das células do parênquima esponjoso entorno do patógeno. **D.** Análise de fluorescência evidenciando a ocorrência de hifas intercelular (verde) e acumulo de celulose nas paredes celulares (azul). **A-C:** Coloração com Azul de Toluidina. **D:** Corantes de fluorescência: WGA Alexafluor 488 e Calcofluor White. (Barras: A-B – 100 µm; C-I – 10 µm). Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa. 41

Figura 11. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* - ‘Magali’ infectados por *Leveillula taurica*, 05 dias após a inoculação. Secções transversais comparam os tecidos sadio. **A.** Secção transversal dos tecidos sadios. **B-E.** Secções transversais dos tecidos infectados. **B.** Vista geral do limbo indicando a divisão anticlinal da célula epidérmica (seta). **C.** Células epidérmicas justapostas abaixo do estômato, isolando-o das demais células. **D.** Observar a presença de hifa no espaço intercelular do mesófilo e a formação de haustório. **E.** Observar a presença de hifas no lúmen do elemento de vaso. **A-B:** Coloração com Azul de Toluidina. **C-E.** Dupla coloração com Azul de Algodão e Safranina. Barras: A,B – 50 µm; C,D – 10 µm; E – 20 µm. Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa; Ha – haustório. 42

Figura 12. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* ‘Magali’ infectados por *Leveillula taurica*, 10 dias após a inoculação. **A.** Secção transversal dos tecidos sadios. **B-E.** Secções transversais dos tecidos infectados. **B.** Vista geral do limbo foliar indicando a proliferação de hifas (setas), a hipertrofia nas células do parênquima paliçádico e da bainha do feixe vascular (Destakes). Observar nestas regiões o aumento na espessura do limbo foliar e redução dos espaços intercelulares. **C-E.** Observar a proliferação acentuada de hifas nas demais regiões do mesófilo (setas). **E.** Observar que os idioblastos cristalíferos servem como um obstáculo para a movimentação do fungo (seta). **A,B,D,E:** Coloração com Azul de Toluidina. **C.** Reação após teste histoquímico com Vermelho de Rutênio. Barras: A-C – 100 µm; D-F – 10 µm). Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa; Ha – haustório..... 43

Figura 13. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* ‘Magali’ infectados por *Leveillula taurica*, 20 dias após a inoculação. **A.** Secção transversal dos tecidos sadios. **B.** Folha infectada: local de inoculação (quadrados). **C-E.** Secções transversais dos tecidos infectados. **C.** Vista geral do limbo foliar indicando o tecido alterado (destaques). Observar a hipertrofia e hiperplasia celular ocasionando a diminuição dos espaços intercelulares. **D.** Detalhe evidenciando hiperplasia (setas). **E.** Observar a difícil visualização de hifa entre células alteradas (seta). **F.** Observar a saída do patógeno pelos estômatos da face adaxial (seta). **A,C,E-F:** Coloração com Azul de Toluidina. **D.** Reação após teste histoquímico com Vermelho de Rutênio. Barras: A-C – 100 µm; D-F – 10 µm). Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; Ha – haustório..... 44

Figura 14. Análises histopatológicas de folhas destacadas de *Capsicum annuum* - inoculadas com *Leveillula taurica*: **A-D.** 5 dias após a inoculação; **B-E.** 10 d.a.i.; **C-F.** 20 d.a.i.. **A-C.** Variedade

resistente – ‘HV12’. **D-F.** Variedade suscetível – ‘Magali’. **A-C.** Secções transversais evidenciando corpos globulares proteicos de pequenas dimensões aos 05 d.a.i. em ‘HV12’, e o seu aumento progressivo nos demais tempos de inoculação (setas). Observar o evidente aumento nas dimensões dos grânulos aos 20 d.a.i. **D-F.** Secções transversais evidenciando corpúsculos globulares proteicos de pequenas dimensões em ‘Magali’ em todos os tempos de inoculação (setas). **A-F.** Reação após teste histoquímico com Xylidine Ponceau. Barras A-L: 20 µm. Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa. 45

Figura 15. Análises histopatológicas de folhas destacadas de *Capsicum annuum* - inoculadas com *Leveillula taurica*: **A-D.** 5 dias após a inoculação; **B-E.** 10 d.a.i.; **C-F.** 20 d.a.i.. **A-C.** Variedade resistente – ‘HV12’. **D-F.** Variedade suscetível – ‘Magali’. **A-C.** Secções transversais evidenciando a ocorrência de grãos de amido aos 05 d.a.i. em ‘HV12’, e seu aumento e manutenção nos tempos seguintes. **D-F.** Secções transversais evidenciando a ocorrência de grãos de amido aos 05 d.a.i. em ‘Magali’, no entanto, sua ausência nos tempos seguintes. Barras A-F: 100 µm. Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Fv – Feixe vascular. 46

Figura 16. Análises histopatológicas de folhas destacadas de *Capsicum annuum* - inoculadas com *Leveillula taurica*: **A-D.** 5 dias após a inoculação; **B-E.** 10 d.a.i.; **C-F.** 20 d.a.i.. **A-C.** Variedade resistente – ‘HV12’. **D-F.** Variedade suscetível – ‘Magali’. **A-C.** Secções transversais evidenciando corpos globulares proteicos em ‘HV12’ em todos os tempos de inoculação (Setas). Observar o evidente aumento nas dimensões dos grânulos aos 20 d.a.i. **D-F.** Secções transversais evidenciando corpúsculos globulares proteicos de pequenas dimensões em ‘Magali’ em todos os tempos de inoculação (setas). **A-F.** Reação após teste histoquímico com Aniline Blue Black. Barras A-L: 20 µm. Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa. 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Morfometria e número médio de estômatos na variedade 'HV12' e 'Magali' e nas faces adaxial e abaxial..... 34

Tabela 2. Número médio de idioblastos na variedade 'HV12' e 'Magali'. 34

1. INTRODUÇÃO

Originário da América Tropical e bem distribuído por toda a América Latina, a cultura do pimentão (*Capsicum annuum* L.), está entre as cinco hortaliças mais vendidas no mercado de sementes, de acordo com as pesquisas divulgadas pela Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM, 2014). No Brasil, a área cultivada é de 13 mil ha e a produção de 290 mil toneladas de frutos aproximadamente, concentrada nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro (MAROUELLI & SILVA, 2012).

O cultivo protegido foi introduzido na década de 80, na região sul do país, para viabilizar a produção durante o inverno. Desde então, se tornou uma tendência na produção da cultura, pois possibilitou maior produtividade, proteção contra intempéries climáticas como a chuva, geada e ventos que possam danificar a planta (LORENTZ et al., 2004; MAROUELLI & SILVA, 2012). Porém, esta modalidade de cultivo favorece a ocorrência de oídio, causado pelo fungo *Leveillula taurica* (Lév.) Arn., atualmente relatado como a doença de maior importância para a cultura (JO et al., 2017). Epidemias severas provocam desfolha de até 75% e perdas na produção de até 40% (PALTÍ, 1971; PEREIRA et al, 2013; REIS et al, 2005; BLAT et al, 2005).

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência do oídio em pimentão foi em 1994 (BOITEUX et al., 1994). Sua introdução pode ter sido por meio de plantas ornamentais importadas, uma vez que não há relato de sua transmissão via semente. A fase assexuada, *Oidiopsis taurica*, também conhecida como *Oidiopsis haplophylli*, é responsável pelas infecções em pimentão (REIS et al., 2005), embora a fase sexuada, *Leveillula taurica*, tenha sido relatada em outras plantas hospedeiras (PAZ-LIMA et al., 2004).

Uma característica relevante do patógeno é sua ampla gama de hospedeiros, como tomate, pepino, pimentas, jiló, berinjela, batata, coentro, salsinha, alho, alho poró, cebola, chicória, quiabo, fumo, algodão, ornamentais e plantas daninhas, como erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides* L.) e o joá-de-capote (*Nicandra physaloides* L.Pers.) (SOUZA & CAFÉ FILHO et al., 2000; GLAWE et al., 2004; REIS et al., 2005; GLAWE et al., 2010). Após o primeiro relato, o patógeno tem sido encontrado em praticamente todas as regiões produtoras de hortaliças e ornamentais, sendo considerado como uma doença endêmica (CABI, 1996; STADNIK et al., 2001; CERKAUSKAS & BUONASSISI, 2003).

As plantas suscetíveis infectadas apresentam manchas cloróticas na face adaxial das folhas mais velhas, que podem coalescer e tomar toda a superfície da mesma. Na face abaxial,

correspondente à lesão, surgem os sinais do patógeno na forma de colônias brancas pulverulentas compostas por conidióforos e conídios. A doença provoca redução da área fotossintética, redução do número de flores por planta, redução do número e tamanho de frutos, e sua exposição ao sol, que resulta em queima (PALTÍ, 1988; SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003; ELAD et al., 2007). Porém, plantas jovens são imunes, independente da variedade (SOUZA & CAFÉ FILHO, 2000).

O controle químico do patógeno tem sido desvantajoso para a cultura, a qual foi apontada pela ANVISA como o alimento mais contaminado por resíduos de agrotóxicos, afetando negativamente a aceitação dos consumidores (ANVISA, 2016; MACHADO et al., 2017). Há poucas moléculas registradas para o controle do patógeno (AGROFIT, 2018), que usadas em excesso e de forma indiscriminada, deixam a cultura mais vulnerável à resistência (McGRATH, 1996; GUZMÁN-PLAZOLA et al., 2011; FONDEVILLA & RUBIALES, 2012); além disso, este método de controle é oneroso ao produtor, aumentando substancialmente os custos de produção (AGRIANUAL, 2018). Por sua vez, o uso de agentes químicos alternativos como fosfato monopotássico e leite de vaca é incerto e tem efeitos limitados por apresentarem resultados que variam de acordo com as combinações de produtos usados ou apenas de forma preventiva (REVEUNI et al., 1998; ALHARBI & ALAWLAQI, 2014). Portanto, o controle genético mostra-se como a melhor alternativa de controle devido à alta eficácia, fácil uso e por ser ecologicamente desejável (BLAT, 2004; MARCHESAN, 2008).

A variedade 'HV12' é uma fonte de resistência de *C. annuum* amplamente utilizada em programas de melhoramento, cuja herança da resistência é de natureza complexa, oligogênica, dominância parcial ou aditiva, porém estável (DAUBEZE et al., 1995; SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003; BLAT et al., 2005). Esta variedade resulta de um cruzamento entre uma variedade resistente da Etiópia (H₃) e a suscetível 'Vania'. A resposta de resistência envolve dois mecanismos: restrição à colonização do patógeno e a retenção foliar (SHIFRISS et al., 1992). No entanto, estes mecanismos ainda são pouco conhecidos do ponto de vista anatômicos.

Assim, o presente estudo visou uma comparação anatômica de folhas da variedade 'HV12' com a variedade suscetível 'Magali' e as respostas histopatológicas destas variedades frente à infecção por *L. taurica*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura do pimentão

Pertencente à família *Solanaceae*, o gênero *Capsicum*, foi domesticado na América Central, mais precisamente México e Guatemala, e rapidamente distribuído por toda a América Latina e pelo mundo. O gênero foi relatado pela primeira vez no continente Americano em 1494. O pimentão (*Capsicum annuum* L.) está entre as cinco hortaliças mais vendidas no mercado de sementes, de acordo com dados divulgados pela Associação Brasileira do Comércio de Sementes e Mudas (ABCSEM, 2014). Além de *C. annuum*, a mais cultivada no mundo, há mais quatro espécies pertencentes ao gênero - *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens* (BLAT, 2004; PICKERSGILL, 1997).

