

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

ARTHUR RODRIGUES

**ESTUDO DA ANATOMIA FOLIAR DE *Capsicum annuum* var. *annuum* EM UM  
GENÓTIPO SUSCETÍVEL E OUTRO RESISTENTE A *Xanthomonas euvesicatoria*  
COM ADIÇÃO DE METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

JULHO DE 2018

ARTHUR RODRIGUES

**ESTUDO DA ANATOMIA FOLIAR DE *Capsicum annuum* var. *annuum* EM UM  
GENÓTIPO SUSCETÍVEL E OUTRO RESISTENTE A *Xanthomonas euvesicatoria*  
COM ADIÇÃO DE METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS**

“Monografia apresentada ao Centro de  
Ciência e Tecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte das exigências para  
obtenção do título de Licenciado em  
Química.”

Orientador: M. Sc. Aminthia Pombo Sudré da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO DE 2018

ESTUDO DA ANATOMIA FOLIAR DE *Capsicum annuum* var. *annuum* EM UM  
GENÓTIPO SUSCETÍVEL E OUTRO RESISTENTE A *Xanthomonas euvesicatoria*  
COM ADIÇÃO DE METAIS POTENCIALMENTE TÓXICOS

ARTHUR RODRIGUES

“Monografia apresentada ao Centro de  
Ciência e Tecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy  
Ribeiro, como parte das exigências para  
obtenção do título de Licenciado em  
Química.”

Aprovado em 20 de julho de 2018

Comissão Examinadora:

---

Prof. Sergio Luis Cardoso (D. Sc., Ciências) - LCQUI/UENF

---

Letícia Oliveira da Rocha (D. Sc., Parasitologia) – LBCT/UENF

---

Prof. Fábio Lopes Olivares (D. Sc., Microbiologia do Solo) - LBCT/UENF

---

Aminthia Pombo Sudré da Silva (M. Sc. Ciências Naturais) - LCQUI/UENF  
(Orientadora)

*Dedico esta monografia a Deus,  
a minha família,  
aos professores e amigos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar;

A minha esposa e filhas (Sângela, Esther e Ana) pela paciência e apoio durante todo esse período;

Aos meus pais (José Arthur, Elizabeth);

Aos meus irmãos (Gunther e Gusthavo);

Aos familiares em geral;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por ter disponibilizado o espaço para que o trabalho fosse desenvolvido;

A minha orientadora e co-orientador (Aminthia Pombo Sudré da Silva e Fábio Lopes Olivares) pela dedicação e disponibilidade profissional necessária em me auxiliar a alcançar os objetivos do trabalho;

A prof<sup>a</sup>. Rosana Rodrigues do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF por ceder as sementes dos genótipos utilizados;

Ao prof. Renato Augusto DaMatta, chefe do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF, pelo apoio material para a realização dos experimentos;

Aos professores do curso de Ciências Biológicas e da Licenciatura em Química pela dedicação profissional e excelência no ensino, em especial ao prof. Sergio Luis Cardoso e prof<sup>a</sup>. Maura da Cunha;

A prof<sup>a</sup>. Maria Luisa López e prof. Claudio Andres Retamal (*in memoriam*) pela dedicação institucional, pelo carinho e ensinamentos de equilíbrio profissional e social;

Ao prof. Jorge Petreski pelos conselhos;

Ao Mestre Saulo Pireda e a aluna Amanda Ferreira pela disponibilidade e apoio técnico na utilização do Microscópio de Varredura;

Aos amigos do curso de Licenciatura em Química pelo convívio acadêmico;

A Valéria pelo empenho e pronto atendimento;

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT), Adrianinha, Bia, Darli, Giovana, Luciana, Márcia Adriana e Rose pelo apoio especializado;

Aos amigos Noil, Ricardo Teixeira e Ricardo Guerreiro pela descontração e bate papo agradável.

## RESUMO

RODRIGUES, Arthur. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Julho, 2018. Estudo da Anatomia Foliar de *Capsicum annuum* var. *annuum* em um genótipo suscetível e outro resistente a *Xanthomonas euvesicatoria* com Adição de metais potencialmente tóxicos. Orientadora: Aminthia Pombo Subré da Silva.

As pimentas são amplamente utilizadas, como condimentos, na fabricação do spray de pimenta (capsaicinoides), na indústria cosmética e medicinal, como planta ornamental, entre outros. A espécie *Capsicum annuum* é a mais cultivada no mundo. O cultivo mais intenso propicia o aumento de doenças e dentre estas destaca-se a mancha bacteriana em *Capsicum* spp. Compreender o patossistema *Capsicum* x *Xanthomonas euvesicatoria* e sua interação com os minerais pode auxiliar no manejo da cultura. Este trabalho visa observar as possíveis diferenças na anatomia foliar de dois genótipos de *Capsicum annuum* var. *annuum*: um suscetível (L11) e um resistente (UENF 1381) a *Xanthomonas euvesicatoria*, com auxílio de técnicas microscópicas. Para isso foi instalado um experimento em delineamento experimental inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2<sup>2</sup> em casa de vegetação com quatro tratamentos: a) L11 Hoagland; b) L11 Hoagland com acréscimo de metais; c) UENF 1381 Hoagland; c) UENF 1381 Hoagland com acréscimo de metais. Os metais acrescentados a solução de Hoagland foram Cd, Co, Cr VI, Li e Pb. As folhas foram coletadas no auge da frutificação. Em seguida foram processadas para microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Através destas técnicas de microscopia foi possível comparar a anatomia entre os genótipos suscetíveis e resistentes a *Xanthomonas*, e os tratamentos com as soluções nutritivas. Os dados indicaram diferenças significativas na anatomia e ultraestrutura entre os genótipos e entre as soluções nutritivas. Influências como o aumento da frequência de estômatos, alteração cuticular, espessuras de parênquimas e disposição e estrutura dos cloroplastos foram fatores para sugestão do aumento de suscetibilidade ou de resistência de acordo com o genótipo e solução nutritiva.

**Palavras-chaves:** Pimenta, Resistência doença, Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Óptica.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Arthur. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; July, 2018. Study of the leaf anatomy of *Capsicum annuum* var. *annuum* in a susceptible genotype and another resistant to *Xanthomonas euvesicatoria* with addition of potentially toxic metals. Advisor: Aminthia Pombo Sudré da Silva.

Peppers are widely used, such as condiments, in the manufacture of pepper spray (capsaicinoids), in the cosmetic and medicinal industry, as ornamental plant, among others. *Capsicum annuum* is the most cultivated species in the world. The more intense cultivation propitiates the increase of diseases and among these the bacterial spot in *Capsicum* spp stands out. Understanding the pathosystem *Capsicum-Xanthomonas euvesicatoria* and its interaction with minerals may help in the management of the culture. This work aims to observe the possible differences in the leaf anatomy of two genotypes of *Capsicum annuum* var. *annuum*: one susceptible (L11) and one resistant (UENF 1381) to *Xanthomonas euvesicatoria*, with the aid of microscopic techniques. For this, a completely randomized experimental design was set up in a greenhouse scheme with four treatments: a) L11 Hoagland; b) L11 Hoagland with addition of metals; c) UENF 1381 Hoagland; c) UENF 1381 Hoagland with addition of metals. The metals added to the Hoagland solution were Cd, Co, Cr VI, Li and Pb. The leaves were collected at the peak of fruiting. They were then processed for optical microscopy (OM), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Through these microscopy techniques it was possible to compare the anatomy between susceptible and resistant genotypes to *Xanthomonas*, and treatments with nutrient solutions. The data indicated significant differences in anatomy and ultrastructure between genotypes and between nutrient solutions. Influences such as increased stomatal frequency, cuticular alteration, parenchyma thickness, and chloroplast arrangement and structure were factors to suggest increased susceptibility or resistance according to genotype and nutrient solution.

**Key-words:** Pepper, Disease resistance, Scanning Electron Microscopy, Transmission Electron Microscopy, Optical Microscopy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Origem das espécies de <i>Capsicum</i> spp. nas Américas. ....	12
<b>Figura 2.</b> <i>Capsicum annuum</i> . ....	13
<b>Figura 3.</b> Mancha bacteriana .....	14
<b>Figura 4.</b> Anatomia da folha. ....	26
<b>Figura 5.</b> Amostra. ....	31
<b>Figura 6.</b> Microscopia óptica da lâmina foliar de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> em seção transversal. ....	36
<b>Figura 7.</b> Microscopia óptica da lâmina foliar de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> em seção transversal no tratamento com Hoagland. ....	37
<b>Figura 8.</b> Microscopia óptica da lâmina foliar de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> em seção transversal no tratamento com Hoagland e Metais. ....	38
<b>Figura 9.</b> Microscopia óptica da lâmina foliar do genótipo suscetível (L11) de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> em seção transversal da face adaxial e abaxial. ....	39
<b>Figura 10.</b> Microscopia óptica da lâmina foliar do genótipo resistente (UENF 1381) de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> em seção transversal da face adaxial e abaxial. ....	40
<b>Figura 11.</b> Micrografia eletrônica de varredura da epiderme da folha de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> no tratamento com Hoagland. ....	42
<b>Figura 12.</b> Micrografia eletrônica de varredura da epiderme da folha de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> no tratamento com Hoagland e Metais. ....	43
<b>Figura 13.</b> Micrografia eletrônica de varredura da epiderme da folha do genótipo suscetível (L11) de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> . ....	44
<b>Figura 14.</b> Micrografia eletrônica de varredura da epiderme da folha do genótipo resistente (UENF 1381) de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> . ....	45
<b>Figura 15.</b> Micrografia eletrônica de transmissão dos cloroplastos dos genótipos de <i>Capsicum annuum</i> var. <i>annuum</i> e seus tratamentos. ....	46



