

Histopatologia da Interação *Alternaria solani* e Tomateiros Resistente e Suscetível*

José Cristino A. de Araujo¹ & Kiyoshi Matsuoka²

¹Embrapa Amazônia Ocidental, Cx. Postal 319, CEP 69011-970, Manaus, AM, fax: (92) 621-0322, e-mail: cristino@cpaa.embrapa.br; ²Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000, Viçosa, MG, e-mail: matsuoka@ufv.br

(Aceito para publicação em 12/12/2003)

Autor para correspondência: José Cristino Abreu de Araujo

ARAUJO, J.C.A. & MATSUOKA, K. Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiros resistente e suscetível. Fitopatologia Brasileira 29:268-275. 2004.

RESUMO

Para esclarecer a natureza da resistência à pinta-preta (*Alternaria solani*) em tomateiro resistente (*Lycopersicon hirsutum* var. *glabratum*) cv. CNPH 417 e suscetível (*L. esculentum*) cv. Miller, avaliou-se o processo de infecção, através da histopatologia. Às 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h após as inoculações (h.a.i.) de suspensões de conídios, coletaram-se amostras de tecidos foliares que foram submetidas ao clareamento, à inclusão em resina para confecção de cortes semifinos e ao processamento para microscopia eletrônica de varredura (MEV). Pela análise das amostras clareadas, observou-se que a germinação de conídios completou-se em 24 h.a.i. O crescimento de tubos germinativos foi similar na superfície de ambos os genótipos. Entretanto, os números de apressórios formados, de penetrações nos tecidos e de lesões foram inferiores no genótipo resistente. Com relação

aos eventos pós-penetração, o desenvolvimento inicial de hifas primárias e secundárias, processos posteriores de colonização e desenvolvimento de lesões, bem como a ocorrência de formação de papilas sob apressórios e de reações de hipersensibilidade foram similares em ambos os genótipos. Para a maioria dos aspectos da patogênese de *A. solani*, portanto, o genótipo resistente CNPH 417 comportou-se de modo similar ao suscetível, cv. Miller, exceto quanto aos números de apressórios, de penetrações e de lesões. Assim, ficou evidenciado que a resistência de *L. hirsutum* var. *glabratum* (CNPH 417) a *A. solani* é expressa na fase de pré-penetração, principalmente pelo baixo número de apressórios formados.

Palavras-chave adicionais: *Lycopersicon* spp., microscopia eletrônica de varredura, resistência, formação de apressório.

ABSTRACT

Histopathology of the interaction between *Alternaria solani* and resistant and susceptible tomato plants

Light and scanning electron microscopy (SEM) were used to follow the infection process of *Alternaria solani* on leaves of resistant tomato (*Lycopersicon hirsutum* var. *glabratum*) cv. CNPH 417 and susceptible tomato (*L. esculentum*) cv. Miller. Conidial germination was completed 24 h after inoculation (h.a.i) and growth of germ tubes was similar on the leaf surfaces of both genotypes. However, on the resistant genotype the quantity of appressoria, tissue penetration and lesions were significantly less. The events after penetration were similar in both genotypes and included the initial development of primary and secondary

hyphae, colonization processes and lesion development, frequency of formation of papilla and hypersensitive reactions. Although papilla production and hypersensitive reaction are considered as resistant reactions, they seem to have not contributed to the resistance of *L. hirsutum* var. *glabratum* to *A. solani* in this study. The resistant tomato genotype was similar to the susceptible one according to the aspects of pathogenesis studied, except regarding the number of appressoria, penetrations and lesions. Therefore, it was concluded that the resistance of *L. hirsutum* var. *glabratum* (CNPH 417) to *A. solani* is expressed during the pre-penetration phase of the fungus, mainly due to the low number of appressoria formed.

INTRODUÇÃO

A pinta-preta do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.), causada por *Alternaria solani* (Ellis & Martin) Jones & Grou, ocorre praticamente em todos os lugares do mundo onde o tomate é cultivado (Jones, 1991). O fungo ataca as folhas, hastes e frutos, resultando em desfolhamento das plantas, redução do rendimento e da qualidade dos frutos (Castro *et al.*, 2000).

O emprego de cultivares resistentes constitui a alternativa mais eficiente e segura para o controle da doença, especialmente por reduzir os custos de produção e evitar danos à saúde humana e ao ambiente, devido à redução na aplicação de fungicidas (Shtienberg & Fry, 1990). No entanto, há carência de variedades resistentes com boas características agrônomicas.

Os trabalhos conhecidos envolvendo resistência no patossistema tomateiro-*A. solani* priorizaram a identificação de fontes de resistência e dos fatores genéticos envolvidos e sua aplicação no melhoramento, visando à incorporação de resistência no desenvolvimento de linhagens (Barksdale & Stoner, 1977; Gardner, 1988; Nash & Gardner, 1988; Maiero

* Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa. (2000).