Embora a espécie seja perene, o pimentão é cultivado como cultura anual (FILGUEIRA, 2008). As plantas são autocompatíveis, diploides ($2n=24$) e, com predominância de autofecundação (PICKERSGILL, 1997; WALSH & HOOT, 2001). É uma hortaliça rica em diversas vitaminas e minerais (A, B1, B2, C, ferro, fósforo, cálcio, carotenoides, outras); pode ser consumida verde ou madura, ou, ainda, ser utilizada na indústria alimentícia e de corantes (PEREIRA et al., 2013). A planta requer temperaturas tropicais para o seu desenvolvimento, entre 20 a 30°C; porém altas temperaturas, acima de 35°C causam o aborto e a queda das flores. São sensíveis a temperaturas amenas e geadas principalmente durante a germinação e formação das plântulas. No entanto, não são tão exigentes quanto a umidade do solo para a germinação mas a falta de água limita seu desenvolvimento, diminuindo a produtividade. (BLAT & COSTA, 2007).

No Brasil, a área cultivada é de 13 mil ha e a produção de 290 mil toneladas de frutos aproximadamente, concentrada nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro (MAROUELLI E SILVA, 2012).

A produção pode ser feita em campo aberto, principalmente durante a estação seca, como também em casas-de-vegetação com cobertura plástica. No Brasil, o cultivo protegido surgiu na década de 80, no Estado de São Paulo e, desde então, se espalhou por todo o país (PEREIRA et al., 2013; VIDA et al., 2004). Dentre as principais vantagens deste sistema de produção destacam-se a proteção contra a variação climática, período de colheita prolongado, menor severidade da grande maioria das doenças da parte aérea, melhor qualidade de fruto

e oferta de produto durante todo o ano. Porém, além do alto investimento inicial e elevado custo de produção, o cultivo em ambiente protegido favorece a ocorrência de oídio, causado pelo fungo *Leveillula taurica* (PEREIRA et al., 2013).

2.2. *Leveillula taurica* como agente causal de oídio em pimentão

O oídio é causado pelo fungo biotrófico *Leveillula taurica* (Lev.) Arn., anamorfo *Oidiopsis taurica* (Lev.) Salmon. A fase assexuada, também conhecida como *Oidiopsis haplophylli*, é a responsável pelas infecções em pimentão (REIS et al., 2005) embora, a fase sexuada tenha sido encontrada em outras plantas hospedeiras (PAZ-LIMA et al., 2004).

O patógeno pertence à ordem Erysiphales e família Erysiphaceae. Além do hábito ectoparasítico comum à maioria dos oídios, o gênero *Leveillula* é conhecido por sua natureza também endoparasítica, caracterizada por desenvolvimento de micélio endofítico, cujos haustórios, endotróficos, são produzidos no mesofilo. Outros gêneros também possuem o mesmo hábito endoparasítico como *Phyllactinia* e *Pleochaeta* (ZHENG et al., 2013). O mesmo autor descreve que o fungo possui corpos de adesão primário e secundários formados na hifa primária, estruturas responsáveis por ligar o esporo germinado à superfície da folha; porém esta estrutura difere do apressório por não iniciar a penetração nas células epidérmicas (Figuras 1A e B).

A hifa primária, proveniente da germinação do conídio, penetra pelos estômatos da face abaxial da folha e dá origem às hifas internas (Figura 1C), as quais colonizam as células do mesofilo nutrindo-se destas através de haustórios. Este micélio endofítico dará origem aos conidióforos e conídios que emergem pelos estômatos da folha (Figura 1D) (TAKAMATSU, 2013).

Figura 1. Eletromicrografias: **A.** Germinação do conídio de *Leveillula taurica* pela emissão de tubo germinativo e produção de corpos de adesão primário e secundários (**setas**). Notar que antes de penetrar pelo estômato mais próximo, às vezes, a hifa cresce epifiticamente na superfície abaxial da folha; **B.** Visão aproximada dos corpos de adesão; **C.** Penetração pelo estômato (seta); **D.** Conidióforos emergindo pelos estômatos, ramificados e não ramificado. Barras: A – 30 μm , B- 20 μm , C e D – 100 μm (MACEDO, 2016).

Sugere-se que este hábito endoparasítico seja decorrente de uma evolução ou adaptação às condições xerófilas comuns à região da Ásia leste e central até o Mediterrâneo, uma das regiões mais áridas do mundo, na qual encontra-se o maior número de espécies e hospedeiros de *Leveillula*, tida como a possível região de origem das espécies de *Leveillula*. Análises filogenéticas sugerem que o endoparasitismo deve ser um fenótipo que apareceu somente uma vez durante a história evolucionária dos oídios (BRAUN, 1987; PALTÍ, 1988; MORI et al., 2000; TAKAMATSU, 2013); e que o gênero *Leveillula* evoluiu do gênero *Phyllactinia* (TAKAMATSU, 2008). O processo de infecção de *L. taurica* foi estudado por Zheng et al. (2013). Os autores mostraram que a penetração pode ocorrer até 48 horas após a inoculação, a formação de haustórios ocorre de 72 a 96 horas após a inoculação e a projeção de hifas e conidióforos dos estômatos ocorre entre 14 a 16 dias após a inoculação, ou seja, possui um

período de latência superior a duas semanas. Ao contrário dos demais gêneros causadores de oídio, os haustórios de *L. taurica* não foram observados nas células epidérmicas usando a microscopia de luz nem mesmo ao microscópio eletrônico de transmissão; apenas nos tecidos do parênquima paliádico e lacunoso. Os haustórios são constituídos de um corpo haustorial e muitos lobos haustoriais embebidos em uma matriz haustorial, envoltos pela membrana extra-haustorial. Também foram observadas grandes estruturas esféricas, com cerca de 1,0 a 1,2 μm de diâmetro, constituídas aparentemente de lipídios dentro haustório, como também fora da membrana extra-haustorial – no citoplasma das células invadidas do parênquima lacunoso.

Palti (1988) descreveu as características morfológicas do patógeno, cujos conidióforos aparecem em grupos de um a cinco, emergidos pelos estômatos, medindo de 200-700 x 3.7-7.4 μm , podendo apresentar ramos de 110-260 μm de comprimento. Os conidióforos que são produzidos do micélio externo medem, aproximadamente, 69-150 x 4-5 μm . O fungo produz dois tipos de conídios: o conídio primário é o primeiro a ser produzido no conidióforo, lanceolado e com ponta no ápice, bastante diferente do conídio subsequente, o conídio secundário, que é cilíndrico, clavado ou ovoide, medindo cerca de 40-80 x 12-16 μm . O micélio intercelular é denso e conspícuo, diferente daquele que cresce na superfície do hospedeiro. O apressório é achatado ou ramificado. O haustório é globoso e mede cerca de 15-30 μm de largura.

Os conídios possuem a capacidade de germinar em temperaturas que variam de 10 a 37°C, sendo a ideal 20°C, porém a viabilidade cai quando a temperatura chega a 40°C por 6 horas (ELAD et al., 2007). Além disso, a germinação pode ocorrer em condições de alta e baixa umidade relativa (40 a 90%) (SHIFRISS et al., 1992). Outra informação importante, mostrada em estudos *in vitro*, é que o patógeno consegue sobreviver em folhas de pimenta expostas à -10°C por aproximadamente dois meses (CERKAUSKAS & BUONASSISI, 2003).

O oídio é considerado como a mais séria doença para a cultura do pimentão, principalmente sob cultivo protegido, tanto no Brasil como em outros países (PALTÍ, 1988; PEREIRA et al., 2013); podendo causar desfolha de 50 a 75% e perdas de até 40% em produção (DAMICONE & SUTHERLAND, 1999). Até os anos 90, havia maior incidência da doença em regiões mais quentes (PALTÍ, 1988). Entretanto, nos últimos anos tem causado sérios problemas na Europa ocidental, América do Norte e outras regiões temperadas como

resultado do uso intensivo de casas-de-vegetação para a produção de pimentão (CORRELL et al., 1987; DAMICONE & SUTHERLAND, 1999; CERKAUSKAS & BUONASSISI, 2003).

Uma informação importante do ponto de vista epidemiológico é que o patógeno infecta várias famílias vegetais como as solanáceas (tomate, berinjela, batata, jiló), cucurbitáceas (pepino); asteráceas (alcachofra); malváceas (quiabo, algodão), fabáceas (fava), liliáceas (alho, alho porró e cebola) (NOUR, 1958; EL-AMMARI & KHAN, 1983; PALTÍ, 1988; DAUBEZE et al., 1995; GLAWE et al., 2004, 2010; REIS et al., 2004; REIS et al., 2005a; REIS et al., 2005b). Portanto, plantios das culturas supracitadas em sucessão ou rotação favorecem a ocorrência de severas epidemias.

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência do oídio em pimentão foi em 1994 (Boiteux et al., 1994). Sua introdução pode ter sido por meio de plantas ornamentais importadas, uma vez que não há relato de sua transmissão via semente. A fase assexuada, *Oidiopsis taurica*, também conhecida como *Oidiopsis haplophylli*, é responsável pelas infecções em pimentão (REIS et al., 2005), embora a fase sexuada, *Leveillula taurica*, possa ser encontrada em outras plantas hospedeiras (PAZ-LIMA et al., 2004).

2.3. Sintomatologia e controle

Em plantas suscetíveis, os sintomas da doença iniciam-se na face adaxial das folhas mais velhas da planta, na forma de manchas cloróticas (Figura 2A-C). Os sinais do patógeno surgem concomitantemente na face abaxial correspondente, representados por esporulação pulverulenta branca seja devido a alta densidade de estômatos ou ainda em função do microclima ser mais favorável ao desenvolvimento da doença nessa face (Figura 2D). Porém, também é possível ver os sinais do patógeno na face adaxial das folhas sob altas infestações. Com o progresso da doença, os sintomas e sinais também aparecem nas folhas novas (PALTÍ, 1988; BOITEUX et al., 1994; SOUZA & CAFÉ FILHO, 2000; ELAD et al., 2007). Em contrapartida, as plantas resistentes da variedade 'HV12' não apresentam manchas cloróticas na face adaxial das folhas, não há sinais do patógeno visíveis a olho nu na face abaxial das folhas, nem mesmo a ocorrência de desfolha (Figura 2D - F) (SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003).

Com o desenvolvimento da colonização, as manchas cloróticas e as colônias brancas pulverulentas aumentam e coalescem, tornando a folha amarelecida. Como consequência, as folhas perdem a área fotossintética e sofrem abscisão (Figura 2G e H), e os frutos perdem seu

valor comercial por ficarem expostos diretamente à radiação solar (CLERK et al., 1967; HOMMA et al., 1980, 1981).

Figura 2. Comparação de sintomas entre 'HV12' (resistente) e 'Magali' (suscetível). **A-B.** 'Magali' com sintomas: clorose na face adaxial das folhas (setas). **C.** 'Magali': sinais do patógeno na face abaxial da folha: pontos proeminentes (setas). **D.** Face abaxial: folha de 'Magali' (lado esquerdo) com sinais do patógeno em comparação com a ausência de sinais em 'HV12' (lado direito). **E-F.** Folhas de 'HV12' sem sintomas. **G-H.** 'Magali' (lado esquerdo) e 'HV12' (lado direito) lado a lado dentro da casa de vegetação. Notar a desfolha e clorose acentuada na variedade suscetível (lado esquerdo), sintoma característico de *L. taurica*, em contraposição à variedade resistente que mantém as folhas e sem clorose (MACEDO, 2016).