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Solução de Hoagland e Arnon (1950) modificada. ....	33
<b>Tabela 2.</b> Quantidades dos elementos químicos fornecidos até o momento da coleta de folhas via solução nutritiva e elementos detectados na areia utilizada como substrato. ....	34
<b>Tabela 3.</b> Comparação efeito genótipo com Hoagland. ....	41
<b>Tabela 4.</b> Comparação efeito genótipo com Hoagland e Metais. ....	41
<b>Tabela 5.</b> Comparação efeito tratamento no genótipo suscetível (L11). ....	41
<b>Tabela 6.</b> Comparação efeito tratamento no genótipo resistente (UENF 1381). ....	41
<b>Tabela 7.</b> Absorção dos nutrientes pela planta. ....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>μmol</b>	Micromol ( $10^{-6}$ mol)
<b>C. annum</b>	Capsicum annum
<b>CEAGESP</b>	Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo
<b>FAO/STAT</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>h</b>	Hora
<b>Hab</b>	Habitantes
<b>IA</b>	Ácido indol acético
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>MET</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>min</b>	Minuto
<b>mmol</b>	Milimol ( $10^{-3}$ mol)
<b>mmol/dm<sup>3</sup></b>	Milimol de carga por decímetro cúbico
<b>MO</b>	Microscopia Óptica
<b>pg</b>	Picograma
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>ppm</b>	Partes por milhão
<b>S<sup>0</sup></b>	Enxofre elementar
<b>SHU</b>	Scoville High Unit
<b>Ton</b>	Tonelada
<b>UR</b>	Umidade relativa
<b>X. euvesicatoria</b>	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Mecanismos de defesa. ....	15
<b>Quadro 2.</b> Macronutrientes essenciais para vegetais. ....	17
<b>Quadro 3.</b> Micronutrientes essenciais para vegetais. ....	19

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	05
<b>ABSTRACT</b> .....	06
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	07
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	08
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	09
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1. Origem de <i>Capsicum</i> spp .....	12
1.2. Importância das pimentas .....	13
1.3. Mancha bacteriana .....	14
1.4. Mecanismos de defesa de plantas .....	14
1.5. Nutrientes essenciais .....	15
1.6. Elementos não essenciais .....	20
1.7. Absorção de nutrientes .....	21
1.8. Elementos potencialmente tóxicos e sua mobilidade em plantas .....	21
1.9. Anatomia Foliar .....	22
1.10. Microscopia como método para análise da anatomia foliar .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b>	
2.1. Objetivo geral .....	29
2.2. Objetivos específicos .....	29
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	
3.1. As amostras .....	30
3.2. Coleta das amostras .....	30
3.3. Preparação das amostras .....	31
3.3.1. Microscopia Óptica .....	32
3.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	32
3.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Origem de *Capsicum* spp.

Membro da família Solanaceae, o gênero *Capsicum* teve sua origem na América do Sul com a espécie *C. chacoense* (Hunziker, 2001). Após a dispersão para regiões com diferentes condições edafoclimáticas, sofreram o processo de especiação, onde atualmente estão descritas mais de 35 espécies, sendo cinco consideradas domesticadas (*C. chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum*, *C. pubescens* e *C. annuum*), estando em um processo de crescente dependência mútua entre planta, homem e animal (Moscone et al., 2007) (Figura 1). A espécie *C. annuum* é a mais domesticada e cultivada pelo homem (García et al., 2016). Os pimentões pertencem a esta espécie, como também muitas outras pimentas com ou sem pungência (Neto et al., 2014) (Figuras 2a e 2b).

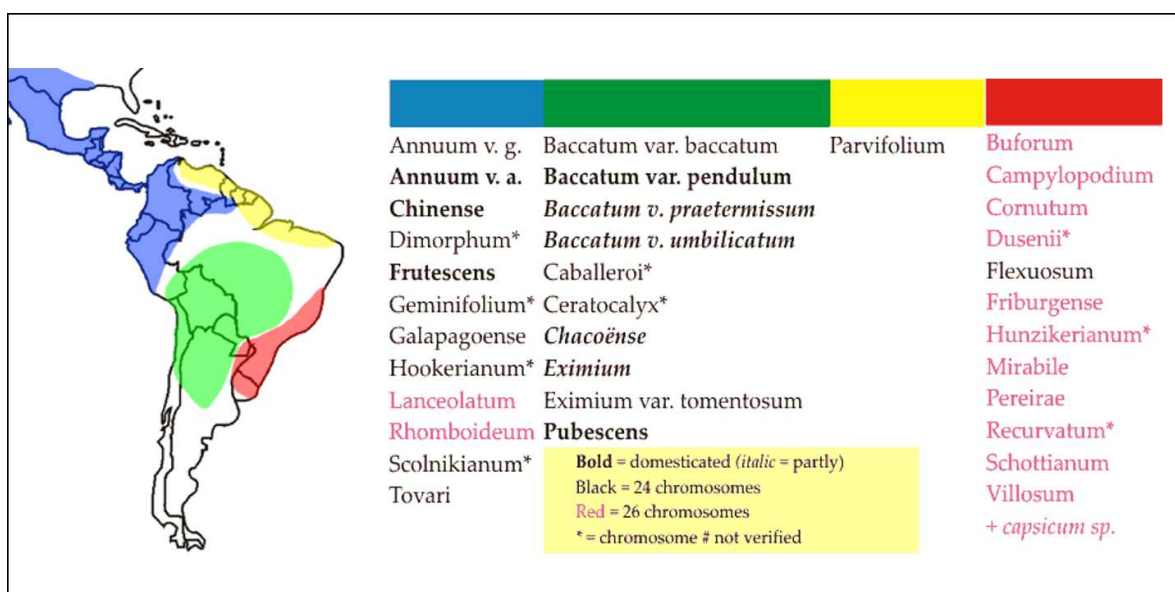


Figura 1. Origem das espécies de *Capsicum* spp. nas Américas. Fonte: <https://www.fataligourmet.net/>

A pungência neste gênero é devido a presença de capsaicinoides (alcaloides pungentes), substância cuja presença é altamente influenciada por luminosidade, temperatura e adubação. Esses alcaloides só são produzidos em frutos do gênero *Capsicum* (Othman et al., 2011) (Figura 2c).



Figura 2. *Capsicum annuum*. a) pimentão; b) pimentas e; c) molécula de capsaicina.

## 1.2. Importância das pimentas

As pimentas possuem em sua composição antioxidantes naturais como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), carotenoides (Braga et al., 2013), além de capsaicinoides que são importantes nas propriedades organolépticas e farmacêuticas (Nwokem et al., 2010), fenóis (Aguiar et al., 2016), e muitos minerais como cálcio, fósforo, ferro, potássio e magnésio, cujas concentrações variam conforme o genótipo e o grau de maturação (Wahocho et al., 2016).

A pimenta é comercializada principalmente como páprica (pó de pimentão ou de pimenta), molho ou *in natura*. Além da culinária, também é utilizada na indústria de fármacos (odontologia e medicina) (Pinto et al., 2013), cosmética (Bashair et al., 2016) e na indústria armamentista na composição dos *sprays* de pimenta (capsaicina) (Pitschmann e Hon, 2016).

O cultivo de pimentão (*C. annuum*) tem aumentado consideravelmente nos últimos anos no Brasil devido, principalmente, ao uso de técnicas que elevam a produtividade e, conseqüentemente, aumentam a rentabilidade da cultura. Dentre as técnicas, o uso de genótipos resistentes a doenças (Bento et al., 2017) e a adubação mineral em hidroponia em ambiente protegido tem se mostrado altamente responsivo, proporcionando retorno satisfatório ao produtor (Pinheiro et al., 2014).

Apenas no CEAGESP, em 2016, foram comercializadas 5.298 Ton de pimenta (cambuci, vermelha e verde americana), sendo este produto o 58º mais comercializado nesta companhia (CEAGESP, 2018).

Concomitantemente com o aumento da produção e da produtividade no Brasil, há um aumento da incidência de pragas e doenças bióticas. Uma das doenças é a mancha bacteriana que causa danos econômicos por menor produtividade e perda de qualidade dos frutos (EMBRAPA, 2007).

### 1.3. Mancha bacteriana

A mancha bacteriana é uma das principais doenças bacterianas que tem como agentes causais, a *Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*, que afetam diversas culturas, como o tomate, a pimenta, o jiló, a berinjela e o pimentão. É caracterizada por manchas amareladas seguida de necrose, se expandindo normalmente das extremidades para o centro das folhas (Roach et al., 2018). Isso se dá por seu mecanismo de ação iniciar pela entrada da bactéria através dos estômatos, hidatódios, lenticelas colonizando o mesofilo (Stall et al., 2009) (Figura 3).

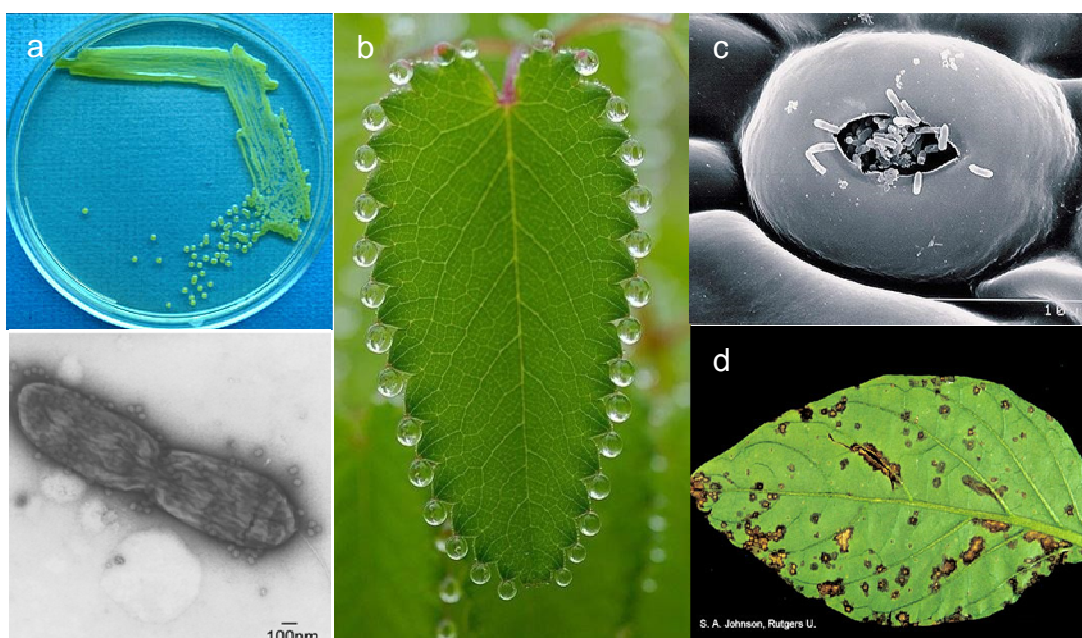


Figura 3. Mancha bacteriana. a) Bactéria *Xanthomonas euvesicatoria*; b) hidatódios; c) estômato com *Xanthomonas citri*; d) sintoma em folha de *Capsicum annum*. Fonte: Potnis et al. (2015)

### 1.4. Mecanismos de defesa de plantas

As plantas não se locomovem, portanto com a evolução das mesmas foi necessário buscar alternativas de defesa contra fatores bióticos e/ou abióticos, englobando defesas bioquímicas e estruturais (Soares e Machado, 2007).