et al., 1990). A resistência especificada por esses estudos é do tipo quantitativa, o que, em parte, foi corroborado pelo estudo da variabilidade do patógeno, realizado por Castro *et al.* (2000), que admitiu a inexistência de raças fisiológicas, devido à ausência de plantas hospedeiras diferenciadoras. Os mecanismos de resistência a agentes patogênicos são amplamente conhecidos em diversos patossistemas (Pascholati & Leite, 1995). Em princípio, esses mecanismos podem se expressar em qualquer estágio durante a patogênese (Rubiales & Niks, 1992). A histologia da interação patógeno-hospedeiro é um recurso eficiente no estudo dos processos de infecção, pois ajuda esclarecer os eventos de pré-penetração, penetração e colonização do hospedeiro, além de possibilitar entender a fisiologia da interação. Também pode ser útil no esclarecimento dos mecanismos de resistência do hospedeiro. Entretanto, a maioria dos trabalhos nessa linha (Saad & Hagedorn, 1969; Allen *et al.*, 1983; Van Dyke & Trigiano, 1987; Aveling *et al.*, 1994), envolvendo espécies de *Alternaria* e seus hospedeiros, restringe-se à morfologia da infecção, sem abordar a interação resistente e suscetível. Alguns aspectos estudados por esses autores foram: a germinação de conídios na superfície do hospedeiro; a formação de apressórios; a penetração e a colonização dos tecidos do hospedeiro. Desconhecem-se, portanto, os mecanismos estruturais e bioquímicos de defesa pré e pós-formados em hospedeiros de *Alternaria* spp. A ocorrência desses mecanismos pode indicar a fase em que se expressa a resistência nas interações patógeno-hospedeiro e patógeno não-hospedeiro. Assim, este trabalho objetivou avaliar, quantitativa e qualitativamente, através de processamentos histológicos e de MEV, os eventos de pré-penetração, penetração e colonização dos tecidos de tomateiros resistente e suscetível a *A. solani* e tentar esclarecer os mecanismos de resistência, pela comparação dos processos de infecção de *A. solani* em tomateiros resistente e suscetível.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Para as inoculações visando aos processamentos histológicos e de microscopia eletrônica de varredura utilizou-se, como tomateiro resistente, o genótipo *Lycopersicon hirsutum* var. *glabratum* (Humb. & Bonpl.) PI 134417, catalogado como CNPH 417 (Castro, 1997) e, como suscetível, o genótipo *L. esculentum* cv. Miller. Os materiais foram cultivados em casa de vegetação e plantados em vasos de plástico com capacidade de 2 l. Utilizou-se como substrato solo misturado com areia e esterco de curral na proporção 3:1:1, que em seguida foi desinfestado com brometo de metila.

Obtenção de isolado de *Alternaria solani* e preparo de inóculo

O isolado de *A. solani* utilizado neste trabalho foi obtido de tomateiros doentes provenientes do campo experimental da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Este isolado esporulava abundantemente, quando armazenado em incubadora a $\pm 25^\circ\text{C}$, no escuro. A produção do inóculo foi feita conforme descrito

por Araujo (2000).

Para a produção de inóculo, faziam-se repicagens a partir de colônias crescidas em tubos de ensaio, com idades entre 15 e 30 dias. Para isso, distribuíam-se em cada placa de Petri cinco a sete fragmentos de meio de cultura com estruturas do fungo. Utilizavam-se três placas com colônias de cinco a oito dias de idade para o preparo de suspensão, a qual era obtida pela adição de alíquotas de 10 ml de água às placas, cujas colônias eram suavemente raspadas com pincel. Esta operação era repetida uma vez, recolhendo-se cada alíquota em frasco Erlenmeyer. Neste processamento utilizava-se água destilada, à qual eram adicionadas duas gotas de Tween 20, para cada 100 ml e a suspensão resultante era ajustada para 5×10^3 conídios/ml. Para isso, distribuíram-se quatro gotas de 10 μl da suspensão homogeneizada sobre lâmina de microscópio. Contagens foram feitas no microscópio comum com objetiva de 10 X, utilizando-se um contador manual. Estimou-se a concentração, tomando-se a média de duas gotas, intermediárias entre as quatro e, utilizando-se a média dos valores obtidos em quatro lâminas, fez-se a estimativa final em esporos/ml. Assim procedeu-se, porque os esporos de *A. solani* apresentavam volume incompatível com os espaços do hemacitômetro, inviabilizando o seu uso.

Inoculação

As inoculações foram feitas pulverizando-se a suspensão de conídios na face adaxial dos folíolos de todas as folhas, com atomizador manual De Vilbiss. A pulverização era feita até que gotas fossem formadas e começassem a escorrer e pingar pelas extremidades dos folíolos. Em seguida, as plantas eram colocadas em câmara de nevoeiro, a 25°C , com fotoperíodo de 12 h. Após 48 h, as plantas eram transferidas para casa de vegetação.

Para as inoculações utilizaram-se tomateiros resistente e suscetível, de 35 a 38 dias de idade. Nos tecidos a serem processados para MEV, a concentração 5×10^3 esporos/ml foi insuficiente para permitir a análise. Utilizou-se, então, a concentração de 10^4 esporos/ml, que se mostrou satisfatória e não alterou a patogênese.

Clareamento de tecidos

Os processamentos de clareamento foram realizados em três ensaios sucessivos. Em cada ensaio coletaram-se amostras de tecido da folha 5 (sentido descendente), de tomateiros resistente e suscetível, às 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h.a.i. A coleta de amostras em tomateiro consistiu em retirar, em cada fase, diversos fragmentos de tecidos, de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$ ($1,0 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$), das regiões basal e mediana de um ou dois folíolos, recolhendo-os em placas de Petri. Do total, recuperavam-se oito fragmentos para clareamento. As amostras, assim obtidas, eram imediatamente submetidas ao clareamento, seguindo a metodologia de Longo *et al.* (1994), modificada como segue: as amostras foram imersas em solução de cloral hidratado saturado ($2,5 \text{ g/ml}$ de água) e deixadas à temperatura ambiente. Após três ou quatro dias, as amostras foram transferidas para lactofenol. A montagem final das amostras de

tomateiro era feita dispondo-se segmentos de tecido em lâmina de microscópio, as quais eram coradas com azul-de-trypan 0,05% em lactofenol.

Avaliaram-se qualitativa e quantitativamente, nos genótipos de tomateiro, germinação de conídios, formação de apressórios, penetrações, lesões, colonização, formação de papilas e reações de hipersensibilidade. Não foram quantificados os estômatos, nem mensuradas as células epidérmicas nas superfícies foliares desses materiais. Foram analisados quatro segmentos de tecido, por ensaio e por fase de amostragem, de cada um dos genótipos de tomateiro, totalizando 72 segmentos de cada genótipo. A formação de apressórios, as penetrações e as lesões foram quantificadas em 48 segmentos de cada genótipo de tomateiro, referentes às amostragens feitas em 12, 24, 36 e 48 h.a.i. (12 por amostragem e por genótipo). Entretanto, tais quantificações não foram analisadas estatisticamente, considerando que Castro (1997) e Castro *et al.* (2000) realizaram exaustivas análises de variáveis relacionadas com a resistência, entre as quais números de lesões/área, que evidenciaram o CNPH 417 como o mais estável e o mais resistente dentre onze genótipos de tomateiros resistentes e suscetíveis a *A. solani*. Também não foram quantificadas as papilas e as reações de hipersensibilidade. As amostras de tomateiro foram examinadas no microscópio de contraste diferencial de interferência, e no microscópio de luz transmitida, equipado com lâmpada HBO de 200 W. Utilizaram-se filtro de excitação BG12 e filtro de barreira de 41 a 47, para fluorescência.