Figura 3. A-B. Sinais de *L. taurica* na face abaxial das folhas da variedade 'Magali' - suscetível. **A.** Visão frontal da folha – esporulação pulverulenta branca; **B.** Conidióforos e conídios primário (lanceolados) e secundários (cilíndricos e calvóides). Barras: A – 2000 μm , B – 20 μm . Co - conidióforo, Cp – conídio primário Cs – conídio secundário (MACEDO, 2016).

O período de latência do patógeno, compreendido entre a germinação do conídio na superfície da folha até o surgimento dos primeiros sinais do patógeno, é superior a duas semanas (Figura 3) (ZHENG et al., 2013). Porém, outros estudos ressaltam que o mesmo varia entre variedades de pimentão, bem como em função da idade da planta, sendo menor em tecidos de plantas mais velhas (SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003).

O aumento da prevalência e severidade de *L. taurica* indicam que medidas de controle são mandatórias para a produção de pimentão em muitos locais no mundo, inclusive no Brasil devido a rápida disseminação da doença (SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003). Contudo, o controle é dificultado, principalmente, porque a maior parte do seu ciclo de vida ocorre dentro da folha (PALTI, 1988). Outro fator agravante é a ampla gama de hospedeiros que dificulta a erradicação do patógeno, principalmente em áreas de cultivo que fazem sucessão ou rotação de pimentão com outras solanáceas ou hortaliças suscetíveis (GUZMAN-PLAZOLA et al, 2003). Ademais, estudos *in vitro* mostraram que o fungo tem grande capacidade de sobrevivência,

conseguindo manter-se vivo em folhas de pimenta expostas à – 10°C durante 60 a 120 dias, aproximadamente (CERKAUSKAS & BUONASSISI, 2003).

Fungicidas cúpricos e sistêmicos são usados para o controle porém o uso indiscriminado e em excesso tem prejudicado a comercialização dos frutos, apontados pela ANVISA como o alimento mais contaminado por resíduos de agrotóxicos (CERKAUSKAS & BUONASSISI, 2003; GUZMÁN-PLAZOLA et al., 2011; ANVISA, 2016; MACHADO et al., 2017); além disso podem promover o surgimento de raças resistentes (PALTÍ, 1988; BERGAMIN FILHO et al., 1995; McGRATH, 1996). Além disso, o crescimento endofítico do fungo dificulta o controle (DAUBEZE et al., 1995; ZHENG et al., 2013). Dessa forma, o uso de variedades resistentes é a melhor forma de controle, por ser viável do ponto de vista econômico e ecológico (DAUBEZE et al., 1995; BLAT et al., 2005).

2.4. Controle genético

Na prática, o melhoramento para a resistência em hortaliças é feito pela introdução de genes de resistência provenientes de espécies selvagens. Porém, as fontes encontradas em *C. annuum* apresentam resistência parcial de baixo nível e, portanto, não são adequadas para uso no melhoramento da espécie. Sua baixa resistência pode ser explicada devido à domesticação de *C. annuum*, onde o processo de seleção provocou a perda de genes que conferem resistência. Isto torna-se evidente em função das fontes de resistência em pimentas serem representadas por espécies menos domesticadas do que o pimentão, como *C. baccatum*, *C. chinense* e *C. frutescens*. (ULLASA et al., 1981; DAUBEZE et al., 1995; SHIFRISS et al., 1992; PAZ LIMA et al., 2004; SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003).

A variedade ‘HV12’, no entanto, é uma exceção. Originada de um cruzamento entre o genótipo haplodiplóide resistente - H3 e a variedade-Vânia (pai suscetível), este genótipo é relatado como imune ao patógeno em condições de campo e casa-de-vegetação; com uma resistência nomeada de resistência classe “zero”, isto é, sem esporulação visível e sem folhas infectadas (DAUBEZE et al., 1989, 1995). A linhagem africana H3 (linhagem etíope), resistente a *L. taurica*, se tornou a base do melhoramento de pimentão, e é utilizada até hoje nos programas de melhoramento genético e em estudos científicos da resistência. Para SHIFRISS et al. (1992), a variedade ‘HV12’ apresenta dois mecanismos de resistência, um em relação à

infecção e colonização do patógeno e o outro em relação ao desbalanço hormonal que leva a desfolha em função da doença.

De acordo com a literatura, a resistência no início da epidemia ou em condições de infecção fraca é controlada por dois ou três genes com efeito de dominância parcial ou aditiva. Contudo, o efeito de genes adicionais também é relatado como contribuinte para atrasar ainda mais o progresso da doença e infecções secundárias, totalizando cinco fatores genéticos que atuam com efeito aditivo e epistático para conferir resistência em infecções severas (DAUBÈZE et al., 1995). A resistência genética do híbrido 'HV-12' é controlada por vários genes, de dois a cinco pares de genes ou mais, e este híbrido é reconhecido como uma fonte estável de resistência (SHIFRISS et al., 1992; SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003).

Diversos estudos sobre a resistência a *L. taurica* também foram conduzidos no Brasil. Estes corroboram os relatos supracitados quanto à variedade HV-12 e ainda apontaram *C. chinense*, *C. baccatum* e *C. frutescens* como as melhores fontes alternativas de resistência (BLAT et al., 2005; LIMA, 2002; PAZ LIMA & CAFÉ FILHO, 2001; SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003). Tanto os acessos considerados resistentes em *C. annuum* quanto em *C. baccatum* e *C. chinense*, apresentaram reação de hipersensibilidade como mecanismo de defesa (Blat et al., 2005). Genótipos variam em relação ao período de latência, indicando diferentes níveis de resistência poligênica (SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003). Fato interessante é que todas as plantas jovens de qualquer genótipo comercial são resistentes à doença, caracterizando uma resistência juvenil em *Capsicum* (SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003).

2.5. Histopatologia da interação *Capsicum annuum* - *L. taurica*

As plantas possuem vários mecanismos de defesa capazes de evitar ou atrasar a entrada ou impedir a colonização de fitopatógenos em seus tecidos. As barreiras físicas formadas pela cutícula, tricomas, parede celular, tamanho e formato de estômatos são os mecanismos constitutivos, pré-formados, que devem ser ultrapassados para que a infecção ocorra (FREEMAN & BEATTIE, 2008; PASCHOLATI & DALIO, 2018). Considerando que os estômatos são o principal sítio de infecção de *L. taurica* em Pimentão, PAZ LIMA et al. (2010) estudaram a correlação entre a morfometria e frequência dos estômatos com a resistência ao oídio em várias variedades de Pimentão, e mostraram que a variedade 'Magali' apresentou

maior quantidade e frequência de estômatos, em ambas as faces das folhas, em comparação a variedade 'HV12'. Contudo, todos os genótipos estudados são anfi-hipoestomáticos, ou seja, possuem mais estômatos na face abaxial do que na adaxial. Porém, nem todos os genótipos analisados apresentaram essa correlação, sugerindo que outros mecanismos de resistência devem estar envolvidos nesse patossistema.

Ainda em relação aos mecanismos de defesa constitutivos, precedentes à invasão, as plantas contam também com diversas reações bioquímicas que são substâncias tóxicas aos patógenos, tais como a produção de compostos fenólicos, alcaloides, lactonas, glicosídeos, entre outros (DEHGAHI et al., 2015). Além disso, são capazes de reconhecer o microrganismo invasor e este reconhecimento desencadeia várias respostas de defesa pós-formadas, tais como a produção de fitoalexinas, proteínas PR, lignificação de tecidos, formação de papila, entre outros (SPANU & PANSTRUGA, 2017). Estudos sobre o patossistema *L. taurica* – *Capsicum annuum* apontam que a infecção provoca alterações ultraestruturais nas células de plantas infectadas, como a formação de papila ao redor dos haustórios e mudanças em organelas, como a presença de núcleos multilobados e grânulos achatados e alargados nos cloroplastos (ZHENG et al., 2013). Estes autores relataram também que não foram vistos haustórios do fungo nas células da epiderme, e que o primeiro a ser formado no mesófilo foliar foi entre 72 a 96 horas após a inoculação. Apesar destes relatos, ainda são necessários estudos que tragam informações histopatológicas acerca dos mecanismos de resistência operantes na interação *L. taurica* – pimentão comparando variedades com diferentes níveis de resistência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Vegetal

As sementes de Pimentão da variedade 'HV12' e 'Magali' utilizadas neste estudo foram cedidas pela empresa Sakata Seeds Sudamerica. As plantas de 'HV12' e 'Magali' foram cultivadas em vasos de 10 L e mantidas em casa de vegetação. Aos 60 dias após a semeadura as 4ª e 5ª folhas foram destacadas junto ao caule e utilizadas nos experimentos descritos a seguir. As plantas de 'Magali' infestadas naturalmente por *L. taurica* usadas como fonte de inóculo neste estudo também foram cultivadas em vasos e mantidas em casa de vegetação distinta das sadias. A identidade do patógeno foi confirmada por meio da verificação dos conídios do fungo em microscópio estereoscópio e de luz.

3.2. Anatomia comparativa de tecidos foliares sadios de 'HV12' e 'Magali' por microscopia de luz

Para analisar as características dos sistemas dérmico, fundamental e vascular de folhas destacadas sadias de 'HV-12' e 'Magali', quatro folhas foram coletadas de cada variedade aos 60 dias após a semeadura, das quais foram retiradas duas amostras da região central de cada. Estas amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada (paraformaldeído 4%; glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2; tampão fosfato 0,2 M pH 7,2) e submetidas a vácuo até a completa submersão das amostras. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série etílica (10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%) por dez minutos em cada solução. Na última etapa da série as amostras foram desidratadas três vezes. Após a desidratação, os tecidos foram infiltrados em solução de etanol absoluto/solução de infiltração (50 mL de resina básica e 0,5 g de ativador – Leica Historesin Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) na proporção 1:1 e depois na proporção de 2:1 (vol/vol), por, no mínimo, duas horas em cada e, em seguida, submetidas a solução de infiltração 100% por 24 horas. As amostras foram transferidas para moldes de plástico onde foram infiltradas com uma mistura de 1 mL de endurecedor e 15 mL de solução de infiltração. A polimerização foi feita por cerca de 10 minutos a temperatura ambiente e 10 minutos na estufa a 60 °C. Os blocos foram seccionados com 5 µm de espessura em micrótomo rotativo

(modelo RM2245, Leica). De cada amostra, as secções foram montadas em lâminas de vidro e coradas com azul de toluidina 0,05 % em tampão citrato-fosfato pH 4-6 (SAKAI, 1973). As lâminas histológicas foram montadas em resina sintética Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) e as imagens capturadas com uma câmera digital acoplada ao microscópio de luz Axioskop da Zeiss.

Para analisar a morfometria e o número de estômatos nas faces adaxial e abaxial foram usadas três folhas sadias de 'Magali' e 'HV12'. Destas, coletou-se a região mediana da folha, em que metade foi usada para analisar a face adaxial e a outra metade para a face abaxial, amostrando-se cinco pontos em cada amostra. Em seguida, foram incubadas em uma solução de etanol: ácido acético: glicerina na proporção 3:1:1 respectivamente, para a remoção da clorofila. Posteriormente, foram coradas com safranina e azul de alcian sob aquecimento (aproximadamente 80°C) por 10 minutos em cada um. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 (variedades) x 2 (faces) com 15 repetições (3 folhas e 5 pontos em cada uma). Para a variável número de estômatos foi feito a análise de deviance (ANODEV) e para as demais (comprimento e largura) foi feito a análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p=0,05$) de acordo com a Metodologia de Modelos Lineares Generalizados (MLG). Utilizou-se o software livre R versão 3.0.1 e seu pacote ExpDes e o programa ImageJ.