Os mecanismos de defesa contra patógenos podem ser subdivididos em estruturais e bioquímicos. Os mecanismos estruturais são aqueles que formam uma barreira física à penetração e/ou colonização do patógeno, e já os bioquímicos são aqueles que relacionam substâncias com a inibição do desenvolvimento do

patógeno ou a condições adversas que mude a expressão da doença. Ambos os mecanismos podem ser pré-formados ou pós-formados pela tentativa de entrada do patógeno no tecido vegetal (Schwan-Estrada et al., 2008), alguns exemplos estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Mecanismos de defesa (Pascholati e Leite, 1994; Taiz e Zeiger, 2013).

Pré-formados (passivos ou constitutivos)	Estruturais	cutícula, tricomas, estômatos, lenticelas, fibras/vasos condutores
	Bioquímicos	fenóis, saponinas, alcaloides, glicosídicos, lactonas insaturadas, terpenoides, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, quitinases, $\beta$ -1,3 glucanases, ácido clorogênico, ácido protocatecólico e catecol, ácidos hidrocarboxílicos e enzimas de defesa vegetal (Stangarlin et al., 2011)
Pós-formados (ativos ou induzíveis)	Estruturais	reorganização do citoplasma (Stangarlin et al., 2011), papilas, halos, lignificação, glicoproteínas ricas nos aminoácidos hidroxiprolina (HRGP) e glicina (GRP), camadas de cortiça, camadas de abscisão, tiloses
	Bioquímicos	fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio – ERO (ROS, em inglês), esta última geralmente está ligada a reação de hipersensibilidade

Para a síntese das substâncias envolvidas com mecanismos de defesa envolvendo espécies reativas de oxigênio existe um complexo aparato enzimático. Segundo Gupta (2001) os micronutrientes essenciais, exceto cloro e boro, são imprescindíveis para o funcionamento deste aparato enzimático.

### 1.5. Nutrientes essenciais

O elemento essencial é o elemento mineral que a planta é incapaz de completar o seu ciclo de vida em sua ausência e que sua função não pode ser substituída por nenhum outro elemento, estando diretamente envolvido no metabolismo de planta (Marschner, 2012). A combinação dos elementos essenciais,



na presença de água e energia solar é a condição necessária para o bom desenvolvimento das plantas (Taiz e Zeiger, 2013).

Dezessete elementos da tabela periódica são considerados essenciais para plantas superiores: C, H, O, N, P, K, Mg, Ca, S, Mn, Fe, Cu, Zn, Mo, Ni, B e Cl. Os elementos hidrogênio e oxigênio são obtidos da água. O carbono é obtido do dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), enquanto os demais são obtidos do solo (Epstein, 1999). Eles podem ser classificados conforme sua concentração no tecido vegetal como macronutrientes e micronutrientes. Os macros em uma demanda maior para a planta (Quadro 2) e os micros são necessários em pequenos teores, mas cruciais para a regulação enzimática (Quadro 3) (Taiz e Zeiger, 2013).

As mudanças enzimáticas e/ou produção de metabólitos envolvidos na resposta a fatores ambientais podem afetar a suscetibilidade de plantas a estresses ambientais (Hajiboland, 2012). As diferentes respostas químicas são altamente influenciadas por nutrientes minerais, como por exemplo, o manganês, que influencia diretamente a produção de cumarinas, ligninas envolvidas na resistência a doenças (Kirkby e Römheld, 2007).

O nitrogênio pode influenciar nas respostas de severidade das doenças foliares (Bartz et al., 1979), a forma como o nitrogênio está disponível (amônio ou nitrato) para o hospedeiro ou patógeno afeta mais a severidade ou resistência do que a quantidade do elemento (Agrios, 1980). Assim, são necessários estudos para cada patossistema (Paulitz e Schroeder, 2016).

Plantas deficientes em potássio possuem elevada suscetibilidade a certas doenças, pois a síntese de compostos de elevado peso molecular (proteínas, amido e celulose) é diminuída e acumulam-se a de compostos orgânicos de baixo peso (Zambolim e Ventura, 1993). Ele está relacionado às funções metabólicas como ativação de enzima, fotossíntese, osmo-regulação, movimento dos estômatos, transferência de energia, transporte de floema, balanceamento de cátions e ânions e resistência a estresse (Marschner, 2012), não interferindo significativamente nos constituintes orgânicos e nem na resistência a doenças, apenas afetando o desenvolvimento de doenças virais (Zhou et al., 2014).

Estudos mostraram que a aplicação de solução de fósforo inorgânico reduz a severidade de doenças bacterianas (Zhao et al., 2013). Os fosfitos são registrados

no Brasil como fertilizantes (fonte suplementar de fósforo e do elemento combinado). Estes atuam diretamente sobre alguns oomicetos, podendo induzir a produção de fitoalexinas em algumas culturas (Tofoli et al., 2012; Castro et al., 2009), tendo uma ação de indutora de resistência, decrescendo a severidade da requeima (*Phytophthora infestans*) em batata (Tofoli, 2011).

Quadro 2. Macronutrientes essenciais para vegetais. Fonte: Malavolta, 1980.

Nutriente	Funções	Compostos/Classes
N	Importante no metabolismo como composto orgânico; estrutural	Aminoácidos e proteínas, aminas, amidas, aminoaçúcares, purinas e pirimidinas, alcalóides. coenzimas, vitaminas, pigmentos
P	Armazenamento e transferência de energia; estrutural	Ésteres de carboidratos, nucleotídeos, e ácidos nucléicos, coenzimas, fosfolipídios
K	Abertura e fechamento de estômatos, síntese e estabilidade de proteínas, relações osmóticas, síntese de carboidratos	Predomina em forma iônica (K <sup>+</sup> ), compostos desconhecidos.
Ca	Ativação enzimática, parede celular, permeabilidade	Pectato de cálcio, fitato, carbonato, oxalato
Mg	Ativação enzimática, estabilidade de ribossomos, fotossíntese	Clorofila
S	Grupo ativo de enzimas e coenzimas.	Cisteína, cistina, metionina e taurina, glutationa, glicosídios e sulfolipídios, coenzimas
Si	Contribui para elasticidade e rigidez das paredes celulares	Sílica amorfa; Silicato de cálcio

O enxofre elementar foi localizado ocasionalmente de forma intensa nas células do parênquima do xilema, paredes vasculares, géis vasculares e tilose, esta última ligada à defesa a patógenos, pois no controle não havia sido detectado (Williams et al., 2002). Sendo provável surgimento pela degradação de proteínas (Novo et al. 2007).

O cálcio em baixa concentração favorece o efluxo de compostos de baixo peso molecular (açúcares) do citoplasma para o apoplasto. Quando a concentração é aumentada são requeridos na lamela média em forma de poligalacturonatos de cálcio, para que haja estabilidade da parede celular. Muitos fungos e bactérias

fitopatogênicas alcançam o tecido da planta pela produção de enzimas pectolíticas extracelulares, como a galacturonase, que dissolvem a lamela média (McGuire e Kelman, 1986). Altas concentrações de  $\text{CaCO}_3$  no solo podem proporcionar menor severidade de *X. campestris* pv. *vesicatoria* (sin. *X. euvesicatoria*) em pimentão, já o magnésio na forma de  $\text{MgCl}_2$  tanto em adução foliar quanto no solo aumenta a severidade do mesmo patógeno em pimentão (Jones et al., 1983).

O zinco é indispensável para o funcionamento adequado de mais de 300 enzimas. É regulador da expressão gênica de mecanismos contra estresses ambientais, inclusive a resistência a doenças (Stuiver et al., 2014). O uso de sulfato de zinco e fosfito de zinco foram eficientes no controle de oídio em eucalipto (Silva et al., 2016). Sua deficiência causa atrofia da parte aérea, clorose, infecção por fungos, etc. Seu excesso causa clorose nas folhas jovens devido a consequência da deficiência de ferro (Sidhu, 2016). Solos com baixas quantidades de zinco contribuem para a ocorrência de *X. campestris* pv. *oryzae* (Zambolim e Ventura, 1993).

Segundo Zambolim e Ventura (1993) o ferro é essencial para a síntese de fitoalexinas e indução de resistência a doenças, pela ativação de enzimas que possuem o íon ferro como cofator. As proteínas heme e as proteínas Fe-S são os grupos mais importantes incluindo citocromo oxidase, catalase, peroxidase e leghemoglobina, estas conferem a cor rosa aos nódulos das raízes quando fixam nitrogênio. Ativa também algumas enzimas incluindo ácido aminolevulínico sintetase e coproporfirinogênio oxidase, participando das etapas da biossíntese da clorofila (Kirkby e Römheld, 2007). As atividades das peroxidases estão correlacionadas com o teor de ferro nas raízes, diminuindo o ferro, diminui a atividade enzimática (Marschner et al., 1986).

O acúmulo em altas concentrações de Mn e outros minerais são maiores em variedades resistentes do que em suscetíveis (Bashair et al., 2016). Segundo Graham et al. (1983) um baixo teor de Mn pode reduzir a produção de compostos fenólicos, lignina e flavonóides, pois atua como cofator de enzimas, o que pode explicar a sua associação com a resistência em plantas. No entanto, para doenças causadas por vírus, o Mn pode ter um efeito positivo em relação a doença, pois é necessário para replicação do RNA viral (Zambolim e Ventura, 1993).

Quadro 3. Micronutrientes essenciais para vegetais. Fonte: Evans e Sorger, 1966; Malavolta, 1980; Mengel e Kirkby, 2001; Kirkby e Römheld, 2007.