Inclusão em resina

Para a confecção de cortes semifinos, utilizou-se material incluído em resina Spurr. A inclusão foi realizada seguindo-se dois métodos. Adotou-se primeiramente o método utilizado por Matsuoka (1988), em que foram coletados fragmentos de tecido, 24 e 48 h.a.i., da folha 5 de tomateiros resistente e suscetível, com aproximadamente 2 mm², sobre os quais se pingavam gotas do fixador glutaraldeído 3%, tamponado com cacodilato de sódio a 0,05 M, pH 6,9. Os fragmentos de tecido foram imediatamente recolhidos em recipientes de vidro de 2,5 ml, contendo o mesmo fixador tamponado, e deixados em geladeira a 4 °C por uma noite. Após a fixação foram lavados em tampão cacodilato, pós-fixados por 4 h, a 4 °C, em tetróxido de ósmio, a 1%. Os fragmentos de tecido foram novamente lavados e, em seguida, desidratados em série alcóolica (30, 50, 70, 80, 95 e 100%); eles foram submetidos à inclusão em resina Spurr, através da imersão nas misturas de álcool + resina (1:1) durante 30 min, álcool + resina (1:3) por mais de 30 min, resina pura por quatro h e resina pura por 12 h. Finalmente, os fragmentos foram incluídos em resina pura usando-se formas de silicone, e levados para polimerização a 70 °C, por 24 h. O material, assim embocado, foi seccionado a uma espessura de 1,0 µm, usando-se ultramicrótomo (Sorwall MT2-B) equipado com navalha de vidro, e as seções obtidas foram coradas com azul-de-toluidina O (bórax p.a. 0,1 g; toluidina O 0,1 g; 100 ml de água destilada). A montagem das lâminas foi feita em óleo de imersão, e as seções foram observadas em microscópio de luz.

No segundo método, utilizaram-se amostras de tecido

já clareadas, porque os materiais assim embocados podiam ser previamente visualizados ao microscópio, de modo que facilitassem o seccionamento nos pontos de interesse. Essas amostras tinham aproximadamente 0,5 cm², previamente coradas com azul-de-trypan. Antes da inclusão em resina, as amostras eram observadas ao microscópio de luz e recortadas em fragmentos menores, de aproximadamente 6,0 mm² (4,0 mm x 1,5 mm), selecionando-se aqueles que continham conídio(s), com ou sem apressórios, em locais de penetração e desenvolvimento de lesões. Esses fragmentos foram, então, desidratados e incluídos em resina, conforme descrito na metodologia anterior. As seções obtidas foram analisadas como descrito anteriormente.

Microscopia eletrônica de varredura

Para observações ao microscópio eletrônico de varredura, oito amostras de tecidos de cada genótipo de tomateiro foram preparadas 24 h após a inoculação, as quais mediam aproximadamente 16 mm² (4 x 4 mm). As amostras foram submersas em fixador Trump's 4F:1G, preparado como segue: 86 ml de água destilada + 10 ml de formaldeído (37-40%) + 4 ml de glutaraldeído (25%) + 1,16 g de NaH₂PO₄.H₂O + 0,27 g de NaOH. Nas etapas subsequentes de lavagem e desidratação seguiu-se a mesma metodologia utilizada no processo de inclusão em resina Spurr. Após a desidratação, os fragmentos de tecido foram submetidos à secagem ao ponto crítico, usando-se o aparelho "Critical Point Dryer" (Balzers, modelo CPD020). Os fragmentos foram montados sobre suporte de metal e coberto com um filme de ouro, por meio de pulverização catódica. O material foi examinado ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo JSM-T200), operando em 10 kV. Todo o processamento anteriormente descrito foi repetido duas vezes. A análise dos materiais incluídos em resina e processados para MEV foi apenas morfológica, não havendo quantificação de eventos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos materiais clareados às 12, 24, 36 e 48 h.a.i. mostrou que os números de lesões por amostra em *L. hirsutum* foram sempre inferiores aos de *L. esculentum*. Em 48 h.a.i., quando praticamente estava definida a quantidade de lesões a serem formadas nos dois materiais, obtiveram-se 18,0 e 6,0 lesões/cm² em *L. esculentum* e *L. hirsutum*, respectivamente (dados baseados em análises de 12 amostras de tecido clareados, de cada genótipo). Estes dados estão de acordo com os obtidos por Castro *et al.* (2000), que classificou o *L. hirsutum* var. *glabratum* como o mais estável fenotipicamente e o mais resistente dentre 11 genótipos de tomateiro estudados.

Os conídios de *A. solani* germinaram igualmente sobre a superfície foliar de ambos os genótipos de tomateiro, com a emissão de tubos germinativos em células situadas na base, na metade ou na extremidade dos conídios. A maioria dos conídios germinou até 6 h.a.i.; com 12 h.a.i., observou-se 98,9% e 97,1% de germinação dos conídios nos materiais suscetível e resistente, respectivamente. Os números de tubos germinativos/conídio em

12 h.a.i. foram 3,4 e 3,8 nos tomateiros resistente e suscetível, respectivamente, e atingiram o máximo de 4,4, em ambos os materiais, em 24 h.a.i., com a maioria dos conídios produzindo dois a cinco tubos germinativos.