Para a contagem de idioblastos cristalíferos sob luz polarizada, foram usadas cinco folhas sadias de 'Magali' e igual número de 'HV12'. Destas, quatro pontos aleatórios foram amostrados na região mediana da folha. Utilizou-se delineamento inteiramente casualizado com 2 tratamentos e 20 repetições (5 folhas com 4 pontos). Os dados foram submetidos à análise de deviance (ANODEV), as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p=0,05$) de acordo com a Metodologia de Modelos Lineares Generalizados (MLG). Utilizou-se o software livre R versão 3.0.1 e seu pacote ExpDes e o programa ImageJ.

Análises histoquímicas foram realizadas em amostras do material fixado incluído em historresina. Para detectar grãos de amido foi empregado o corante cloreto de zinco iodado (STRASBURGER, 1913); para mucilagem ácida o vermelho de rutênio (GREGORY e BAAS, 1989); e para detecção de compostos proteicos utilizou-se o Xylidine Ponceau (CORTELAZZO e VIDAL, 1991) e o Aniline Blue Black (FISHER, 1968). Os testes histoquímicos foram confirmados em secções de tecido controle, não inoculado e provenientes de tecidos sadios conforme procedimento padrão para confirmação dos testes. Depois de coradas, as lâminas histológicas

foram montadas em resina sintética “Entellan” e as imagens capturadas com uma câmera digital acoplada ao microscópio de luz Axioskop da Zeiss.

3.3. Desenvolvimento de metodologia de infecção e reprodução de *L. taurica* em folhas destacadas de pimentão

Cinco folhas sadias destacadas de ‘Magali’ foram desinfestadas em álcool 70%, lavadas em água destilada por duas vezes e, em seguida, seus pecíolos foram imersos em tubos falcon contendo água destilada. A inoculação de *L. taurica* foi feita por polvilhamento de conídios a seco, segundo ALFENAS e FERREIRA (2007). Para isso, cinco discos de 2,5 cm de diâmetro (área= 4,9 cm²) foram retirados de folhas naturalmente infectadas de ‘Magali’. Cada folha foi inoculada com um disco polvilhando-se seus esporos a seco em dois quadrados de 1 cm² cada previamente delimitados na região central da face abaxial da folha destacada. Após a inoculação, as folhas foram mantidas em câmara úmida por 12 horas no claro e, nas 12 horas seguintes, no escuro. Em seguida, as mesmas foram acondicionadas dentro de uma caixa de germinação branca sob temperatura mínima de 21°C e máxima de 28°C, com fotoperíodo 12/12 horas. Dez dias após a inoculação, as folhas foram examinadas para a presença de sinais do fungo na face abaxial das folhas por meio de microscópio estereoscópico e de luz.

Para obter uma estimativa do número médio de conídios inoculados por meio desta metodologia, dez discos provenientes de folhas de ‘Magali’ infestadas naturalmente foram lavados com 1 mL de água destilada para a contagem dos conídios em câmara de Neubauer. Desta forma, obteve-se a média de conídios por mL e a média de conídios por cm² - correspondente à área do disco.

3.4. Avaliação da germinação de conídios de *L. taurica* na superfície epidérmica de ‘HV12’ e ‘Magali’

Para avaliar a germinação de conídios de *L. taurica* na superfície epidérmica de ‘HV12’ e ‘Magali’, foram usadas seis folhas destacadas de cada variedade, sendo que quatro foram inoculadas com o patógeno e duas foram usadas como controle - não inoculadas. A inoculação foi feita conforme o item (3.3). Uma película de esmalte foi aplicada sobre local de inoculação, na superfície abaxial da folha, a fim de obter uma impressão da superfície epidérmica e

possibilitar a contagem de esporos totais e germinados, 12 e 24 horas após a inoculação. Após completamente secas, as películas foram removidas e coradas com azul de algodão 5% em lactofenol por cerca de 10 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada e montadas em lâminas com lamínulas. Foram amostrados cinco pontos de cada película para a contagem de esporos. Os dados foram submetidos ao teste de proporção para duas populações ($p = 0,05$).

3.5. Histopatologia de tecidos infectados de ‘HV12’ e ‘Magali’

A fim de comparar as alterações anatômicas provocadas por *L. taurica* em folhas destacadas infectadas de ‘HV-12’ e de ‘Magali’, doze folhas de cada variedade foram inoculadas conforme metodologia descrita no item 3.3. As amostras coletadas em cada folha inoculada corresponderam à região de inoculação: dois quadrados de 1 cm² na região mediana da folha que em seguida foram cortados ao meio. Dentre as folhas inoculadas, foram coletadas amostras de quatro delas em cada tempo de estudo: aos cinco, dez e vinte dias após a inoculação, respectivamente. A fixação, o processamento e as análises histoquímicas das amostras foram feitas conforme metodologia descrita no item 3.2. Para visualização das estruturas fúngicas nos tecidos infectados incluídos em historesina, foi usada a dupla coloração constituída de azul de algodão 5% em lactofenol e safranina O aquosa 1%; em que o primeiro corante foi usado por 20 minutos, seguido de lavagem das lâminas com água destilada por três vezes e posteriormente coradas com o segundo corante por 10 segundos (MARQUES, 2012). Algumas secções transversais foram submetidas ao corante de fluorescência WGA Alexafluor 488 (Life Technologies, Carlsbad, CA, United States) por 30 minutos e, em seguida, ao Calcofluor White (TRESE & LOSCHKE, 1990) por 1 minuto; em que o primeiro floresce em verde na presença de quitina, sendo visualizado com filtro 5 L (excitação entre 460 a 500 nm e emissão entre 515 e 485 nm), e o segundo floresce em azul na presença de celulose, sendo visualizado com filtro DAP (excitação entre 325 a 375 nm e emissão entre 515 e 485 nm). As imagens destas lâminas foram realizadas em microscópio Leica DM5500B.

4. RESULTADOS

4.1. Anatomia comparativa dos tecidos sadios das variedades de Pimentão ‘HV12’ e ‘Magali’ por Microscopia de Luz

A anatomia foliar das duas variedades mostrou-se muito semelhante. Em ambos os casos, as folhas são anfi-estomáticas e possuem mesofilo dorsiventral (Figuras 4 e 5 – A). A epiderme é revestida por cutícula delgada, uniseriada, com células variando de elipsoide a ovais com paredes regulares (Figuras 4 e 5 – A); ambas possuem estômatos anomocíticos (Figuras 4 e 5 - B e C) e tricomas glandulares nas duas faces da folha (dados não apresentados). O parênquima paliçádico é constituído de apenas uma camada de células tabulares ou em paliçada e apresentam idioblastos cristalíferos (Figuras 4D e 5D). O parênquima esponjoso possui amplos espaços intercelulares, com bainha do feixe. Em ‘HV12’ as células da epiderme adaxial são maiores que as células da epiderme abaxial, ao passo que em ‘Magali’ esta diferença não foi visualizada. Em relação a morfometria e o número de estômatos, não houve interação entre os fatores variedade e face, ou seja, eles são independentes para a variável número de estômatos, ao nível de 5% de significância. Observando os fatores principais (efeitos simples): existe diferença entre o número médio de estômatos entre as variedades, onde a Resistente apresentou um maior número médio de estômatos (Tabela 1); e existiu diferença entre as faces em relação a mesma variável, onde a face abaxial apresentou um maior número médio de estômatos pelo Teste de Tukey, caracterizando-as como anfi-hipoestomáticas. No entanto, verificamos diferença significativa quanto ao comprimento e a largura média de estômatos, a qual é maior na face abaxial da variedade ‘Magali’ (Tabela 1).

Não verificamos diferença entre as variedades em relação ao número de idioblastos cristalíferos ao nível de 5% de significância (Tabela 2). As duas variedades apresentaram muitas semelhanças quanto aos testes histoquímicos (Figuras 4E - H e 5E - H) para todos os corantes testados: Xylidine ponceau (para proteínas, Figuras 4E e 5E), Aniline blue black (para proteínas, Figuras 4F e 5F) e vermelho de rutênio (para mucilagem ácida, Figuras 4H e 5H). Em relação ao corante Cloreto de zinco iodado (para grãos de amido, Figuras 4G e 5G), observamos que ‘HV12’ apresentou grânulos pequenos, no entanto, ‘Magali’ não reagiu.

Figura 4. Cortes transversais de folhas saudáveis de 'HV12': **A.** Visão geral da lâmina foliar - epiderme unisseriada, mesófilo dorsiventral (Barra – 50 μ m); **B.** Visão frontal da superfície epidérmica adaxial (Barra – 50 μ m); **C.** Visão frontal da superfície epidérmica abaxial (Barra – 50 μ m). Notar que em ambas as superfícies os estômatos são anomocíticos; **D.** Idioblastos cristalíferos no mesófilo - setas (Barra – 200 μ m). Testes histoquímicos: **E.** Xylidine ponceau (Barra – 20 μ m); **F.** Aniline blue black (Barra – 20 μ m); **G.** Cloreto de zinco iodado (Barra – 100 μ m); **H.** Vermelho de rutênio (Barra – 100 μ m). Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Fv – Feixe vascular.

Figura 5. Cortes transversais de folhas saudáveis de 'Magali': **A.** Visão geral da lâmina foliar: epiderme unisseriada, mesofilo dorsiventral (Barra – 20 μm). **B.** Visão frontal da superfície epidérmica adaxial (Barra – 50 μm). **C.** Visão frontal da superfície epidérmica abaxial (Barra – 50 μm). Notar que em ambas as superfícies os estômatos são anomocíticos. **D.** Visão geral dos idioblastos cristalíferos no mesofilo - setas (Barra – 200 μm). Testes histoquímicos: **E.** Xylidine ponceau; **F.** Aniline blue black; **G.** Cloreto de zinco iodado; **H.** Vermelho de rutênio. (Barras E,F,H - 20 μm ; G - 100 μm). Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Fv – Feixe vascular.

Tabela 1. Morfometria e número médio de estômatos na variedade 'HV12' e 'Magali' e nas faces adaxial e abaxial.

Fatores	Estômatos		
	Número médio	Largura média	Comprimento médio
HV12	5,53 a	24,78 b	32,94 b
Magali	4,8 b	26,68 a	34,90 a
Adaxial	3,83 b	24,24 b	33,54 b
Abaxial	6,5 a	27,23 a	34,30 a
CV	22,43%	6,18%	6,14%

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2. Número médio de idioblastos na variedade 'HV12' e 'Magali'.

Variedade	Média de Idioblastos
HV-12	183,4 a
'Magali'	201,2 a
CV	20,14%

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.2. Desenvolvimento de metodologia de infecção e reprodução de *L. taurica* em folhas destacadas *in vitro*

As folhas destacadas da variedade 'Magali' foram mantidas em tudo Falcon com água destilada e permaneceram viáveis por quase 30 dias. Sendo assim, esse longo período possibilitou usá-las em todos os experimentos desta pesquisa, uma vez que os primeiros sinais do fungo são vistos a olho nu dez dias após a inoculação. De acordo com esta metodologia, o disco de inoculação proveniente de folhas naturalmente infestadas (D=2,5cm) (Figura 6A) e o local de inoculação pré-determinado - dois quadrados de 1cm² possibilitaram padronizar a inoculação de esporos a seco (Figura 6B-D). O fotoperíodo de 12 horas de luz seguidas por 12 horas de escuro (Figura 6E) foi o que resultou mais rapidamente na reprodução de sinais e sintomas de oídio visualizados na forma de pontos cloróticos diminutos na face abaxial das folhas quando estas foram observadas contra a luz (Figura 6F e G). Obtivemos uma estimativa média da quantidade de conídios, em torno de 5,04 X 10⁶ esporos/mL ou de 1,02 X 10⁶ esporos/cm² (Figura 6H).