Nutriente	Funções	Compostos/Íons/Enzimas
B	Transporte de carboidratos; Constituinte de paredes celulares e membranas; alongamento celular e metabolismo dos ácidos nucleicos; (indução de florescimento, polinização, estabelecimento do fruto)	Borato
Cl	Transporte de elétrons na fotossíntese	Cloreto
Co	Fixação de N <sub>2</sub>	Vitamina B <sub>12</sub>
Cu	Enzima fotossíntese; metaloproteína; transporte de elétrons na fotossíntese; indução de florescimento, polinização, estabelecimento do fruto	Polifenoloxidase; plastocianina, azurina, estelacianina; umecianina
Fe	Grupo ativo em enzimas e em transportadores de elétrons; metaloproteína	Citrocromos, ferredoxina, catalase, peroxidase, redutase de nitrato, nitrogenase; redutase de sulfito
Mn	Transporte de elétrons na fotossíntese; metabolismo de ácidos orgânicos; metaloproteína; Ativação de enzimas; tolerância ao estresse; indução de florescimento, polinização, estabelecimento do fruto	Manganina
Mo	Fixação do N <sub>2</sub> ; redução do NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; tolerância ao estresse	Nitrato redutase; nitrogenase; xantina desidrogenase
Zn	Constituinte de paredes celulares e membranas; ativação de enzimas; tolerância ao estresse; indução de florescimento, polinização, estabelecimento do fruto	Anidrase carbônica, aldolase
Ni	Metaloproteína	Urease e hidrogenase
Na	Regeneração do fosfoenolpiruvato em plantas C4 e CAM; substitui o potássio em algumas funções	

O cobre na forma de íon pode aumentar a síntese de compostos com propriedades bactericidas como peróxidos, compostos fenólicos e quinonas, podendo induzir resistência (Zambolim e Ventura, 1993). O cobre é utilizado no controle da mancha bacteriana em *Capsicum* spp., no entanto, alguns isolados já apresentam resistência a este mineral (Lima, 2016).

### **1.6. Elementos não essenciais**

Estes elementos não participam diretamente do metabolismo da planta. Alguns elementos como o alumínio, selênio e cobalto são encontrados em baixas concentrações em vegetais.

Elementos com cromo, cobalto, chumbo estão presentes nos solos em baixas quantidades. Embora sejam absorvidos, estes também não tem relação junto ao metabolismo da planta, sendo essenciais ao metabolismo dos animais e dos homens (Kirkby e Römheld, 2007).

O cromo é pouco móvel, ficando mais retido na raiz. Plantas de *Capsicum annuum* inoculadas com micorrizas do gênero *Glomus* tiveram o dobro da matéria seca do que plantas não inoculadas tratadas com diferentes doses de cromo. Devido aos efeitos fitotóxicos do cromo, como clorose, redução do crescimento entre outros, os autores concluíram que o fungo foi capaz de imobilizar o cromo na raiz, reduzindo a fitoxidez (Ruscitti et al., 2015).

O cobalto é essencial para a fixação biológica do nitrogênio (N<sub>2</sub>). Atua na formação da cobalamina que é precursora da leghemoglobina, presente nos nódulos radiculares, principalmente na família fabácea (Marschner, 2012).

O chumbo (Pb) além de não ser essenciais e benéficos às plantas, podem ser extremamente tóxicos em baixas concentrações. A acumulação deste metal pesado em plantas difere grandemente entre espécies vegetais e, também, entre órgãos ou tecidos (Ramos et al., 2002).

As plantas ao absorverem em excesso os diferentes metais pesados, sofrem alterações na atividade de enzimas que contém ferro, enzimas estas, ligadas à fotossíntese, ao sistema de defesa antioxidante e à tolerância hídrica. Inibição do crescimento, descoloração, clorose, necrose e epinastia foliar são, usualmente,

alguns dos sintomas visíveis característicos da toxicidade dos metais pesados (Diaz et al., 2001; Pandey e Sharma, 2002; Liu et al., 2007).

Concentrações elevadas de cádmio causa alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (Oliveira et al., 2001; Andrade et al., 2005). Dentre os efeitos mais comuns da toxicidade, estão a redução do crescimento vegetal, principalmente o das raízes (Shah et al., 2001; Vitória et al., 2001; Fornazier et al., 2002), além de várias alterações nas atividades de enzimas-chave de várias rotas metabólicas (incluindo do Ciclo de Calvin), da glicólise e da assimilação do sulfato (Shah et al., 2001; Fornazier et al., 2002; Cardoso et al., 2002; Pereira et al., 2002). O cádmio acelera a senescência foliar levando a clorose foliar, atua indiretamente no fechamento estomático e leva à ruptura das membranas celulares (Fornazier et al., 2002; Andrade et al., 2005).

### **1.7. Absorção de nutrientes**

Os nutrientes influem na severidade e incidência de doenças, quando há um fornecimento adequado de nutrientes e uma absorção equilibrada, o aparecimento de doenças geralmente é reduzido. Isso é benéfico para a agricultura em geral, pois pode diminuir o uso de defensivos agrícolas (agrotóxicos). A problemática é o nutriente fornecido não é necessariamente assimilado, por isso a importância de estudos sobre absorção de nutrientes e sua influência nos mecanismos de defesa contra fitopatógenos.

A absorção dos nutrientes corresponde à entrada na forma iônica ou molecular para o interior da planta, ou seja, nos espaços intercelulares ou organelas vivas, por via radicular ou foliar (Malavolta, 1980). Ela é caracterizada por três fatores: seletividade, acumulação e genótipo. Alguns elementos são absorvidos preferencialmente em relação a outros ou não há absorção de alguns elementos (seletividade); a concentração de determinado elemento pode ser muito maior em alguma parte específica da planta (acumulação); e genótipo, quando há diferenças entre plantas da mesma espécie quanto à absorção de nutrientes (White, 2012).

### **1.8. Elementos potencialmente tóxicos e sua mobilidade em plantas**

Os elementos potencialmente tóxicos como chumbo, cromo, cádmio e lítio estão em diversas matrizes ambientais, portanto é necessário reconhecer sua

influencia no meio ambiente, pois a presença desses metais no solo implica na absorção nas plantas e, conseqüentemente, nos alimentos (Galiová et al., 2011).

A minimização de entrada desses metais na cadeia alimentar e do impacto por eles causado é de interesse para toda a população, um dos métodos é a fitorremediação que está tendo um investimento grande pela possibilidade de plantas absorverem os metais e removerem dos rios ou das diversas matrizes estudadas (Krämer, 2005; Galiová et al., 2011).

Segundo Jung (2008) a concentração do metal no solo, o tipo de solo, pH, CTC (Capacidade de Troca Catiônica), teor de matéria orgânica, espécie e variedade vegetal e a idade da planta influenciam na absorção.

A absorção e mobilidade de metais nas plantas podem afetar diversos processos como germinação, crescimento vegetativo, fotossíntese, atividades enzimáticas e a nutrição mineral (Chen et al., 2000). Os elementos potencialmente tóxicos são armazenados em diferentes tecidos e órgãos (raiz, caule, folha, flores, frutos ou sementes) em diferentes concentrações. Segundo (Doumett et al., 2008) o chumbo acumula principalmente nas raízes. Mas em *Capsicum* preferencialmente em nervuras das folhas (Galiová et al., 2007).

A estratégia de sobrevivência de plantas que crescem em solos contaminados é a tolerância ao metal (Baker, 1981). Geralmente as espécies tolerantes, acumulam maiores concentrações de metais tóxicos na raiz em relação à parte aérea (Hu et al, 2010).

### **1.9. Anatomia Foliar**

A epiderme é o tecido mais externo dos órgãos vegetais, estando em contato direto com o ambiente. É um tecido especializado das plantas que apresenta um revestimento denominado cutícula, composta por cutina e ceras.

A cutina é um composto de lipídios - poliésteres insolúveis, de alto peso molecular, resultante da polimerização de certos ácidos graxos produzidos, aparentemente, no retículo endoplasmático do protoplasma das células epidérmicas (Mauseth, 1988). Esses compostos hidrofóbicos tem como principal função evitar a perda de água, além de ser uma barreira eficiente contra a entrada da maioria dos patógenos que colonizam a superfície, sendo possível somente ser degradados por

microrganismos que apresentam como mecanismo de ataque, enzimas denominadas cutinases. A espessura ou a densidade dessa camada cuticular podem aferir quanto a resistência da planta. As paredes das células epidérmicas, em vista frontal, podem ser retas, curvas ou sinuosas. As paredes sinuosas são freqüentes em folhas e pétalas, especialmente na epiderme abaxial, provavelmente, às tensões ocorridas na folha durante a diferenciação das células ou ao endurecimento da cutícula, também durante a diferenciação (Watson, 1942). Compostos presentes na cutícula também são responsáveis pela sinalização ativando outros mecanismos como as proteínas-RP (Reina-Pinto e Yephremov, 2009).

Os estômatos são aberturas naturais cuja função é manter o fluxo contínuo de água entre solo, planta e atmosfera. Serve como porta de entrada para o CO<sub>2</sub>, substrato para a fotossíntese. A quantidade de estômatos, associada com o tamanho e o período de abertura são fatores que influenciam na continuidade do processo de penetração dos patógenos e estabelecimento de relações parasitárias estáveis (Lima et al., 2010). Sua forma (crista cuticular) pode impedir a continuidade do filme de água e, conseqüentemente, a entrada da bactéria. Os estômatos podem ser classificados quanto a forma das células subsidiárias, sendo chamado de anomocítico (ranunculáceo), o estômato envolvido por um número variável de células que não diferem em formato e tamanho das demais células epidérmicas (Metcalf et al., 1950).

Os tricomas apresentam paredes normalmente celulósicas, podendo espessar-se e sofrer lignificação, impregnação de sílica e carbonato de cálcio. Apresentam função relacionada à redução da perda de água pela planta e atuam no mecanismo de proteção da mesma, através das glândulas associadas, contendo substâncias inibidoras produzidas no metabolismo secundário. O número de tricomas esta envolvido na continuidade do filme de água e, conseqüentemente, na possibilidade do patógeno atingir aberturas naturais como os estômatos, ou mesmo atingir a superfície das células por onde iniciará a penetração (Jerba et al., 2005).

Patógenos que dependem exclusivamente dos estômatos abertos para penetrar, apresentam dificuldades de penetração se os estômatos tiverem a abertura



retardada pela manhã, devido ao ressecamento do tubo germinativo pelo Sol, frustrando assim a tentativa de penetração (Pascholati e Leite, 1995).