Os tubos germinativos atingiram tamanhos variados (Figura 1). Os menores geralmente terminavam em dilatações tipo apressório (Figura 1D), enquanto os demais (a maioria) cresceram e formaram hifas na superfície de ambos os genótipos. Esses dados pouco divergem do observado em outros patossistemas envolvendo *Alternaria* spp. (Everts & Lacy, 1987; Van Dyke & Trigano, 1987; Aveling *et al.*, 1994; McRoberts & Lennard, 1996). Além disso, *Alternaria* spp. germinam sobre a folhagem de plantas não-hospedeiras tão bem quanto em cultivares suscetíveis e resistentes (Rotem, 1994). Por exemplo, conídios de *A. brassicae* (Berk.) Sacc., *A. brassicicola* (Schw.) Wiltshire, *A. raphani* Groves & Skolko e *A. solani* germinaram quase na mesma taxa sobre as folhas de hospedeiros e não-hospedeiros, que incluíam colza (*Brassica napus* L.), papoula (*Papaver rhoeas* L.), tomate e trigo (*Triticum aestivum* L.) (McRoberts & Lennard, 1996). Não se observou orientação do crescimento dos tubos germinativos para locais específicos da superfície foliar de ambos os genótipos de tomateiro. Resultados análogos foram observados em sistemas como *A. porri* (Ellis) Cif.-cebola (Everts & Lacy, 1987; Aveling *et al.*, 1994) e *A. brassicae*, *A. brassicicola* e *A. raphani*-brassicáceas (McRoberts & Lennard, 1996). Segundo Wynn (1976), a orientação do crescimento de tubos germinativos pode ser influenciada por características físicas da superfície do hospedeiro. Entretanto, neste trabalho, não foram percebidas diferenças morfológicas entre as superfícies foliares dos dois genótipos de tomateiro, as quais pareceram essencialmente similares aos microscópios de luz e eletrônico de varredura.

Em ambos os genótipos de tomateiro os apressórios caracterizaram-se como dilatações predominantemente formadas lateralmente nas hifas (Figura 1-A e B), ou nas extremidades de tubos germinativos curtos (Figura 1-D). Os apressórios eram arredondados ou claviformes, com septo nem sempre aparente. Apesar da aparente ausência de orientação do crescimento dos tubos germinativos, a maioria dos apressórios formou-se nas junções de células epidérmicas (Figuras 1 e 2), embora um número considerável tenha se formado sobre o complexo estomatal (Figura 2-B, C e F). A predominância de apressórios formados nas junções de células epidérmicas ocorre comumente em outras espécies de *Alternaria* e outros gêneros fúngicos (Murray & Maxwell, 1975; Gold & Mendgen, 1984; Aveling *et al.*, 1994; McRoberts & Lennard, 1996). No entanto, essa tendência geral de os patógenos formarem apressórios nas junções de células, independentemente da espécie vegetal, pode significar que os estímulos para a formação de apressórios nessas espécies sejam características gerais da topografia foliar e das flutuações de nutrientes no microambiente das junções celulares.

Os números de apressórios por amostra no tomateiro resistente foram inferiores aos do tomateiro suscetível em todas as fases de amostragem (Tabela 1), sendo que a grande maioria formou-se entre 12 e 36 h.a.i. A forte influência do genótipo de

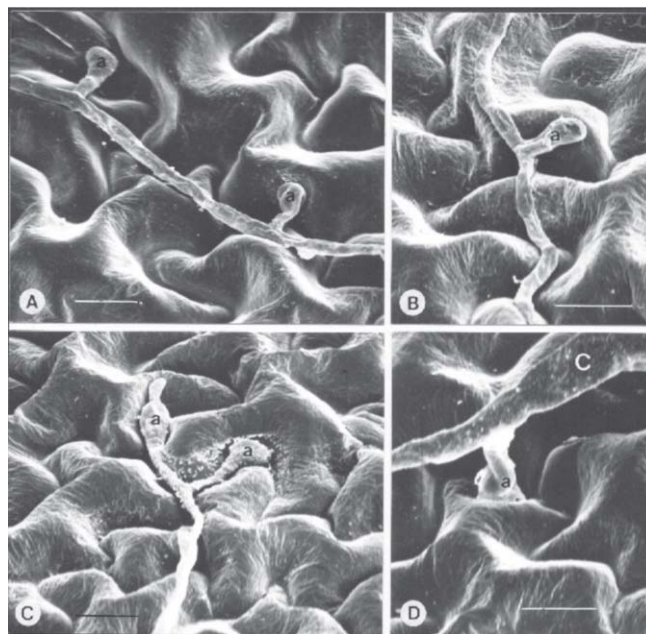


FIG. 1 - Eletrofotomicrografias de varredura de apressórios de *Alternaria solani* formados em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) suscetível, 24 h após a inoculação. A: apressórios laterais próximos, numa mesma hifa, sobre célula epidérmica e complexo estomatal; B: apressório lateral sobre célula epidérmica; C: apressórios em ramificação na extremidade de hifa, sobre junção de paredes de células epidérmicas vizinhas; D: apressório na extremidade de tubo germinativo curto. Abreviações: a = apressórios; C = conídio. Barra: 10 μ m.

tomateiro na formação de apressórios de *A. solani* parece ser um fato incomum entre *Alternaria* spp., apesar da escassez de estudos sobre o comportamento dessas espécies em interações com mais de um hospedeiro. McRoberts & Lennard (1996) estudaram o crescimento de *A. brassicae*, *A. brassicicola* e *A. raphani* em oito espécies de crucíferas hospedeiras e *A. solani*, *A. alternata* (Fr.) Keissler, *A. brassicae*, *A. brassicicola* e *A. raphani*, em colza, tomate, papoula e trigo (representando hospedeiras e não-hospedeiras) e constataram que, pelas taxas globais de formação de apressórios, ocorreram diferenças interespecíficas entre os patógenos, mas apenas pequena variação para espécies individuais de *Alternaria* spp. sobre as diferentes plantas, hospedeiras ou não.