Figura 6. Metodologia de inoculação: **A.** Disco de inoculação; **B.** Local de inoculação na face abaxial da folha sadia da variedade 'Magali' (Dois quadrados de 1 cm²); **C.** Folha inoculada: sinais (estruturas reprodutivas) de *Leveillula taurica* aos vinte dias após a inoculação (Detalhe: pontos cloróticos na folha – setas); **D.** Folhas destacadas inoculadas, acondicionadas em tubo falcon com água destilada; **E.** Câmara úmida após a inoculação – folhas expostas à luz por 12 horas e, nas 12 horas seguintes, ao escuro; **F.** Resultado da inoculação, visto em Microscópio estereoscópico: conidióforos e conídios emergindo pelos estômatos da face abaxial; **G.** Esporulação pulverulenta branca em visão frontal aos vinte dias após inoculação. Barras: F,G – 1000. µm. **H.** Número médio de conídios por disco de inoculação (número de conídios X 10⁵ mL).

4.3. Média de esporos germinados na superfície epidérmica de 'HV12' e 'Magali'

Verificou-se que não houve diferença significativa entre a proporção média de esporos germinados na superfície epidérmica de ambas as variedades estudadas, 'Magali' e 'HV12', em nenhum dos tratamentos - 12 e 24 horas após a inoculação (Figura 7 A, B).

Figura 7. Proporção média de conídios de *Leveillula taurica* germinados na superfície epidérmica de 'HV12' e 'Magali', 12 e 24 horas após a inoculação. **A.** Representação gráfica. **B.** Visão frontal de conídios germinados (tubos germinativos apontados pelas setas) e não germinados. (Barras - 200 μm).

4.4. Histopatologia dos mecanismos de resistência das variedades ‘HV12’ e ‘Magali’ infectados por *L. taurica*

Na variedade HV12 não há manifestação de sintomas tampouco de sinais visíveis a olho nu, decorrentes de infecção por *L. taurica*. No entanto, análises histopatológicas comparativas entre os tecidos sadios (Figura 8A) e infectados (Figura 8B-D) demonstram que aos 5 d.a.i já ocorrem alterações histológicas importantes. A penetração do patógeno se dá através dos estômatos localizados na face abaxial do limbo foliar (Figura 8C). Em seguida o fungo coloniza as células do mesofilo de forma inter e intracelular pela formação de haustórios nas células do parênquima esponjo (Figura 8C-D). Observa-se que nas áreas infectadas as células desse tecido se justapõe e há um maior espessamento parietal (Figura 8D). Aos 10 d.a.i. há o colapso das células epidérmicas, a hiperplasia das células do parênquima esponjoso (Figura 9B e C) e da bainha do feixe vascular (Figura 9D). Nesse período a colonização avança para estas células nas formas inter e intracelular (Figura 9E e F). Aos 20.d.a.i. se observa que o processo de hiperplasia se intensifica, ocasionando um adensamento das células do parênquima esponjoso entorno do patógeno (Figura 10B-C). A ausência dos espaços intercelulares dificulta a visualização de hifas nesses locais, porém análises de fluorescência revelam sua ocorrência, além do acúmulo de celulose nas paredes celulares em contato com o fungo (Figura 10C).

Em ‘Magali’, os sintomas surgem a partir dos 10 d.a.i., e são caracterizados por pontos cloróticos pouco evidentes a olho nu (dados não apresentados). Análises histopatológicas revelam que aos 05 d.a.i. as células epidérmicas próximas aos estômatos iniciam um processo de divisão anticlinal (Figura 11B) e justapõe-se abaixo desses apêndices de forma a isolá-lo das demais células (Figura 11C). Observa-se ainda a presença de hifas nos espaços intercelulares do mesofilo e a formação de haustórios (Figura 11D). Outro fato marcante relacionado a colonização refere-se a presença de hifas no xilema, especificamente nas células do elemento de vaso (Figura 11E).

Aos 05.d.A.i., ao contrário ao observado em ‘HV12’, em ‘Magali’ as células do mesofilo não apresentam adensamento. Contudo aos 10 d.a.i., observa-se uma evidente hipertrofia nas células do parênquima paliçádico e da bainha do feixe vascular (Figura 12B). Nestas regiões hipertrofiadas há o aumento na espessura do limbo foliar e uma redução dos espaços intercelulares, quando comparados aos tecidos sadios. Notamos ainda uma

proliferação acentuada de hifas nas demais regiões (Figura 12C-D). Observa-se que os idioblastos cristalíferos servem como um obstáculo para a movimentação do patógeno nos tecidos infectados (Figura 12E). Aos 20 d.a.i. os sinais são visíveis a olho nú (Figura 13B). Secções transversais comparativas dos tecidos sadios (Figura 13A) e infectados (Figura 13B-E) revelam hipertrofia e considerável hiperplasia celular, especificamente no parênquima esponjoso, comprometendo totalmente a característica do tecido, especialmente em relação aos espaços intercelulares (Figura 13B-C). A visualização de hifas nos espaços intercelulares destas células é eventual (Figura 10D). Nesse estágio, observamos a saída do patógeno pelos estômatos da face adaxial (Figura 13E).

Das análises histoquímicas realizadas, somente as referentes a proteínas e grãos de amidos foram consideradas relevantes (Figuras 14 e 15). Notamos que em ‘HV12’ as gotículas de proteínas junto a parede celular são maiores quando comparadas a ‘Magali’, em todos os tempos, principalmente aos 20 d.a.i. (Figura 14C) Observamos a presença de grãos de amido aos 05 d.a.i. ambas as variedades, no entanto, em ‘HV12’ ocorreu um aumento e a manutenção nos tempos seguintes de inoculação (Figura 15A-C). Em contrapartida, na variedade suscetível houve uma diminuição expressiva aos 10 e 20 d.a.i. (Figura 15E-F)

Figura 8. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* 'HV12' infectados por *Leveillula taurica*, 05 dias após a inoculação. **A.** Secção transversal dos tecidos saudáveis. **B-D.** Secções transversais dos tecidos infectados. **B.** Vista geral do limbo foliar evidenciando o ponto de infecção (destaque). **C.** Observar hifa no estômato e formação de haustório. **D.** Detalhe do destaque em B evidenciando a hipertrofia nas células do parênquima esponjoso espessamento parietal (setas). Observar a diminuição dos espaços intercelulares. **A-D:** Coloração com Azul de Toluidina. Barras: A,B – 100 µm; C – 10 µm; D – 20 µm. Ep – Epiderme; Et – Estômato; Pp – Parênquima paliádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa; Ha – haustório.

Figura 9. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* 'HV12' infectados por *Leveillula taurica*, 10 dias após a inoculação. **A.** Secção transversal dos tecidos saudáveis. **B-F.** Secções transversais dos tecidos infectados. **B.** Vista geral do limbo indicando o ponto de infecção (destaque). **C.** Observar o colapso das células epidérmicas (setas vermelhas) e hiperplasia do parênquima esponjoso (setas pretas). **D.** Detalhe evidenciando a hiperplasia da célula da bainha do feixe vascular (seta). **E-F.** Colonização inter (setas) e intracelular (haustórios) nas células da bainha do feixe vascular. **A-C:** Coloração com Azul de Toluidina **E.** Dupla coloração com Azul de Algodão e Safranina **F.** Reação após teste histoquímico com Vermelho de Rutênio. Barras: A- B – 100 µm; C-F – 10 µm. Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; Ha – haustório.

Figura 10. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* 'HV12' infectados por *Leveillula taurica*, 20 dias após a inoculação. **A.** Secção transversal dos tecidos saudáveis. **B-D.** Secções transversais dos tecidos infectados. **B.** Vista geral do limbo foliar evidenciando o ponto de infecção (destaque). **C.** Detalhe do destaque em B. Observar o adensamento das células do parênquima esponjoso entorno do patógeno. **D.** Análise de fluorescência evidenciando a ocorrência de hifas intercelular (verde) e acúmulo de celulose nas paredes celulares (azul). **A-C:** Coloração com Azul de Toluidina. **D:** Corantes de fluorescência: WGA Alexafluor 488 e Calcofluor White. (Barras: A-B – 100 µm; C-D – 10 µm). Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa.

Figura 11. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* - 'Magali' infectados por *Leveillula taurica*, 05 dias após a inoculação. Seções transversais comparam os tecidos saudáveis. **A.** Seção transversal dos tecidos saudáveis. **B-E.** Seções transversais dos tecidos infectados. **B.** Vista geral do limbo indicando a divisão anticlinal da célula epidérmica (seta). **C.** Células epidérmicas justapostas abaixo do estômato, isolando-o das demais células. **D.** Observar a presença de hifa no espaço intercelular do mesófilo e a formação de haustório. **E.** Observar a presença de hifas no lúmen do elemento de vaso. **A-B:** Coloração com Azul de Toluidina. **C-E.** Dupla coloração com Azul de Algodão e Safranina. Barras: A,B – 50 µm; C,D – 10 µm; E – 20 µm. Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa; Ha – haustório.

Figura 12. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* 'Magali' infectados por *Leveillula taurica*, 10 dias após a inoculação. **A.** Secção transversal dos tecidos saudáveis. **B-E.** Secções transversais dos tecidos infectados. **B.** Vista geral do limbo foliar indicando a proliferação de hifas (setas), a hipertrofia nas células do parênquima paliádico e da bainha do feixe vascular (Destaques). Observar nestas regiões o aumento na espessura do limbo foliar e redução dos espaços intercelulares. **C-E.** Observar a proliferação acentuada de hifas nas demais regiões do mesofilo (setas). **E.** Observar que os idioblastos cristalíferos servem como um obstáculo para a movimentação do fungo (seta). **A,B,D,E:** Coloração com Azul de Toluidina. **C.** Reação após teste histoquímico com Vermelho de Rutênio. Barras: A-C – 100 μ m; D-F – 10 μ m). Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa; Ha – haustório.

Figura 13. Análise histopatológica dos tecidos foliares de *Capsicum annuum* 'Magali' infectados por *Leveillula taurica*, 20 dias após a inoculação. **A.** Secção transversal dos tecidos saudáveis. **B.** Folha infectada: local de inoculação (quadrados). **C-E.** Secções transversais dos tecidos infectados. **C.** Vista geral do limbo foliar indicando o tecido alterado (destaques). Observar a hipertrofia e hiperplasia celular ocasionando a diminuição dos espaços intercelulares. **D.** Detalhe evidenciando hiperplasia (setas). **E.** Observar a difícil visualização de hifa entre células alteradas (seta). **F.** Observar a saída do patógeno pelos estômatos da face adaxial (seta). **A,C,E-F:** Coloração com Azul de Toluidina. **D.** Reação após teste histoquímico com Vermelho de Rutênio. Barras: A-C – 100 µm; D-F – 10 µm). Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; Ha – haustório.

Figura 14. Análises histopatológicas de folhas destacadas de *Capsicum annuum* - inoculadas com *Leveillula taurica*: **A-D.** 5 dias após a inoculação; **B-E.** 10 d.a.i.; **C-F.** 20 d.a.i.. **A-C.** Variedade resistente – 'HV12'. **D-F.** Variedade suscetível – 'Magali'. **A-C.** Seções transversais evidenciando corpos globulares proteicos de pequenas dimensões aos 05 d.a.i. em 'HV12', e o seu aumento progressivo nos demais tempos de inoculação (setas). Observar o evidente aumento nas dimensões dos grânulos aos 20 d.a.i. **D-F.** Seções transversais evidenciando corpúsculos globulares proteicos de pequenas dimensões em 'Magali' em todos os tempos de inoculação (setas). **A-F.** Reação após teste histoquímico com Xylidine Ponceau. Barras A-L: 20 µm. Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliçádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa.