Os vasos condutores possuem a função estrutural para sustentação da parte aérea e funcionam como condutores do fluxo de seiva. Sua função permite manter as folhas em posição adequada para captação da energia solar e realização da fotossíntese (Jerba et al., 2005).

No citoplasma, diversas funções são realizadas como diferentes reações bioquímicas necessárias à vida da célula, facilitação da troca de substâncias dentro da própria célula e entre as células adjacentes, e acumular substâncias do metabolismo primário e secundário da planta. Ele se reorganiza em resposta defensiva quando algum propágulo de microrganismo fitopatogênico atinge a superfície do hospedeiro para tentar penetrá-lo. Inicia-se uma grande atividade de mudança na organização interna da célula vegetal, uma intensa rede de microtúbulos é produzida para levar núcleo, retículo endoplasmático, complexo de golgi e ribossomos próximos do ponto de penetração, facilitando a comunicação celular e aumentando a velocidade das respostas de defesa vegetal (Schmelzer, 2002).

Os cloroplastos contêm pigmentos do grupo das clorofilas (importantes para a fotossíntese) e carotenóides (acessórios no processo de fotossíntese). Os espaços intermembranas são acessíveis a metabólitos do citoplasma, pois a membrana mais externa é uma barreira pouco seletiva. O estroma é atravessado por um elaborado sistema de membranas (tilacóides), sede das reações fotoquímicas responsáveis pela captação e transformação da energia luminosa em energia química. O lume do tilacóide é o sítio das reações de oxidação da água, estando conseqüentemente envolvido na liberação do oxigênio da fotossíntese. A composição do estroma é basicamente protéica, contendo todas as enzimas responsáveis pela redução do carbono na fotossíntese. No cloroplasto é formado o amido, e suas dimensões podem variar de acordo com o período do dia, à medida que os açúcares são formados, tendendo a desaparecer no escuro e aumentar na presença da luz.

A característica principal dos parênquimas é ser fotossintetizante. Suas formas podem ser variáveis, dependendo do órgão e da espécie em que eles estão presentes e do ecossistema a que pertence a planta. As células do parênquima

clorofiliano podem dispor-se de modo a favorecer uma grande superfície de contato com as outras células, facilitando a captação de energia luminosa e dos elementos gasosos necessários à realização da fotossíntese. Os cloroplastos junto à parede periférica formam uma camada uniforme na para a absorção do gás carbônico. O parênquima paliçádico é encontrado principalmente no mesofilo e constituído de um ou mais estratos celulares, com grande quantidade de cloroplastídios e poucos espaços intercelulares. São mais altas que largas. As células do parênquima lacunoso conectam-se com as células do parênquima paliçádico, podendo, neste caso, ter formato diferenciado. As células do parênquima foliar podem conter de 20 a 60 cloroplastos e cada cloroplasto tem cerca de 20 a 40 cópias do DNA. Estudos realizados com *archantia* sp. (briófita) e *Nicotiana tabacum* (angiosperma) mostram que, embora sejam plantas distantes evolutivamente, ambas têm genomas do cloroplasto bem similares, o que demonstra que houve pouca modificação deste na evolução (Bouman, 1984).

O xilema é o tecido responsável pelo transporte de água e solutos a longa distância, armazenamento de nutrientes e suporte mecânico. Estes tecidos são contínuos através de todos os órgãos (vegetativos ou reprodutivos) das plantas vasculares, formando um verdadeiro sistema vascular. Os meristemas primários estão relacionados com a formação do corpo primário da planta, e têm a função de adicionar novas células ao sistema axial. Já os meristemas secundários são os responsáveis pelo aumento em espessura de caules e raízes, por meio da adição lateral de novas células, formando o sistema radial.

O floema é o principal tecido de condução de materiais orgânicos e inorgânicos em solução nas plantas vasculares como a água, carboidratos na forma de sacarose, substâncias nitrogenadas como aminoácidos e amidas, lipídios, ácidos orgânicos, ácidos nucléicos, substâncias reguladoras de crescimento, vitaminas e tons inorgânicos. O transporte de solutos pelo floema é um movimento entre órgãos produtores (fonte) e consumidores (dreno). Um sítio consumidor é aquele em que ocorre consumo de substâncias orgânicas para a formação de novos órgãos ou para a acumulação de substâncias de reserva como meristemas, folhas jovens, cotilédones ou endosperma de sementes em formação, tecidos de reserva de raiz, caule ou folhas quando estão armazenando essas substâncias. Dessa forma, o

floema é a via de união entre sítios produtores e consumidores, e o desenvolvimento de uma planta é um reflexo da transferência de materiais entre eles.

O halo refere-se a uma modificação na parede celular ao redor do ponto de penetração para evitar a perda de água e ao mesmo tempo dificultar a penetração por parte do patógeno (Agrios, 2005).

A papila apesar de atuar juntamente com o halo, tem suas modificações no espaço entre a parede celular e a membrana no exato local onde o patógeno exerce pressão para penetração. É composta por calose, derivados fenólicos, celulose, suberina, lignina e sílicio e sua principal função é oferecer resistência à penetração do patógeno, dificultando a troca de metabólitos entre patógeno e hospedeiro (Kang e Buchenauer, 2000).

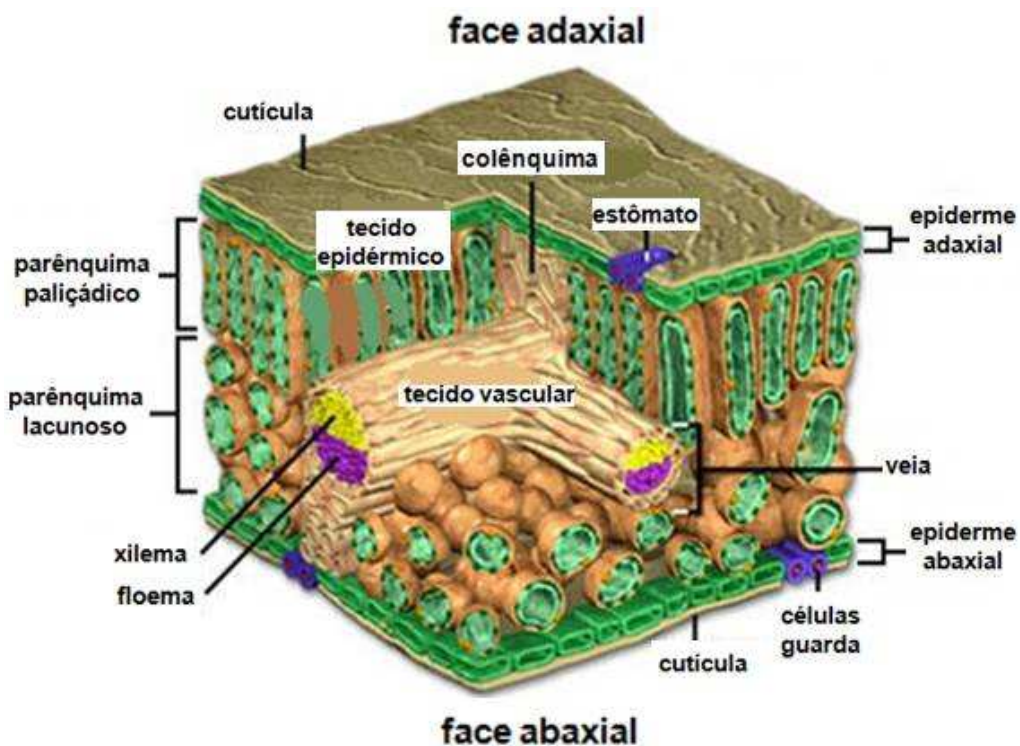


Figura 4. Anatomia da folha. Modificado de Fonte: [www.farmacobotanica.xpg.com.br](http://www.farmacobotanica.xpg.com.br)

### **1.10. Microscopia como método para análise da anatomia foliar**

Acredita-se que o termo microscópio tenha sido introduzido em 1590, na época em que Zacharias Jansen produziu o primeiro equipamento constituído por lentes, que permitiu aumentar um objeto em cerca de nove vezes. No entanto, foi a partir de 1663, com os trabalhos de Descartes, Marcelo Malpighi e Robert Hooke, que a área de microscopia começou a se definir e a despertar efetivo interesse científico.

De acordo com Raven et al. (1996), os melhores microscópios ópticos (MO) têm um poder de resolução de 0,2 micrômetro ( $\mu\text{m}$ ), ou aproximadamente 200 nanômetros (nm), e portanto, aumentam a resolução do olho nu em 500 vezes.

O microscópio eletrônico de transmissão tem se constituído numa ferramenta valiosa para interpretação ultraestrutural. Seções ultrafinas do espécime são necessárias para que o feixe de elétrons atravesse a amostra e uma imagem seja formada, altamente resolvidas na ordem de 1nm.

Com desenvolvimento do microscópio eletrônico de varredura (MEV), amostras grossas puderam ser utilizadas. Diferente do MET, no microscópio eletrônico de varredura, o feixe de elétrons não atravessa a amostra, interagindo com a superfície da amostra e gerando elétrons secundários e retroespalhados, que são coletados, amplificados e geram uma imagem em 3 dimensões, com resolução de 10nm, onde buracos ou fissuras aparecem escuros, as protuberâncias e saliências aparecem claras. Suas aplicações incluem os estudos de estruturas superficiais de organismos inteiros, tecidos e órgãos.

Os microscópios eletrônicos tem sido utilizado com grande vantagem na descrição da forma geral e detalhadas das interações envolvendo bactéria-planta (Levanony e Bashan, 1989; Reis Jr. et al., 1995).

A Microscopia é uma ferramenta extremamente importante para a avaliação comparativa dos tecidos vegetais, quando submetidas a diferentes tratamentos, acumulando assim informações importantes para possíveis diagnósticos quanto a questões nutricionais, tanto para o desenvolvimento como resistência.

Nenhuma ferramenta científica contribuiu tanto para o avanço do conhecimento básico e mudança de paradigmas em ciência como a microscopia. Desde sua invenção a cerca de quatrocentos anos atrás, o microscópio tem

desempenhado um papel fundamental na exploração de amostras orgânicas e inorgânicas, tornando-se uma ferramenta indispensável na pesquisa científica (Baldani et al., 1998).