De acordo com a quantificação de penetrações/amostra de tecido (Tabela 1), a maioria ocorreu em 24 h.a.i. em ambos os tomateiros, mas ainda continuaram até 48 h.a.i. Os números de penetrações no material resistente foram inferiores aos do material suscetível, em todas as fases de amostragem. Nos dois genótipos as penetrações quase sempre ocorreram após a formação de apressórios (Figuras 2 e 3), exceto em alguns casos, ocorridas pelo ostíolo (Figura 2A). Aproximadamente dois terços das penetrações envolveram o complexo estomatal, em que o apressório posicionou-se sobre células-guarda (Figura 3-A1 e B1), ou sobre a junção entre células-guarda e célula subsidiária (Figura 2-B, C e F). Nas penetrações em células epidérmicas, os apressórios geralmente posicionaram-se sobre

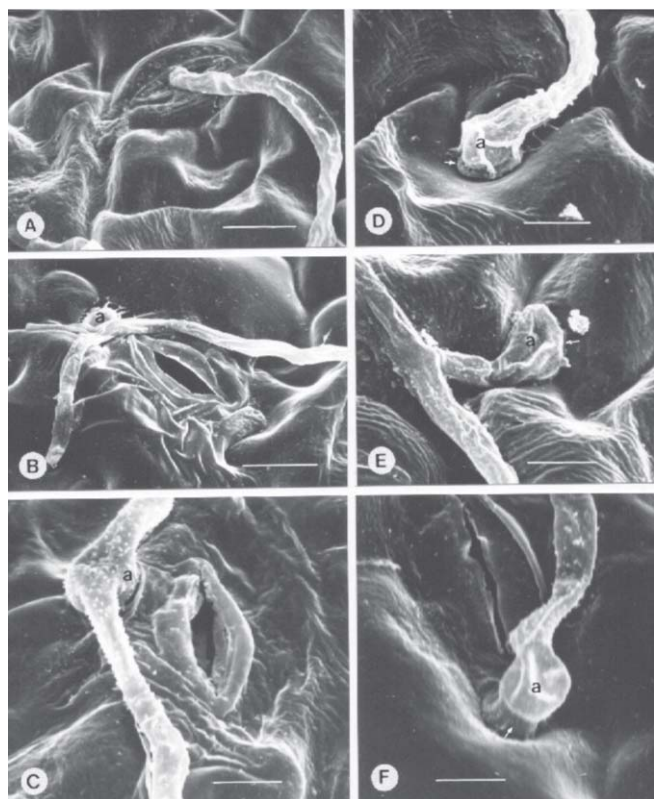


FIG. 2 - Eletrofotomicrografias de varredura da penetração de *Alternaria solani* em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) suscetível, 24 h após a inoculação. A: penetração pelo ostíolo, sem apressório; B, C e F: penetração pelo complexo estomatal, a partir de apressórios (a) entre células-guarda e células subsidiárias. Notar aspecto colapsado das células-guarda; D e E: penetração direta a partir de apressórios (a) na junção de células epidérmicas. Barras: 10 µm, em A e B; 5µm, em C, D, E e F.

a junção entre duas células (Figura 2-D e E), ou a hifa de infecção penetrou entre as paredes das duas células vizinhas (Figura 4).

A exemplo do observado neste trabalho, a penetração por *Alternaria* spp. comumente ocorre a partir de apressórios, comprovando o caráter essencial dessa estrutura para a patogênese (Allen *et al.*, 1983; Van Dyke & Trigiano, 1987; Aveling *et al.*, 1994; McRoberts & Lennard, 1996). Pode-se inferir, portanto, que os números de penetrações por *A. solani* no genótipo resistente foram consequência direta do menor número de apressórios formados nesse genótipo. Da mesma forma, o menor número de lesões no material resistente foi consequência direta do menor número de penetrações. Assim, os dados referentes a esses eventos, apresentados na Tabela 1, confirmam o 'CNPH 417' como resistente e o 'Miller' como suscetível.

Em amostras clareadas, também se observou a ocorrência de modificações de parede celular, como papilas e halos, sob apressórios, tanto no material resistente quanto no suscetível (Figura 5). Tais estruturas, no entanto, foram mais numerosas no material suscetível, em aparente conformidade com o maior número de apressórios formados nesse material. Verificou-se,

TABELA 1 - Números médios de apressórios, de penetrações e de lesões/amostra por *Alternaria solani*, de tecidos foliares clareados de tomateiros suscetível (*Lycopersicon esculentum*) (S) e resistente (*L. hirsutum*) (R)

H.A.I ^a	Apressórios		Penetrações		Lesões	
	S	R	S	R	S	R
12	30,92 ^c	5,08	4,17	0,50	0,58	0,17
24	36,83	10,42	5,33	1,92	3,92	1,00
36 ^b	24,44	8,92	1,17	0,58	6,50	1,92
48 ^b	19,42	10,08	1,00	0,17	9,00	3,00

^aH.A.I = h após as inoculações

^bAs contagens de apressórios e de penetrações em amostras de 36 e 48 h.a.i. foram feitas em parte dos confídios de cada amostra, evitando-se as áreas lesionadas.

^cMédias de 12 replicações.

ainda, a formação de apressórios múltiplos em células epidérmicas próximas ou sobre uma mesma célula, sob os quais freqüentemente formaram-se papilas (Figura 5C). É possível que um eventual bloqueio da penetração pela papila seja o estímulo para o crescimento do tubo germinativo e a formação de novos apressórios. Observações análogas foram feitas em cultivares de trigo resistente e suscetível a *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoem. (Dushnicky *et al.*, 1996). As papilas, formadas na interação de fungos fitopatogênicos-plantas, podem