Figura 15. Análises histopatológicas de folhas destacadas de *Capsicum annuum* - inoculadas com *Leveillula taurica*: **A-D.** 5 dias após a inoculação; **B-E.** 10 d.a.i.; **C-F.** 20 d.a.i.. **A-C.** Variedade resistente - 'HV12'. **D-F.** Variedade suscetível - 'Magali'. **A-C.** Secções transversais evidenciando a ocorrência de grãos de amido aos 05 d.a.i. em 'HV12', e seu aumento e manutenção nos tempos seguintes. **D-F.** Secções transversais evidenciando a ocorrência de grãos de amido aos 05 d.a.i. em 'Magali', no entanto, sua ausência nos tempos seguintes. Barras A-F: 100 µm. Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliádico; Pe – Parênquima esponjoso; Fv – Feixe vascular.

5. DISCUSSÃO

São escassos os estudos histopatológicos relativos a mecanismos de resistência de *Capsicum annuum* a *L. taurica*. A maioria dos estudos foca na genética da resistência (SHIFRISS et al., 1992; DAUBEZE et al., 1995; SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003; LIMA et al., 2004; BLAT et al., 2005, 2006), na etiologia da doença (PALTÍ, 1988; GUZMAN-PLAZOLA et al., 2003; KHODAPARAST et al., 20017, 2007) ou ainda descrevem o processo de infecção (ELAD, et al., 2007; ZHENG et al., 2013). Até o momento, não há estudos que tragam informações sobre respostas anatômicas de variedades resistentes, especialmente da variedade 'HV12' que é conhecida como a única fonte de resistência estável em *Capsicum annuum* e de grande importância para os programas de melhoramento genético. Portanto, neste sentido, o presente estudo é pioneiro no objetivo de realizar análises microscópicas da resposta desta variedade comparada à de uma suscetível.

O primeiro passo foi desenvolver uma metodologia que permitisse a reprodução de sintomas e de sinais e a manutenção de isolados *in vitro* em folhas destacadas, cuja vantagem é a praticidade de trabalho em laboratório, dispensando a necessidade de grandes quantidades de inóculo e áreas extensas em casa de vegetação para implantar experimentos, além de possibilitar a padronização de um protocolo de inoculação no qual eliminam-se as variáveis de campo. Esta metodologia é muito importante em estudos de melhoramento genético para levantar informações acerca da existência de raças do patógeno e investigar os níveis de resistência em diferentes variedades da cultura. Sendo assim, nossa metodologia representa um avanço metodológico, pois mostrou-se mais vantajosa e prática em relação ao método descrito por OZER et al. (2018), cuja maior limitação é a rápida oxidação das folhas destacadas decorrente do contato delas com o papel filtro umedecido. A manutenção de folhas em tubos falcon eliminou este problema. O estudo de OZER et al. (2018) consistiu em testar a viabilidade de folhas destacadas em ágar-água e papel filtro umedecido em placas de Petri, além de três formas de inoculação diferentes para a reprodução de sintomas. Outro avanço em relação ao trabalho citado foi a padronização da inoculação por meio dos discos que permitiu estimar a quantidade de conídios pulverizados a seco.

Em seguida, o trabalho analisou possíveis mecanismos de resistência estruturais pré-formados por meio da microscopia de luz pela comparação da anatomia do sistema dérmico de 'HV12' e 'Magali'. Considerando a importância dos estômatos por serem o local de infecção

de *L. taurica*, verificou-se que 'HV12' possui maior número médio de estômatos que 'Magali', ao contrário do relatado por PAZ LIMA et al. (2010). Esses resultados divergentes poderiam ser explicados em função do tipo de coleta e análise dos dados. Os autores coletaram as folhas ao acaso para a contagem e morfometria dos estômatos e analisaram os dados por contrastes ortogonais, ou seja, analisaram 1 fator (variedade) com 2 níveis (faces adaxial e abaxial), não verificando a interação entre variedades na mesma análise. Ao contrário, em nosso estudo a coleta das folhas foi padronizada, sendo sempre a 5ª folha; além disso, a análise estatística dos nossos dados foi em esquema fatorial 2 fatores (variedade) com 2 níveis (face), verificando todas as interações possíveis. Os autores verificaram maior número de estômatos em 'Magali', concluindo que a maior densidade estomática seria um bom indicativo da suscetibilidade. Porém, a mesma relação entre o nível de resistência e o número de estômatos não foi encontrada para os demais genótipos estudados, sugerindo que outros mecanismos de defesa de maior relevância devem estar envolvidos na resistência. Em contrapartida, nosso resultado sugere que a maior densidade de estômatos verificada em 'HV12', ao contrário de favorecer unicamente o patógeno, também pode favorecer a atividade fotossintética desta variedade frente a infecção por *L. taurica*, fornecendo mais "portas de entrada" de CO₂. Sendo assim, este seria um fator de compensação para a planta contra um dos efeitos da infecção causada por oídio, que é a redução na taxa de assimilação de CO₂ devido a uma menor capacidade de fotofosforilação, ou seja, na conversão da energia capturada para a síntese de ATP dependente de luz (MAGYAROSY et al. 1976). No entanto, notamos que a variedade suscetível possui maior comprimento e largura média de estômatos em relação a 'HV12', indicando que maiores aberturas estomatais podem favorecer a entrada do patógeno. Nesse sentido, estudos apontam que a morfologia dos estômatos pode estar relacionada à resistência, como por exemplo no patossistema citros-*Xanthomonas citri* subsp. *citri* em que no genótipo resistente a morfologia das cristas estomatais proporciona aberturas bem pequenas em relação ao genótipo suscetível (GRAHAM et al., 1992). Porém, estudos mais aprofundados com outros genótipos precisam ser realizados para correlacionar estes parâmetros com a resistência.

Ainda em relação ao sistema dérmico, o baixo número de tricomas glandulares presentes nas duas faces da lâmina foliar em ambas as variedades não justificou uma análise mais detalhada desta característica como provável barreira estrutural que pudesse interferir no processo de infecção do fungo. Em contrapartida, plantas que apresentam alta densidade

de tricomas não-glandulares podem dificultar a invasão de patógenos, como ocorre em espécies de *Vitis* contra *Plasmopara vitícola*, os quais são longos, contorcidos e entrelaçados, cobrindo toda a superfície da folha, características importantes para dificultar o acesso do patógeno à cutícula foliar, consequentemente, inibindo o desenvolvimento do tubo germinativo e sua penetração (KORTEKAMP & ZYPRIAN, 1999; NIKS & RUBIALES, 2002).

Na fase inicial do processo de infecção, que é uma fase de grande vulnerabilidade para o fungo, caracterizada pela germinação do conídio, formação do tubo germinativo e sua adesão à superfície do hospedeiro, ocorrem muitas interações do conídio com a superfície epidérmica da folha (CARVER & INGERSON, 1986), cuja estrutura física e composição química, principalmente compreendida por ceras epicuticulares, podem influenciar a germinação e as fases de pré-penetração de oídios como *Erysiphe graminis* (PRATS et al., 2007). No entanto, isso não foi verificado neste estudo, uma vez que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na germinação de esporos entre variedades. Além disso, esse resultado sugere também que, provavelmente, compostos antifúngicos não são excretados na superfície foliar, tanto em 'Magali' quanto 'HV12', para inibir os estágios iniciais da infecção de *L. taurica* em contraposição a outros patossistemas, como por exemplo alguns cultivares de arroz que secretam exometabólitos que afetam a germinação de *Magnaporthe grisea* e alguns cultivares de trigo onde o mesmo fenômeno ocorre contra *Rhynchosporium secalis*.

Diversos estudos analisaram os fatores genéticos envolvidos na resistência da variedade 'HV12'. Trata-se de uma resistência oligogênica, fenotipicamente expressa pela ausência completa de sintomas e sinais no campo e em casa de vegetação (SHIFRISS et al., 1992; DAUBEZE et al., 1995). Outros consideram que a variedade é imune ao fungo (SOUZA & CAFÉ FILHO, 2003). Porém, no presente estudo verificou-se que *L. taurica* é capaz de infectar os tecidos desta variedade, inclusive iniciar o estágio parasítico através da formação de haustórios em células do mesofilo. Há evidências científicas de que em interações compatíveis, fungos biotróficos induzem uma "compatibilidade básica" pela supressão dos mecanismos de defesa da planta. Sendo assim, a falha nessa supressão leva ao insucesso no processo de infecção, considerado um estágio anterior à formação de haustório; também conhecido como resistência pré-haustorial pois não ocorre a formação desta estrutura haustório. A manifestação desta resistência em geral não está associada à ocorrência de células necróticas, mas sim à formação de papila (NIKS & RUBIALES, 1991; 2002). Em contrapartida, há também relatos na literatura cujas células que continham haustórios

morriam, como por exemplo em espécies de trigo contra *Puccinia triticina*, indicando uma defesa pré-haustorial (JACOB, 1989; NIKS & RUBIALES, 1991; SERFLING et al., 2016). No entanto, não visualizamos a morte de células do mesofilo após a formação de haustórios em ambas as variedades. Desta forma, nossos resultados mostram que *L. taurica* é capaz de estabelecer uma relação de “compatibilidade básica” com a variedade ‘HV12’; portanto, a hipótese é que seus genes de defesa atuam na fase pós-haustorial.

De acordo com ZHENG et al. (2013), na interação *C. annuum*-*L. taurica* a formação de papilas não foi capaz de interferir a colonização do fungo. Embora neste estudo não tenha sido possível verifica-las, nossa hipótese é que estas, caso sejam formadas, não são capazes de conter a infecção em ‘HV12’, pois a formação de haustórios foi verificada em todos os tempos de infecção (aos 5, 10 e 20 d.a.i.). Os mesmos autores verificaram que, em uma variedade suscetível, a formação dos primeiros haustórios se deu entre 76 a 96 horas após a inoculação. Nossas imagens mostram que os haustórios possuem características anatômicas semelhantes às relatadas pelos autores supracitados, caracterizados por serem multilobados. Sendo assim, a observação de haustórios aos 20 d.a.i. sugere que outros fatores de resistência devem operar para conter o desenvolvimento do patógeno. Porém, faltam estudos ultraestruturais sobre a interação entre *L. taurica* e a variedade ‘HV12’ que tragam informações detalhadas acerca da formação de papila e caracterização de seu papel na defesa desta variedade.

Verificamos também um grande acúmulo de grânulos proteicos de grandes dimensões no citoplasma principalmente das células do mesofilo. Estes grânulos proteicos provavelmente estão relacionados a defesa, pois os mesmos foram observados em ‘Magali’ porém em dimensões muito pequenas, ao contrário de ‘HV12’, no qual verificamos um aumento progressivo do tamanho destes grânulos entre os 10 d.a.i. e 20 d.a.i.. De acordo com a literatura, as plantas respondem ao ataque dos patógenos com o aumento da expressão de várias proteínas, como as proteínas de reconhecimento (PRRs), Kinases (MAPKs), proteínas relacionadas a defesa (R proteínas) que identificam direta ou indiretamente os efetores do patógeno, entre outras (SHEN et al., 2017). Embora, em nosso estudo não identificamos quais são as proteínas presentes nos grânulos, é plausível supor que os grânulos proteicos maiores possivelmente refletem uma atividade celular mais intensa em virtude da ativação dos mecanismos de defesa desta variedade.