Muitos métodos de preparação de amostras têm sido descritos na literatura, apresentando bons resultados na visualização de materiais biológicos e não biológicos (Kessel e Shih, 1976; Hayat, 1972; Dawes, 1971; Hall e Hawes, 1991; Dykstra, 1993).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo geral**

Analisar por microscopia os efeitos na estrutura foliar entre dois genótipos de *Capsicum annuum* var. *annuum*, um suscetível (UENF L11) e outro resistente (UENF 1381) a *Xanthomonas euvesicatoria* submetidos a tratamento nutricional com acréscimo de metais potencialmente tóxicos.

### **2.2. Objetivos específicos**

Analisar e comparar o efeito na anatomia foliar entre os genótipos L11 e UENF 1381 de *C. annuum* var. *annuum* submetidos a solução nutritiva Hoagland e Hoagland com acréscimo de metais;

Analisar e comparar o efeito da solução nutritiva na anatomia foliar dos genótipos UENF L11 e UENF 1381 de *C. annuum* var. *annuum*.

Correlacionar a influência dos elementos químicos presentes nas soluções nutritivas com os efeitos observados na estrutura foliar.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. As amostras**

As amostras para este experimento foram cedidas por Silva (2018), que semeou dois genótipos de *Capsicum annuum* var. *annuum* L11 (genótipo suscetível a *X. euvesicatoria*) e UENF1381 (genótipo resistente a *X. euvesicatoria*) em bandeja de 128 células de poliestireno expandido contendo vermiculita (previamente lavada em água por três vezes) e mantidas em câmara de crescimento a 28°C e 80% UR com fotoperíodo de 16h para o dia e 8h para a noite.

As mudas foram transplantadas para vasos plásticos pretos de 5L quando atingiram dois pares de folhas definitivas, em casa de vegetação localizada no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). O substrato utilizado foi uma proporção volumétrica de 2:1 de areia e vermiculita.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2<sup>2</sup> com quatro tratamentos e cinco repetições, sendo: a) L11 Hoagland; b) L11 Hoagland com acréscimo de metais; c) UENF 1381 Hoagland; d) UENF 1381 Hoagland com acréscimo de metais, totalizando 20 vasos.

A solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) foi incrementada com elementos químicos utilizados por Lahner et al. (2003), com Cádmiu (Cd) 0,09ppm; Cobalto (Co) 0,59ppm; Cromo VI (Cr) 0,26ppm; Lítio (Li) 0,70ppm; Níquel (Ni) 0,59ppm e; Chumbo (Pb) 20ppm, irrigando inicialmente por aspersão nas folhas e depois diretamente no substrato, ambos em um volume de 100mL por irrigação em intervalos regulares de três em três dias, e diariamente com água. A solução nutritiva foi aplicada até o fim do experimento, como mostra a Tabela 4, permitindo um desenvolvimento adequado das plantas.

#### **3.2. Coleta das amostras**

A coleta das amostras nas folhas foi realizada quando as plantas de todo tratamento estavam com no mínimo cinco frutos maduros, ou seja, no auge da frutificação (adaptação da metodologia de Stefanov et al., 1995). As amostras foram retiradas das folhas do segundo (2º) nó caulinar, com o auxílio de um cortador de

couro esterilizado de 1cm de diâmetro, quando estas estavam completamente expandidas (Ko et al., 2014).

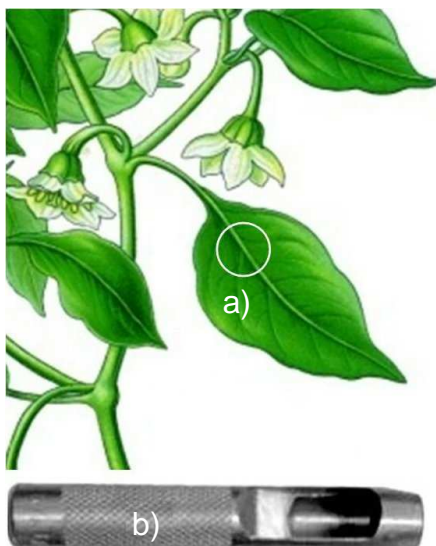


Figura 5. Amostra. a) região da folha de *Capsicum annuum* referente a coleta; b) cortador de couro de 1cm de diâmetro.

### 3.3. Preparação das amostras

As amostras foram imediatamente fixadas após a coleta, à temperatura ambiente, em solução contendo Glutaraldeído 2,5% e Paraformaldeído 4,0% em Solução Tampão Cacodilato de Sódio 0,05 mol/L pH 7,2 por 12 horas (modificado de Karnovsky, 1965) e processadas posteriormente para Microscopia Óptica (MO), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Após a fixação, as amostras foram lavadas 3x (por imersão) em tampão cacodilato de sódio (T. Caco 0,05 mol/L) durante 15 min cada lavada. Posteriormente foram pós-fixadas durante 90 min, à temperatura ambiente, em solução 1:1 de Tetróxido de Ósmio 2% (Woldringh, 1973) e Ferricianeto de Potássio 2%. Novamente as amostras foram lavadas com T. Caco 0,05 mol/L.

Logo após foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 2x 100%) por 2 horas cada.



### **3.3.1. Microscopia Óptica**

Após a etapa de desidratação na preparação, as amostras foram infiltradas em porções volumétricas crescentes (1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1 e puro) de Resina Epon 812 (Vanden Bosch, 1986) com acetona, finalizada com a polimerização da Resina em estufa a 60°C durante 48h. Cortes semifinos (0,50µm) foram obtidos com o auxílio de uma faca de diamante Diatome ultra 45° e um Ultramicrótomo Reichert S da marca Leica, coletados, aderidos em lâminas de vidro e corados com solução de Azul de Toluidina 1% e Tetraborato de sódio (Bórax) 1% durante 8 min. As lâminas foram seladas com Entelan para posterior observação e registro no Microscópio Axioplan da marca Zeiss com câmera Canon PowerShot A640 acoplada.

### **3.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Foram realizados cortes ultrafinos (70nm) com o auxílio de uma faca de diamante Diatome ultra 45° e um Ultramicrótomo Reichert S da marca Leica, coletados em grades de cobre 300 mesh, contrastados posteriormente com solução de Citrato de Chumbo e Acetato de Uranila 5% em água (Reynolds, 1963), e observados no Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-1400Plus da marca Jeol.

### **3.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Após a etapa de desidratação na preparação, as amostras tiveram acréscimo de desidratação em 2x de 30 min em acetona 100% super seca e levadas para secagem por Ponto Crítico no Critical Point Dryer, modelo CPD030 da marca Bal-Tec. Posteriormente, foram montadas individualmente, com fita adesiva de carbono e cola de prata nos suportes (*stubs*) para MEV e levado ao metalizador Sputter Coater, modelo SCD050 da marca Bal-Tec, para serem revestidos (*sputtering*) a 40mA com uma camada de 20nm de Ouro-Paládio e observados no Microscópio Eletrônico de Varredura EVO 50 da marca Zeiss.

Tabela 1. Solução de Hoagland e Arnon (1950) modificada - Solução estoque e final. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Composto	Peso molecular	[Solução estoque]		Volume de solução estoque por L da solução final		Elemento	[Final do elemento]	
	g.mol <sup>-1</sup>	mmol.L <sup>-1</sup>	g.L <sup>-1</sup>		mL		μmol.L <sup>-1</sup>	ppm
Macronutrientes								
KNO <sub>3</sub>	101,1	1000	101,1		6	N	16000	224
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	236,16	1000	236,16		4	K	6000	235
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115,08	1000	115,08		2	Ca	4000	160
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246,48	1000	246,49		1	P	2000	62
						S	1000	32
						Mg	1000	24
Micronutrientes								
KCl	74,55	25	1,864		2	Cl	50	1,77
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83	12,5	0,773		2	B	25	0,27
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	169,01	1	0,169		2	Mn	2	0,11
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	287,54	1	0,288		2	Zn	2	0,13
CuSO <sub>4</sub> .5 H <sub>2</sub> O	249,68	0,25	0,062		2	Cu	0,5	0,03
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (85% MoO <sub>3</sub> )	161,97	0,25	0,04		2	Mo	0,5	0,05
FeEDTA	348,00	71,84	25		1,0	Fe	71,84	25
Opcional								
NiSO <sub>4</sub> .6 H <sub>2</sub> O	262,86	0,25	0,25		0,066	Ni	0,5	0,03
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9 H <sub>2</sub> O	284,2	1000	284,2		1,0	Si	1000	28

V= Volume ; Fonte: Adaptada de Epstein, 1972.

Tabela 2. Quantidades dos elementos químicos fornecidos até o momento da coleta de folhas via solução nutritiva e elementos detectados na areia utilizada como substrato. Campos dos Goytacazes-RJ, 2018.

Elemento	Coleta	Areia	Total	Elemento	Coleta	Areia	Total
N	874,78	NA	874,78	Cu	0,12	0,13	0,25
K	917,73	11,73	928,23	Mo	0,20	NA	0,20
Ca	624,84	16	640,84	Fe	97,63	104,31	201,94
P	242,13	6	248,13	Ni	0,12	NA	0,12
S	124,97	4	128,97	Si	109,35	NA	109,35
Mg	93,73	3,65	97,38	Na	179,64	NA	179,64
Cl	6,91	NA	6,91	Cd	0,03	NA	0,03
B	1,05	0,17	1,22	Co	0,20	NA	0,20
Mn	0,43	26,65	27,08	Cr	0,09	NA	0,09
Zn	0,51	2,05	2,56	Pb	66	NA	66
				Li	NA	NA	NA

Valores em mg/dm<sup>3</sup>. NA= não analisado.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Efeito Genótipo

Comparando o efeito genótipo (Figura 6, A e C), no tratamento com Hoagland, apresentaram diferenças significativas nas células epidérmicas quanto ao tamanho e forma. Na face adaxial, ambas se mostram majoritariamente em forma retangular, e é evidente a diferença no tamanho e na distribuição dos parênquimas nos dois genótipos. Os parênquimas paliçádicos e os parênquimas lacunosos do genótipo suscetível (L11) são maiores e tem uma distribuição mais uniforme, tendo os espaços intercelulares diminuídos entre as células. Os aumentos de suas espessuras apresentam coeficiente de extinção da luz mais alto, portanto, espera-se que tais folhas tenham maiores taxas fotossintéticas (Bolhar, 1993).