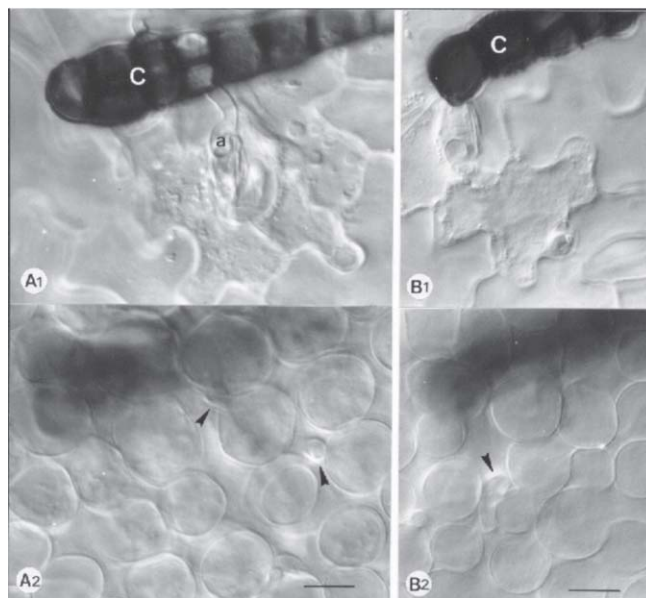


FIG. 3 - Fotomicrografias de tecidos foliares clareados, mostrando penetração em complexo estomatal e colonização inicial de *Alternaria solani* em tomateiros suscetível (*Lycopersicon esculentum*) (A1 e A2) e resistente (*L. hirsutum*) (B1 e B2), 12 h.a.i. A1 e B1: penetração em célula-guarda; A2 e B2: hifas secundárias intercelulares no parênquima paliçádico (setas). As fotografias identificadas pelas mesmas letras correspondem ao mesmo local, porém em diferentes planos focais. Abreviações: a = apressório; C = conídio. Barras: 10 µm.

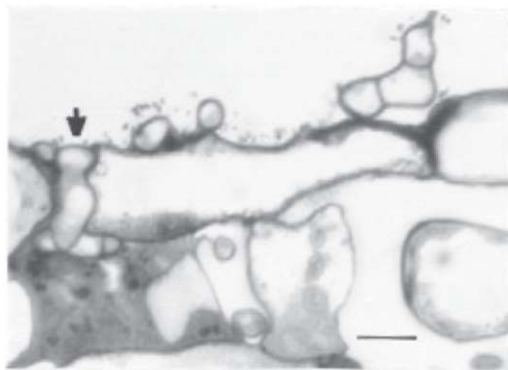


FIG. 4 - Fotomicrografia de corte semi-fino, de material fixado e incluído em resina, mostrando a penetração de *Alternaria solani* entre células epidérmicas (seta) de tomateiro suscetível (*Lycopersicon esculentum*), 48 h.a.i. Barra: 10 µm.

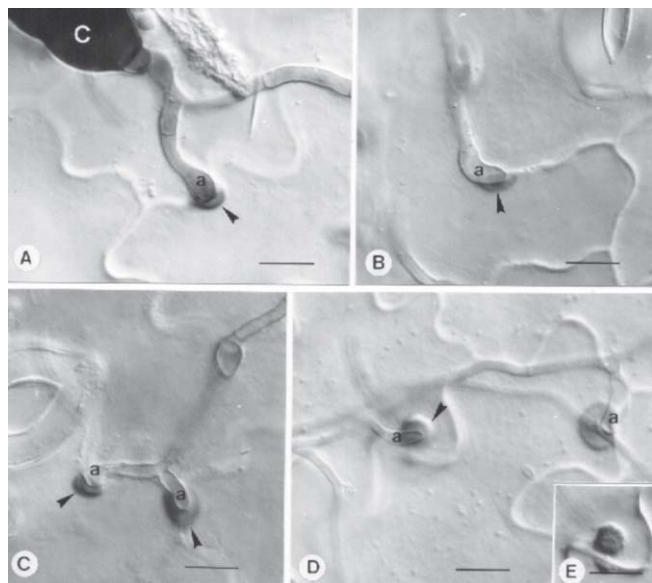


FIG. 5 - Fotomicrografias de tecidos foliares clareados, de tomateiro suscetível (*Lycopersicon esculentum*), mostrando papilas em paredes de células epidérmicas, sob apressórios (setas), em diferentes intervalos de tempo (h.a.i.): A: papila, 36 h.a.i.; B: papila, 24 h.a.i.; C: papila, 48 h.a.i.; D: papila e halo, 72 h.a.i.; E: papila indicada pela seta em D, em plano focal inferior. Abreviações: a = apressório; C = conídio. Barras: 10 µm.

contribuir para a resistência, ao restringir o avanço de hifas de infecção, havendo um consenso de que a sua formação é um fator de resistência (Aist, 1983). A velocidade de formação e a composição das papilas, como eventuais fatores determinantes na eficiência em deter o patógeno, não foram averiguadas neste estudo. Entretanto, a maior frequência de papilas no material suscetível torna secundária a importância daqueles fatores na resistência do tomateiro a *A. solani* e sugere que a formação dessas estruturas não é uma reação específica à resistência.

Neste trabalho, as reações celulares à penetração por *A. solani* foram além da formação de papilas e halos. Assim,

verificou-se que em diversos locais de penetração, principalmente em 48 h.a.i., uma ou mais células apresentavam o conteúdo celular alterado, de aspecto granuloso e coloração marrom (Figura 6). Ao mesmo tempo, as hifas formadas após a penetração ficavam restritas à célula invadida, sem atingir o mesófilo. Tais reações, semelhantes a hipersensibilidade, foram frequentemente observadas tanto no material resistente quanto no suscetível, indicando que, a exemplo das papilas e halos, não contribuíram para a expressão da resistência de *L. hirsutum* var. *glabratum* a *A. solani*.

Os eventos iniciais da colonização por *A. solani* ocorreram conforme o modo de penetração do fungo nos tecidos. Assim, após a penetração diretamente em célula epidérmica, em célula subsidiária ou em célula-guarda, desenvolveu-se uma hifa primária espessa, que se ramificou em hifas secundárias delgadas intracelulares. Estas hifas atravessaram a parede inferior da célula e cresceram para o mesófilo, intercelularmente (Figura 3). Quando a penetração ocorreu entre células adjacentes, o fungo pareceu desenvolver uma hifa de infecção espessa entre as paredes laterais das células, ramificando-se ao atingir o tecido paliçádico e avançando intercelularmente ou intracelularmente (Figura 4). Após a penetração pelo poro