Em ‘Magali’, a infecção por *L. taurica* provocou a hipertrofia de células do parênquima esponjoso e a diminuição dos espaços intercelulares de maneira progressiva entre os 10 d.a.i. até os 20 d.a.i., com previsível impacto na difusão do CO₂ e consequentemente na atividade fotossintética. A hipótese é a de que essas alterações anatômicas e fisiológicas resultam na intensa clorose observada nas folhas desta variedade e a consequente desfolha, sintoma característico de genótipos suscetíveis (BLAT et al., 2005). Outro resultado que corrobora essa hipótese foi a observação em ‘Magali’, já aos 05 d.a.i., da justaposição de células epidérmicas abaixo do estômato, isolando-o das demais células, obstruindo sua abertura e comprometendo também a passagem de CO₂ desde o início da infecção. Em contrapartida, embora ‘HV12’ também apresente células hipertrofiadas aos 20 d.a.i., notamos que os espaços intercelulares do parênquima esponjoso são mais bem preservados, o que pode justificar a retenção foliar e ausência de clorose nesta variedade. Além disso, o maior número de estômatos na face abaxial desta variedade pode estar relacionado a mais “portas de entrada” de CO₂ em relação a ‘Magali’, permitindo maior capacidade de manutenção fotossintética, conforme já discutido.

É bem estabelecido na literatura que patógenos biotróficos alteraram o metabolismo de carboidratos da planta por meio da ação de exoenzimas (ZADOKS & SCHEIN, 1979; BERGER et al., 2007). Em vários patossistemas a dinâmica do amido é alterada, como por exemplo na interação videira – *Plasmopara viticola* (GAMM et al., 2011) com um aumento nos níveis de hexose e de α -amilase, em que ambos os eventos ocorrem juntos. Um resultado relevante em nossa pesquisa foi a observação de grãos de amido aos 05 d.a.i. em ambas as variedades, porém aos 10 e 20 d.a.i. (fase de esporulação) notamos sua ausência nos tecidos da variedade ‘Magali’. Em contrapartida, ‘HV12’ mostrou aumento e manutenção destes durante os mesmos tempos de infecção. Nossos resultados corroboram aos relatos de ABOOD & LOSEL (2003), os quais observaram diminuição na quantidade de amido em folhas de pepino suscetível durante a fase de esporulação de *Podosphaera xanthii*, indicando um desvio de assimilados do hospedeiro para o patógeno. Outra possível hipótese é a de que a diminuição na quantidade de amido na variedade ‘Magali’ pode estar relacionada a alterações provocadas pelo patógeno nos cloroplastos, que impactam diretamente na capacidade fotossintética da planta. Estudos ultraestruturais de ZHENG et al. (2013) corroboram nossa hipótese, pois os autores observaram o alargamento das lamelas granais em células de *C. annuum* infectadas por *L. taurica*. MAGYAROSY et al. (1976) também dão suporte a nossa hipótese pois também

relataram alterações ultraestruturais nos cloroplastos e verificaram uma inibição da fotofosforilação não-cíclica nos cloroplastos decorrente de diminuição no fluxo de elétrons da água para o NADP, levando a uma inibição na assimilação do CO₂ fotossintético. Além disso, ocorre uma mudança nos fotoassimilados a qual pode explicar a capacidade reduzida de plantas infectadas para formar sacarose. No entanto, a variedade resistente deve ter algum mecanismo que impede a absorção de seus fotoassimilados pelo fungo bem como a alteração de seus cloroplastos, conseqüentemente mantendo sua capacidade fotossintética. No entanto, estudos são necessários para esclarecer o que ocorre em nível celular, se há alterações em organelas e quais moléculas são liberadas para a defesa da planta.

O presente estudo refutou a concepção de que a variedade 'HV12' é imune ao patógeno, mostrando que *L. taurica* é capaz de estabelecer uma interação de "compatibilidade básica" com esta variedade. Em adição a isto, como os mecanismos de defesa pré-formados não foram capazes de conter a infecção, seus mecanismos de defesa devem operar na fase pós-haustorial. Por fim, a caracterização histológica dos mecanismos de resistência será útil para futuros estudos moleculares e celulares que identifiquem, principalmente, quais são as proteínas relacionadas a defesa na variedade 'HV12' e que poderão contribuir para a defesa em outras variedades de *Capsicum annuum*.

REFERÊNCIAS

- Associação Brasileira de Sementes e Mudas. Anuário 2014. Disponível:<<http://www.abrasem.com.br/wpcontent/uploads/2013/09/Anu%C3%A1rio-Abrasem-2014.pdf>>. Acesso em: Ago. 2018.
- ABOOD, J. K.; LOSEL, D. M. Changes in carbohydrate composition of cucumber leaves during the development of powdery mildew infection. **Plant Pathology** (2003) 52, 256–265.
- AGROFIT, 2018. Disponível:<http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>.
- ALHARBI, A. A.; ALAWLAQI, M. M. Impact of Some Bacillus spp., Inducer Resistant Chemicals and Cow's skim milk on Management of Pepper Powdery Mildew Disease In Saudi Arabia. **Life Science Journal**, v. 11(4s), 2014.
- ANVISA. O programa de análise de resíduo de agrotóxicos. 2016. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+20132015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8> ANVISA 2016>. Acesso em: Ago. 2018.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3 ed. São Paulo: Ceres, v.1, 1995. 919 p.
- BERGER, S. Sinha, A. K.; Roitsch, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 58, No. 15/16, pp. 4019–4026, 2007. doi:10.1093/jxb/erm298
- BLAT, S. F. Herança da reação de *Capsicum spp.* ao oídio (*Leveillula taurica*(Lev.) Arn.). 2004. 153 f. (Tese doutorado) - USP, ESALQ, Piracicaba.
- BLAT, S. F.; COSTA, C. P. **A cultura do pimentão**. Piracicaba: ESALQ - Série Produtor Rural, n. 34, 2007.
- BLAT, S. F.; COSTA, C. P.; VENCovsky, R.; SALA, F. C. Reação de acessos de pimentão e pimentas ao oídio (*Oidiopsis taurica*). **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.72-75, 2005.
- BOITEUX, L. S., SANTOS, J. R. M.; LOPES, C. A. First record of powdery mildew of sweet pepper *Capsicum annuum* incited by *Leveillula taurica* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n. 304 (Suplement), 1994.

- CABI. *Leveillula taurica*: Distribution Maps of Plant Diseases, Ed. 6, Map 217. 1996. Disponível em:< <https://www.cabi.org/dmpd/abstract/20046500217>>. Acesso em: Ago. 2018.
- CARVER, T. L. W.; INGERSON, S. M. Responses of *Erysiphe graminis* germings to contact with artificial and host surfaces. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.30, p.359-372, 1986.
- CERKAUSKAS, R. F.; BUONASSISI, A. First report of powdery mildew of greenhouse pepper caused by *Leveillula taurica* in British Columbia, Canada. **Plant Disease**, 87(9):1151. 2003.
- CLERK, G. C.; AYESU-OFFEL, E. N. Conidia and conidial germination in *Leveillula taurica* (Lèv.) Arn. **Annals of Botany**, v.31, n.124, p.749-754.
- CORRELL, J. C.; GORDON, T. R.; ELLIOTT, V. J. Host range, specificity, and biometrical measurements of *Leveillula taurica* in California. **Plant Disease**, v.71, p.248-251, 1987.
- CORTELAZZO, A. L.; VIDAL, B. C. Soybean seed proteins: Detection *in situ* and mobilization during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, 14, 1991. 27-33.
- DAMICONE, J.P.; SUTHERLAND, A.J. First report of pepper powdery mildew caused by *Leveillula taurica* in Oklahoma. **Plant Disease**, v.83, p.1072, 1999.
- DAUBEZE, A. M.; HENNART, J. W.; PALLOIX, A. Resistance to *Leveillula taurica* in pepper (*Capsicum annuum*) is oligogenically controlled and stable in Mediterranean regions. CD-ROM. **Plant Breeding**, v.114, v.4, p.327-332, 1995.
- DEHGAHI, R.; SUBRAMANIAM, S.; ZAKARIA, L.; JONIYAS, A.; FIROUZJAH, F. B.; HAGHNAMA, K.; RAZINATAJ, M. Review of Research on Fungal Pathogen Attack and Plant Defense Mechanism against Pathogen. **International Journal of Scientific Research in Agricultural Sciences**, 2(8), p. 197-208, 2015.
- ELAD, Y.; MESSIKA, Y.; BRAND, M.; RAV DAVID, D.; SZTEJNBERG, A. Effect of microclimate on *Leveillula taurica* powdery mildew of sweet pepper. **Phytopathology**, v. 97, p. 813-824, 2007.
- EL-AMMARI, S. S. & KHAN, M. W. *Leveillula taurica* Powdery Mildew on Greenhouse Cucumbers in Libya. **Plant Disease**, v.67, p. 553-555, 1983. Disponível em:<https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1983Articles/PlantDisease67n05_553.pdf>. Acesso em: 15 Dez. 2015.
- FILGUEIRA, F. A. R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. Viçosa, MG: UFV, 2008. 421 p.

- FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v.16, p.92-96, 1968.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, Crops. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em: 22 Fev. 2018.
- FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. A. 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. **The Plant Health Instructor**. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
- FONDEVILLA, S.; RUBIALES, D. Powdery mildew control in pea. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 401–409, 2012.
- GAMM, M., HÉLOIR, M. C., BLIGLNY, R., VAILLANT-GAVEAU, N., TROUVELOT, S., ALCARAZ, G., et al. (2011). Changes in carbohydrate metabolism in *Plasmopara viticola* - infected grapevine leaves. **Mol. Plant Microbe Interact.** V.24, 1061–1073. doi: 10.1094/MPMI-02-11-0040
- GLAWE, D. A.; DU TOIT, L. J.; PELTER, G. Q. First report of powdery mildew on potato caused by *Leveillula taurica* in North America. **Plant Health Progress**, 2004. doi:10.1094/PHP-2004-1214-01-HN.
- GLAWE, D. A.; BARLOW, T.; EGGERS, J. E.; HAMM, P. B. First report of powdery mildew caused by *Leveillula taurica* of field-grown sweet pepper (*Capsicum annuum*) in the Pacific Northwest. **Plant Health Progress**, 2010. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/brief/2010/pepper/>>. Acesso em: 03 Jun. 2015.
- GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T.R.; RILEY, T.D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v. 82, p. 1319-1325. 1992.
- GREGORY, M.; BAAS, P. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. **Journal of Botany**, v.38, p.125-174, 1989.
- GUZMÁN-PLAZOLA, R., A.; FAJARDO-FRANCO, M. L.; COFFEY, M. D. Control of tomato powdery mildew (*Leveillula taurica*) in the Comarca Lagunera, Coahuila State, Mexico, supported by the spray forecast model Tomato. PM. **Crop Protection**, v. 30, p. 1006-1014, 2011.
- HOMMA, Y.; TAKAHASHI, H.; ARIMOTO, Y.; ISHIKAWA, T.; MATSUDA, I.; MISATO, T. Studies on pepper powdery mildew II. Conidiophore emergence and conidial formation on Pepper leaf. **Annual Phytopathology Science**. Japan, v.47: 143-150 (1981).