Pode-se notar também, diferenças quanto ao tamanho e conteúdo interno dos cloroplastos. Na face abaxial, as células do (L11) são maiores e apresentam uma maior sinuosidade. A sinuosidade da parede celular na epiderme abaxial das espécies *Capsicum annuum*, é explicada como possível características adaptativas contra a perda excessiva de água (Elias et al. 2003). As paredes periclinais externas mostram-se acentuadamente convexas em as faces.

O efeito genótipo no tratamento Hoagland com metais (Figura 6, B e D), notou-se diferenças significativas nas células epidérmicas quanto ao tamanho. Na face abaxial, as células do (UENF 1381) são menores, sendo ambas sinuosas. Na face adaxial, ambas se mostram majoritariamente em forma retangular. Aparentemente não há diferenças no tamanho e na distribuição dos parênquimas nos dois genótipos, embora lâmina foliar do (UENF 1381) esteja mais estreita e paredes periclinais externas estejam acentuadamente convexas nas faces.

### Efeito Tratamento

Comparando o efeito da solução nutritiva Hoagland e Hoagland com acréscimo de metais no genótipo suscetível (L11), nota-se um leve aumento das células da epiderme na face abaxial e diferenças quanto ao tamanho e conteúdo interno dos cloroplastos no tratamento Hoagland Metais (Figura 6, A e B).

O efeito tratamento no genótipo resistente (UENF 1381) (Figura 6, C e D), nota-se que face abaxial, as células epiteliais do tratamento Hoagland com metais

aumentaram em quantidade embora mais encurtadas. Os parênquimas paliçádicos e os parênquimas lacunosos apresentaram uma distribuição mais uniforme, o conteúdo interno e o tamanho dos cloroplastos também foram alterados.

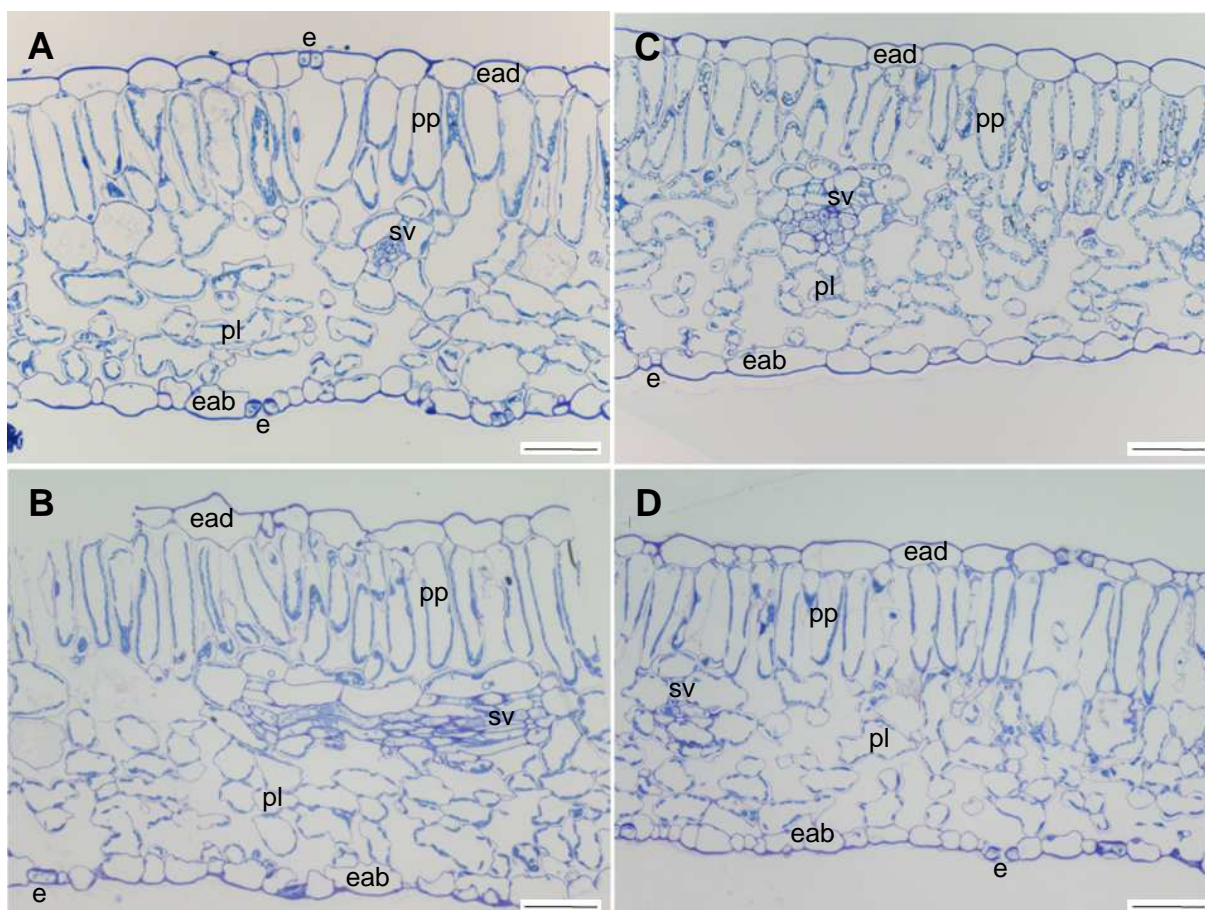


Figura 6. Microscopia óptica da lâmina foliar de *Capsicum annuum* var. *annuum* em seção transversal. A - Genótipo suscetível (L11) com tratamento Hoagland. B - Genótipo suscetível (L11) com tratamento Hoagland e Metais. C - Genótipo resistente (UENF 1381) com tratamento Hoagland. D - Genótipo resistente (UENF 1381) com tratamento Hoagland e Metais. Barras: 50 $\mu$ m. Legenda: ead - epiderme adaxial; eab - epiderme abaxial; e - estômato; pp - parênquima paliçádico; pl - parênquima lacunoso; sv - sistema vascular.

Comparando novamente o efeito genótipo com a imagem aumentada (630x) no tratamento com Hoagland, a face adaxial do suscetível (L11) evidencia a epiderme unisseriada coberta por uma cutícula mais espessa, cloroplastos com menos conteúdo e o citoplasma mais retraído que no resistente (UENF 1381). Na face abaxial, as comparações se repetem de acordo com as adaxiais (Figura 7, B e D).

O aumento da espessura cuticular, a presença de tricomas e estômatos, dependendo do seu tamanho e formato, podem também dificultar o ingresso do patógeno, sugerindo estes como mecanismos estruturais de resistência e barreiras contra patógenos (Pascholati e Leite, 1994; Ramos et al. 1992).

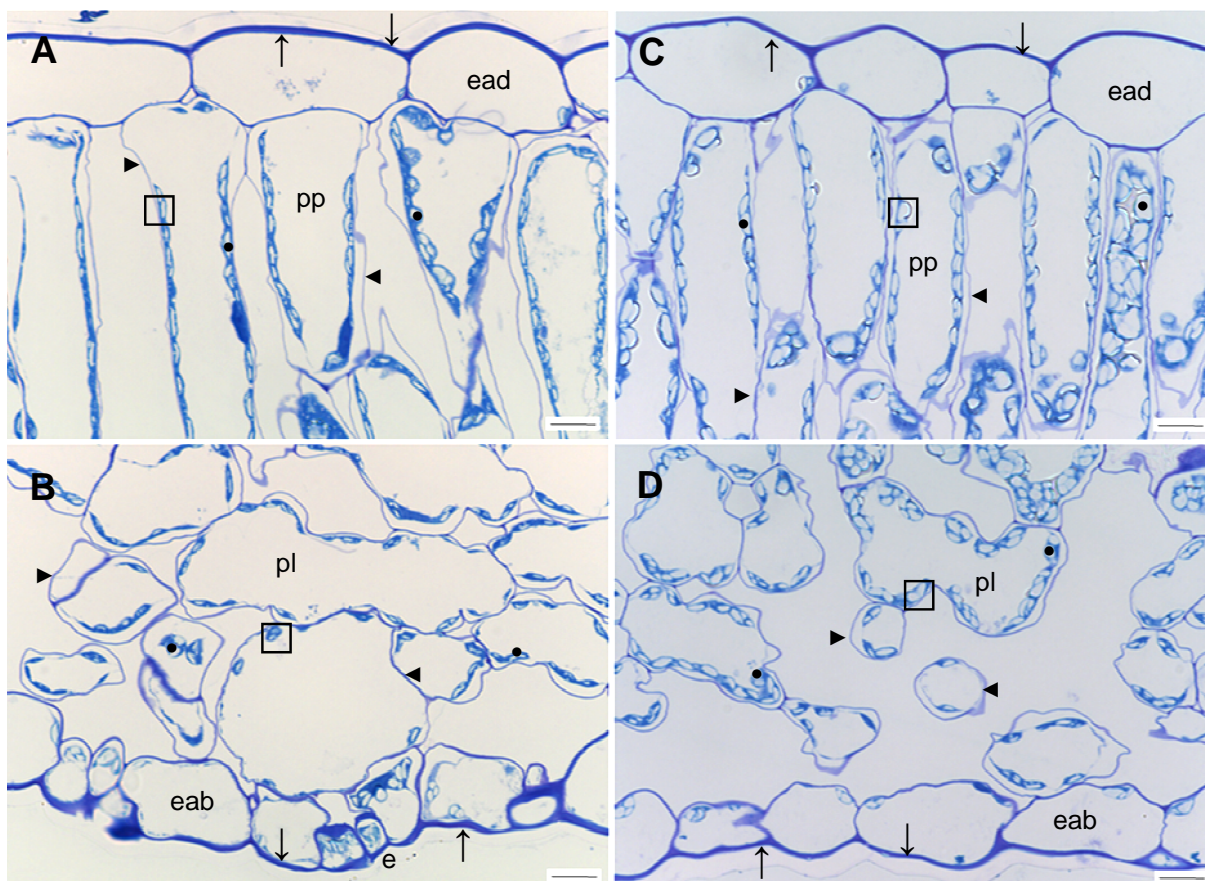


Figura 7. Microscopia óptica da lâmina foliar de *Capsicum annuum* var. *annuum* em seção transversal no tratamento com Hoagland. A - Genótipo suscetível (L11) face adaxial. B - Genótipo suscetível (L11) face abaxial. C - Genótipo resistente (UENF 1381) face adaxial. D - Genótipo resistente (UENF 1381) face abaxial. Barras: 10µm. Legenda: ead - epiderme adaxial; eab - epiderme abaxial; e - estômato; pp - parênquima paliçádico; pl - parênquima lacunoso; □ - cloroplasto; • - indicativo de amido primário; ▲ - membrana citoplasmática; seta - Cutícula.