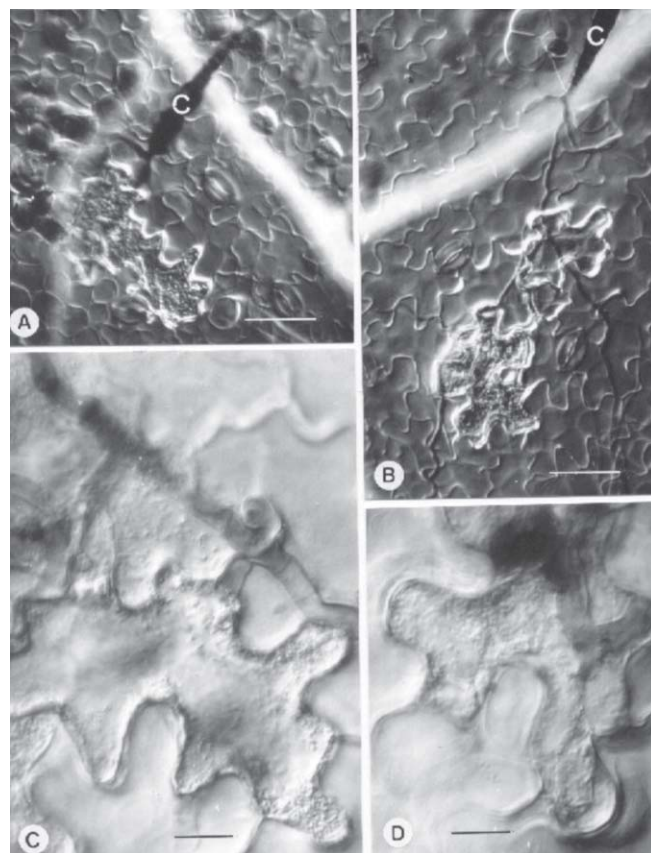


FIG. 6 - Fotomicrografias de tecidos foliares clareados de tomateiros suscetível (*Lycopersicon esculentum*) (A e C) e resistente (*L. hirsutum*) (B e D), 48 h.a.i., mostrando reação de células epidérmicas à penetração por *Alternaria solani*. Abreviação: C = conídio. Barras: 50 µm, em A e B; 10 µm, em C e D.

estomatal, formou-se uma hifa primária espessa na cavidade subestomatal, a qual, em seguida, ramificou-se em hifas secundárias delgadas, que avançaram para o tecido paliçádico, intercelularmente. Este processo de colonização foi similar em ambos os genótipos de tomateiro e pouco divergiu do observado em folhas de cebola (*Allium cepae* L.) colonizadas por *A. porri* (Aveling *et al.*, 1994) e em folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) colonizadas por *A. tenuis* Ness (Saad & Hagedorn, 1969). Nestes dois casos, os diâmetros das hifas primárias aparentemente foram maiores que os de *A. solani* em tomateiros, uma vez que os autores classificaram-nas como hifas primárias bulbosas.

A fase posterior de colonização, correspondente à expansão de lesões e necrose dos tecidos, não foi avaliada. Aparentemente, a natureza fisiológica do processo foi similar nos dois genótipos, como observado na fase inicial. Resultados obtidos por Castro (1997) fortalecem esta constatação, em que, para a taxa de expansão de lesões, o 'CNPH 417' foi incluído entre os maiores valores obtidos, comportando-se como suscetível. Entretanto, para as variáveis percentagem de tecido foliar necrosado, taxa de progresso da doença e área abaixo da curva de progresso da doença, Castro (1997) registrou os menores valores para o 'CNPH 417', mostrando uma alta correlação entre essas variáveis e o número de lesões/área e caracterizando este material como resistente.

A análise do processo de infecção, portanto, evidenciou a formação de um menor número de apressórios como o fator determinante na resistência do 'CNPH 417' a *A. solani*. Entretanto, a elucidação desse fenômeno não foi explorada neste trabalho, mas os fatores envolvidos na indução da formação de apressórios têm sido amplamente estudados em outros patossistemas.

Emmett & Parbery (1975) sugeriram a separação de patógenos fúngicos formadores de apressórios em dois grandes grupos: aqueles que requerem uma ou mais condições específicas para a formação de apressórios e aqueles que formam apressórios em resposta a um conjunto mais geral de estímulos. O agente da ferrugem do feijoeiro [*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger], cujo sinal para a diferenciação do apressório Hoch *et al.* (1987) demonstraram ser a altura de 0,5 µm da abertura estomatal, parece pertencer ao primeiro grupo. Enquanto os estudos das interações patógeno-hospedeiro e patógeno-não hospedeiro, realizados por McRoberts & Lennard (1996), sugerem que *Alternaria* spp. recaem no segundo grupo. Entretanto, as diferenças nos números de apressórios entre os genótipos de tomateiro, neste trabalho, requerem cautela neste tipo de interpretação. A aparente similaridade entre as superfícies foliares das duas cultivares de tomateiro, observadas aos microscópios de luz e eletrônico de varredura, sugere que a baixa formação de apressórios no resistente pode ser causada por um caráter particular, possivelmente químico. Ao mesmo tempo, a indução da formação de apressórios, no suscetível, pode ser exercida por um conjunto mais geral de estímulos, conforme sugerido por Emmett & Parbery (1975). Pesquisas realizadas nos últimos trinta anos identificaram sinais químicos e, ou físicos (topográficos) envolvidos na indução da formação

de apressórios. Neste contexto, destacam-se os estudos sobre a composição e aspectos nutricionais da superfície do hospedeiro e de substratos artificiais, incluindo sinais químicos como K⁺, Ca⁺⁺, sacarose, compostos fenólicos e extratos vegetais, entre outros, que produziram informações úteis sobre a gênese de apressórios em diferentes patossistemas (Hoch *et al.*, 1987; Clay *et al.*, 1994; Rubiales & Niks 1996). Numa abordagem física, o uso de réplicas artificiais inertes da superfície foliar ou superfícies inertes lisas, modificadas por ranhuras ou elevações microscópicas, também foram utilizadas com sucesso por alguns autores (Wynn, 1976; Hoch *et al.*, 1987; Clay *et al.*, 1994). Assim, o conhecimento acumulado nesses anos propicia boas perspectivas para o esclarecimento do fenômeno observado neste estudo, a partir do qual medidas efetivas de controle da pinta preta e de outras doenças fúngicas poderão ser preconizadas.