- HORRIDGE, G. A.; TAMM, S. L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliary motion. **Science**, 163, 1969. 817-818.
- JACOBS, T. Haustorium Formation and Cell Wall Appositions in Susceptible and Partially Resistant Wheat and Barley Seedlings Infected with Wheat Leaf Rust. **Journal of Phytopathology**. 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1989.tb01135.x>
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: W. H. Freeman, 1962. 408 p.
- JO, J.; VENKATESH, J.; HAN, K.; LEE, H. Y.; CHOI, G. J.; LEE, H. J.; CHOI, D.; KANG, B. C. Molecular Mapping of PMR1, a Novel Locus Conferring Resistance to Powdery Mildew in Pepper (*Capsicum annuum*). **Front. Plant Sci.**, v.08, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02090>.
- KARNOVSKY, J. M. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, 27, 1965. 137-138.
- KHODAPARAST, S. A.; NIINOMI, S.; TAKAMATSU, S. Molecular and morphological characterization of *Leveillula* (Ascomycota: Erysiphales) on monocotyledonous plants. **Journal of mycological research**, v. 111, p.673–679, 2007. doi:10.1016/j.mycres.2007.04.003
- KORTEKAMP, A.; ZYPRIAN, E. Leaf Hairs as a Basic Protective Barrier against Downy Mildew of Grape. 1999. **J. Phytopathology**, v.147, p. 453-459, 1999.
- LEHNACKERS, H. & W. KNOGGE, 1990. Cytological studies on the infection of barley cultivars with known resistance genotypes by *Rhynchosporium secalis*. **Can J Bot** 68: 1953–1961.
- LIMA, M. L. P. Resistência genética e aspectos epidemiológicos, fisiológicos e anatômicos da infecção de *Oidiopsis taurica* em *Capsicum* spp. 2002. 130 f. (Tese mestrado) – UnB, Inst. Biociências, Brasília.
- LORENTZ, L. H. Variabilidade da produção de frutos de pimentão em estufa plástica, relacionada com técnicas experimentais. Dissertação (Mestrado em Agronomia), UFSM, Santa Maria, 103 p., 2004. Disponível em: <http://cascavel.ufsm.br/tede/tde_arquivos/4/TDE-2007-12-13T153748Z-1148/Publico/LEANDRO%20LORENTZ.pdf>. Acesso em: 20 Dez. 2015.
- MACHADO, E. L.; DOS SANTOS, P. C. Food contaminated by pesticides: a Brazilian situation overview. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v. 19, n. 2, p. 75-83, 2017.

- MAGYAROSY, A. C.; SCHURMANN, P.; BUCHANAN, B. B. Effect of Powdery Mildew Infection on Photosynthesis by Leaves and Chloroplasts of Sugar Beets. **Plant Physiol.**, v.57, p.486-489, 1976.
- MARCHESAN, C. B. Análise genética de um cruzamento dialélico parcial em pimentão visando caracteres agrônômicos e resistência ao oídio. 2008. 70 p. Dissertação (Mestre em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico, Campinas.
- MARQUELLI, W. A.; SILVA, W. L. C. **Irrigação na cultura do pimentão**. 1.ed. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2012, 20p. (Circular Técnica 101).
- MARQUES, J. P. R. Podridão floral dos citros: histopatologia de *Colletotrichum acutatum*. 2012. 102 f. (Tese doutorado) - USP, ESALQ, Piracicaba.
- MCMANUS, J. F. A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Stain Technology**, 1948. 99-108.
- MOHAMED, Y. F.; BARDIN, M.; NICOT, P. C.; M. PITRAT. Causal Agents of Powdery Mildew of Cucurbits in Sudan. **Plant Disease**, v.79, p. 634-636, 1995.
- MORI, Y.; SATO, Y.; TAKAMATSU, S. Evolutionary analysis of the powdery mildew fungi using nucleotide sequences of the nuclear ribosomal DNA. **Mycologia**, v. 92, p.74-93, 2000.
- NIKS, R. E.; RUBIALES, D. 1991. Prehaustorial and posthaustorial resistance to wheat leaf rust in diploid wheat seedlings. **Phytopathology**, 81: 847–851.
- NIKS, R. E.; RUBIALES, D. 2002. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialized fungal pathogens. **Euphytica**, 124:201-216.
- NOUR, M.A. Studies on *Leveillula taurica* (Lév.) Arn. and other powdery mildews. **Transactions of the British Mycological Society**. v.41, p.17-38, 1958.
- PALTI, T. The Leveillula Mildews. **The Botanical Review**, n. 4, v. 54, 1988.
- OZER, N.; KÜN, A.; İLBI, H. Detached Leaf Test for Evaluation of Resistance to Powdery Mildew in Pepper. **Agri Res & Tech: Open Access J.** v. 14, 2018. DOI: 10.19080/ARTOAJ.2018.14.555923
- PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed.). **Manual de Fitopatologia – Princípios e conceitos**. Piracicaba: Agronômica Ceres. v.1, cap.35, p. 593-636, 2011.
- PASECHNIK, T. D., LAPIKOVA, V. P., AVERYANOV, A. A. Inhibition of pre-penetration development of blast fungus during the infection of resistant rice cultivars. **Eur. J. Plant Pathol.** 103:747-750. 1997.

- PAZ LIMA, M. L. & CAFÉ FILHO, A. C. Seleção de genótipos de *Capsicum* spp. resistentes à infecção por oídio. **Horticultura Brasileira**, 19:287. 2001. (Resumo).
- PAZ LIMA, M. L.; LOPES, C. A.; CAFÉ FILHO, A. C. Estabilidade da Resistência de *Capsicum* spp. ao Oídio em Telado e Casa de Vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 519-525, 2004.
- PAZ LIMA, M.L., LOPES, C.A. & CAFÉ FILHO, A.C. Padrão estomático de *Capsicum* spp. resistentes e suscetíveis a *Oidiopsis haplophylli*. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.25-29, 2010.
- PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B.; CARVALHO, A. D. F. Manejo do oídio em pimentão: um desafio em cultivo protegido. Comunicado Técnico 94, 1ed. - Embrapa Hortaliças, Brasília, 2013.
- PICKERSGILL, B. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. **Euphytica**, v. 96, p.129–133, 1997.
- PRATS, E., LLAMAS, M. J., RUBIALES, D. Characterization of resistance mechanisms to *Erysiphe pisi* in *Medicago truncatula*. **Phytopathology**, 97:1049-1053. 2007.
- Powdery Mildew of Greenhouse Peppers. British Columbia Ministry of Agriculture, 2014. Disponível em:<<http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/peppermildew.htm>>. Acesso em: 03 Jun. 2015.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S.; PAZ-LIMA, M. L.; SILVA, P. P.; LOPES, C. A. New hosts of *Oidiopsis haplophylli* in the Solanaceae Family in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.195-198, 2005a.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. HENZ, G. P. *Oidiopsis haplophylli* (*Leveillula taurica*): um patógeno polífago e amplamente distribuído no Brasil. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005b. 13 p.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S.; PAZ-LIMA, M. L.; SILVA, P. P.; LOPES, C. A. Oídio em espécies do gênero *Allium*, causado por *Oidiopsis taurica*, no Brasil. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, 2004. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-05362004000400018&script=sci_arttext>. Acesso em: 15 Dez. 2015.
- REVEUNI, R.; DOR, G.; REUVENI, M. Local and systemic control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) on pepper plants by foliar spray of mono-potassium phosphate. **Crop Protection**, v. 17, p. 703–709, 1998.
- SERFLING, A.; TEMPLER, S. E.; WINTER, P.; ORDON, F. Microscopic and Molecular Characterization of the Prehaustorial Resistance against Wheat Leaf Rust (*Puccinia*

- triticina) in Einkorn (*Triticum monococcum*). **Frontiers in Plant Science**, 2016. doi: 10.3389/fpls.2016.01668.
- SHEN, Y.; LIU, N.; LI, C.; WANG, X.; XU, X.; CHEN, W.; XING, G.; ZHENG, W. The early response during the interaction of fungal phytopathogen and host plant. **Open Biol.**: 7, 170057, 2017. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.170057>
- SHIFRISS, C.; PILOWSKY, M.; ZACKS, J.M. Resistance to *Leveillula taurica* mildew (=Oidiopsis *taurica*) in *Capsicum annuum*. **Phytoparasitica**, v.20, n.4, p.279-283, 1992.
- SOUZA, V. L.; CAFÉ FILHO, A. C. Efeito do estágio fenológico e da pressão de inóculo na reação de genótipos de *Capsicum* a *Oidiopsis taurica*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.404, 2000. (resumo).
- SOUZA, V. L.; CAFÉ-FILHO, A. C. Resistance to *Leveillula taurica* in genus *Capsicum*. **Plant Pathology**, v.52, p.613-619, 2003.
- SPANU, P. D. & PANSTRUGA, R. Editorial: Biotrophic plant microbe interactions. **Front. Plant Sci.** 8:192. 2017.
- STADNIK, M. J.; RIVERA, M. C. **Oídios**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001.
- STRASBURGUER, E. **Handbook of practical botany**. London: (Transl. W. Hillhouse). George Allen e Company Ltda, 1913.
- TAKAMATSU, S. Molecular phylogeny reveals phenotypic evolution of powdery mildews (*Erysiphales*, *Ascomycota*). **Journal of General Plant Pathology**, v.79, p.218–226, 2013.
- TRESE, A. T.; LOSCHKE, D. C. High contrast resolution of mycelia of pathogenic fungi in corn tissue after staining with calcofluor and destaining with cellulose. **Phytopatology**, Lancaster, v.80, n. 2, p. 196-200. 1990
- ULLASA, B. A.; RAWAL, R. D.; SOHI, H. S.; SINGH, D. P. Reaction of sweet pepper genotypes to anthracnose, cercospora leaf spot, and powdery mildew. **Plant Disease**
- VANDERPLANK, J. C. **Plant Diseases: epidemics and control**. London: Academic Press, 349 p., 1963.
- VIDA, J. B.; ZAMBOLIM, L.; TESSMANN, D. J.; BRANDÃO FILHO, J. U. T.; VERZIGNASSI, J. R.; CAIXETA, M. P. Manejo de doenças de plantas em cultivo protegido. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, p. 355-372, 2004. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/downloads/80459.pdf>>. Acesso em: 23 Dez. 2015.
- WALSH, B. M.; HOOT, S. B. Phylogenetic relationships of capsicum (*solanaceae*) using dna sequences from two noncoding regions: the chloroplast atpb-rbcl spacer region and

nuclear waxy introns. **International Journal of Plant Sciences**, v. 162, n. 6, p.1409–1418, 2001. Disponível em:<

http://www.botany.wisc.edu/courses/botany_940/06CropEvol/papers/Walsh%2601.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2015.

ZADOKS, J. C.; SCHEIN, R. D. (1979). **Epidemiology and Plant Disease Management**. Oxford: Oxford University Press Inc.

ZHENG, Z., NONOMURA, T., BÓKA, K., MATSUDA, Y., VISSER, R. G. F., TOYODA, H., KISS, L., AND BAI, Y. 2013. Detection and quantification of *Leveillula taurica* growth in pepper leaves. **Phytopathology** 103:623-632.

ANEXO

Figura 16. Análises histopatológicas de folhas destacadas de *Capsicum annuum* - inoculadas com *Leveillula taurica*: **A-D.** 5 dias após a inoculação; **B-E.** 10 d.a.i.; **C-F.** 20 d.a.i.. **A-C.** Variedade resistente – 'HV12'. **D-F.** Variedade suscetível – 'Magali'. **A-C.** Secções transversais evidenciando corpos globulares proteicos em 'HV12' em todos os tempos de inoculação (Setas). Observar o evidente aumento nas dimensões dos grânulos aos 20 d.a.i. **D-F.** Secções transversais evidenciando corpúsculos globulares proteicos de pequenas dimensões em 'Magali' em todos os tempos de inoculação (setas). **A-F.** Reação após teste histoquímico com Aniline Blue Black. Barras A-L: 20 µm. Ep – Epiderme; Pp – Parênquima paliádico; Pe – Parênquima esponjoso; Id – Idioblasto cristalífero; Fv – Feixe vascular; H – hifa.