Em suma, para a maioria dos aspectos da patogênese por *A. solani*, observados neste estudo, o genótipo resistente de tomateiro teve comportamento similar ao suscetível, exceto quanto aos números de apressórios, de penetrações e de lesões. Portanto, o evento crucial para a expressão da resistência de *L. hirsutum* var. *glabratum* a *A. solani* ocorre na fase de pré-penetração, especificamente em razão do baixo número de apressórios formados na superfície foliar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIST, J.R. Structural responses as resistance mechanisms. In: Bailey, J.A.; Deverall, B.J. (Eds.) The dynamics of host defense. New York: Academic Press. 1983. pp.33-37.
- ALLEN, S.J., BROWN, J.F. & KICHMAN, J.K. The infection process, sporulation and survival of *Alternaria helianthi* on sunflower. *Annals of Applied Biology* 102:413-419. 1983.
- ARAUJO, J.C.A. Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiros resistente e suscetível. (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 2000.
- AVELING, T.A.S., SNYMAN, H.G. & RIJKENBERG, F.H.J. Morphology of infection of onion leaves by *Alternaria porri*. *Canadian Journal of Botany* 72:1164-1170. 1994.
- BARKSDALE, T.H. & STONER, A.K. A study of the inheritance of tomato early blight. *Plant Disease* 61:63-65. 1977.
- CASTRO, M.E.A. Resistência do tomateiro (*Lycopersicon* spp.) à pinta-preta (*Alternaria solani* (Ellis & Martin) Jones & Grout). (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1997.
- CASTRO, M.E.A., ZAMBOLIM, L., CHAVES, G.M., CRUZ, C.D. & MATSUOKA, K. Variabilidade patogênica de *Alternaria solani*, agente causal da pinta-preta do tomateiro. *Summa Phytopatologica* 8:24-28. 2000.
- CLAY, R.P., ENKERLY, J. & FULLER, M.S. Induction and formation of *Cochliobolus sativus* appressoria. *Protoplasma* 178:34-47. 1994.
- DUSHNICKY, L.G., BALLANCE, G.M., SUMMER, M.J. & MACGREGOR, A.W. Penetration and infection of susceptible and resistant wheat cultivars by necrosis toxin-producing isolate of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 18:392-402. 1996.

- EMMETT, R.W. & PARBERY, D.G. Appressoria. Annual Review of Phytopathology 13:147-167. 1975.
- EVERTS, K.L. & LACY, M.L. Conidial germination, appressorial formation and infection of *Alternaria porri* on onion leaves. Phytopathology 77:1761. 1987.
- GARDNER, R.G. NC EBR 1 and NC EBR 2 early blight resistant tomato breeding lines. HortScience 24:779-781. 1988.
- GOLD, R.E. & MENDGEN, K. Cytology of basidiospore germination, penetration and early colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Uromyces appendiculatus* var. *appendiculatus*. Canadian Journal of Botany 62:1989-2002. 1984.
- HOCH, H.C., STAPLES, R.C. & BOURETT, T. Chemically induced appressoria in *Uromyces appendiculatus* are formed aerially, apart from the substrate. Mycologia 79:418-424. 1987.
- HOCH, H.C., STAPLES, R.C., WHITEHEAD, B., COMEAU, J. & WOLF, E.D. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. Science 235:1659-1662. 1987.
- JONES, J.P. Early blight. In: Jones, J.B., Jones, J.P. & Stall, R.E. (Eds.). Compendium of Tomato Diseases. St. Paul. APS Press. 1991. pp.13-14.
- LONGO, N., NALDINI, B., DROVANDI, F., GONNELLI, T. & TANI, G. Penetration and early colonization in basidiospore-derived infection of *Melampsora pulcherrima* (Bub.) Maire on *Mercurialis annua* L. Caryologia 47:207-222. 1994.
- MAIERO, M., NG, T.J. & BARKSDALE, T.H. Genetic resistance to early blight in tomato breeding lines. HortScience 25:344-346. 1990.
- MATSUOKA, K. Resistência de *Capsicum annum* L. a *Phytophthora capsici* Leonian. (Tese de Doutorado). Viçosa. Universidade Federal de Viçosa. 1988.
- McROBERTS, N. & LENNARD, J.H. Pathogen behavior and plant cell reactions in interactions between *Alternaria* species and leaves of host and nonhost plants. Plant Pathology 45:742-752. 1996.
- MURRAY, G.M. & MAXWELL, D.P. Penetration of *Zea mays* by *Helminthosporium carbonum*. Canadian Journal of Botany 53:2872-2883. 1975.
- NASH, A.F. & GARDNER, R.G. Tomato early blight resistance in a breeding line derived from *Lycopersicon hirsutum* PI 126445. Plant Disease 72:206-209. 1988.
- PASCHOLATI, S.F. & LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A., Kimati, H. & Amorim, L. (Eds.). Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. v.1. 1995. pp.417-453.
- ROTEM, J. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology and pathogenicity. St. Paul: APS Press, 1994.
- RUBIALES, D. & NIKS, R.E. Low appressorium formation by rust fungi on *Hordeum chilense* lines. Phytopathology 82:1007-1012. 1992.
- RUBIALES, D. & NIKS, R.E. Avoidance of rust infection by some genotypes of *Hordeum chilense* due to their relative inability to induce the formation of appressoria. Physiological and Molecular Plant Pathology 49:89-101. 1996.
- SAAD, S. & HAGEDORN, D.J. Host-parasite relations in the initiation and development of bean *Alternaria* leaf spot. Phytopathology 59:1773-1774. 1969.
- SHTIENBERG, D. & FRY, W.E. Influence of host resistance and crop rotation on appearance of potato early blight. Plant Disease 74:849-852. 1990.
- VAN DYKE, C.G. & TRIGIANO, R.N. Light and scanning electron microscopy of the interaction of the biocontrol fungus *Alternaria cassiae* with sicklepod (*Cassia obtusifolia*). Canadian Journal of Plant Pathology 9:230-235. 1987.
- WYNN, W.K. Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: response to a surface contact stimulus. Phytopathology 66:136-146. 1976.