Comparando agora o efeito genótipo com a imagem aumentada (630x) no tratamento com Hoagland e acréscimo de metais, visualizou-se que na face adaxial do suscetível (L11) apresenta epiderme unisseriada coberta por uma cutícula mais espessa, cloroplastos significativamente maiores que no resistente (UENF 1381), assim como a retração citoplasmática. Há indicativo de amido primário em ambos, embora seja mais abundante no suscetível. Na face abaxial, a cutícula do suscetível (L11) é mais espessa. Os cloroplastos apresentam tamanhos equivalentes e se diferem no conteúdo, com indicativo de amido primário em excesso no genótipo resistente (UENF 1381) e retração citoplasmática ligeiramente maior que no suscetível (Figura 8).

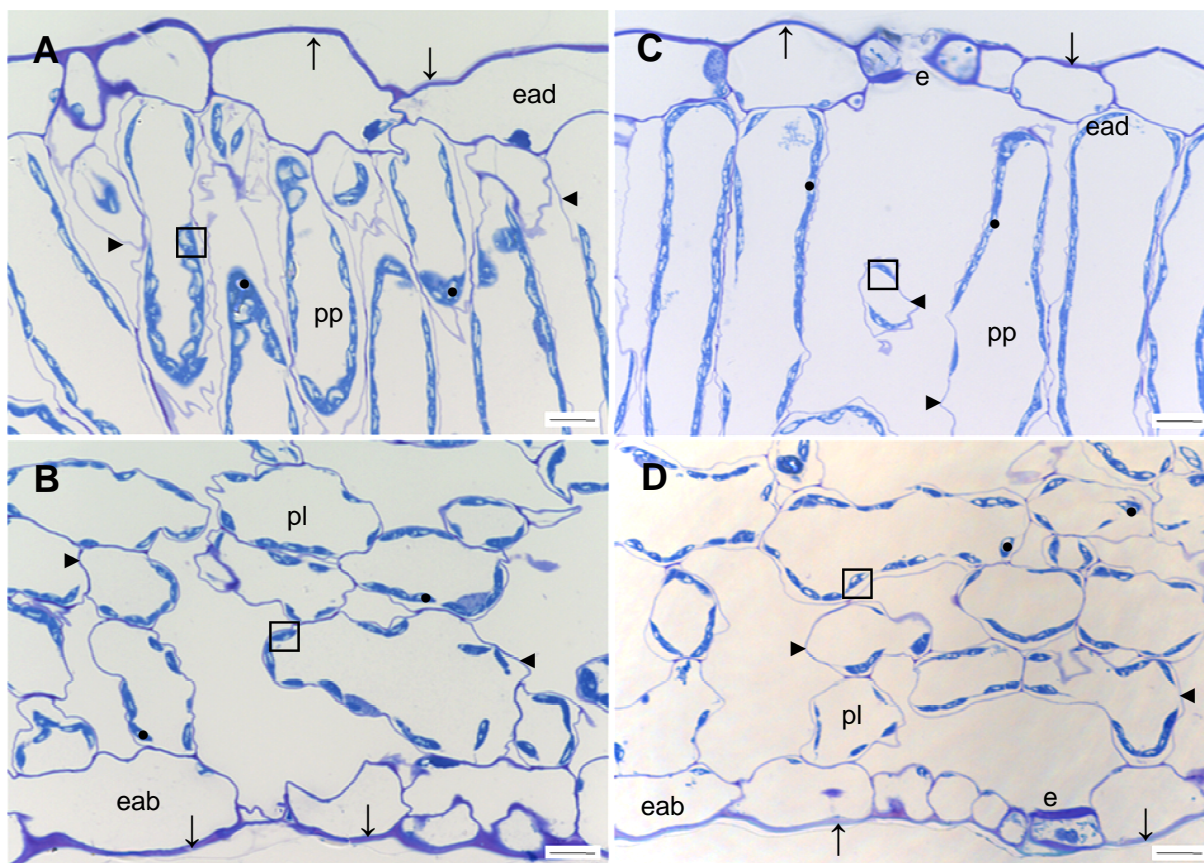


Figura 8. Microscopia óptica da lâmina foliar de *Capsicum annuum* var. *annuum* em seção transversal no tratamento com Hoagland e Metais. A - Genótipo suscetível (L11) face adaxial. B - Genótipo suscetível (L11) face abaxial. C - Genótipo resistente (UENF 1381) face adaxial. D - Genótipo resistente (UENF 1381) face abaxial. Barras: 10 $\mu$ m. Legenda: ead - epiderme adaxial; eab - epiderme abaxial; e - estômato; pp - parênquima paliçádico; pl - parênquima lacunoso;  $\square$  - cloroplasto;  $\bullet$  - indicativo de amido primário;  $\blacktriangle$  - membrana citoplasmática; seta - Cutícula.

Comparando novamente o efeito tratamento com a imagem aumentada (630x) no genótipo suscetível (L11), a única diferença significativa na face adaxial foi quanto à espessura da cutícula, sendo mais espessa no tratamento com Hoagland, tendo em ambos, indicativo de amido primário em excesso. Na face abaxial (Figura 9, C e D), não houve diferença significativa na espessura da cutícula e nem quanto à retração citoplasmática, no mesmo tratamento, apenas observou-se uma quantidade maior de indicativo de amido primário nos cloroplastos (Figura 9).

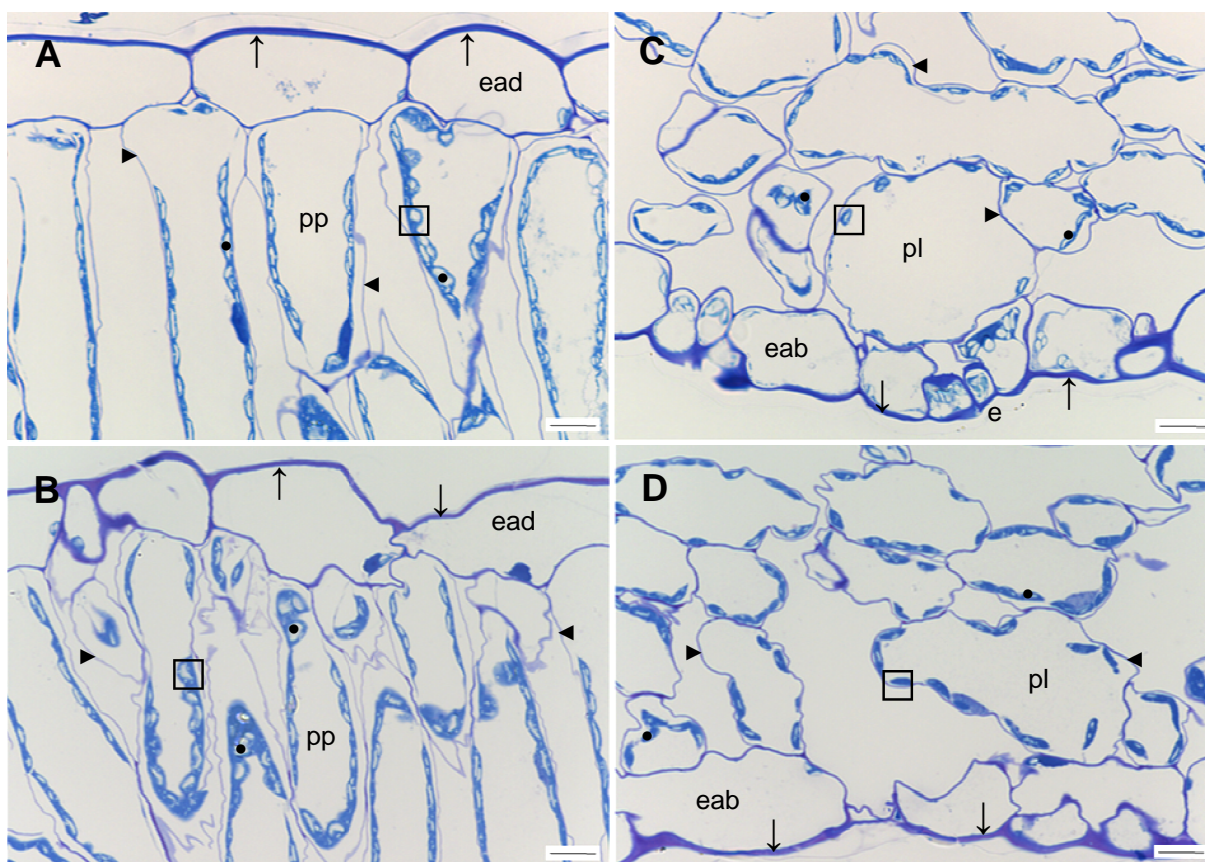


Figura 9. Microscopia óptica da lâmina foliar do genótipo suscetível (L11) de *Capsicum annuum* var. *annuum* em seção transversal da face adaxial e abaxial. A e C - Tratamento com Hoagland. B e D - Tratamento com Hoagland e Metais. Barras: 10µm. Legenda: ead - epiderme adaxial; eab - epiderme abaxial; e - estômato; pp - parênquima paliçádico; pl - parênquima lacunoso; □ - cloroplasto; ● - indicativo de amido primário; ▲ - membrana citoplasmática; seta - Cutícula.



O efeito tratamento no genótipo resistente (UENF 1381) na face adaxial, observou-se com a imagem aumentada (630x), um espessamento maior da cutícula, maior retração citoplasmática, cloroplastos maiores e um significativo acúmulo de indicativo de amido primário no tratamento com Hoagland. Na face abaxial (Figura 10, C e D), não houve uma diferença visual significativa quanto à espessura da cutícula. Os cloroplastos estão maiores no tratamento Hoagland devido ao seu conteúdo (indicativo de amido primário) e a retração citoplasmática é menor do que com acréscimo de metais (Figura 10).

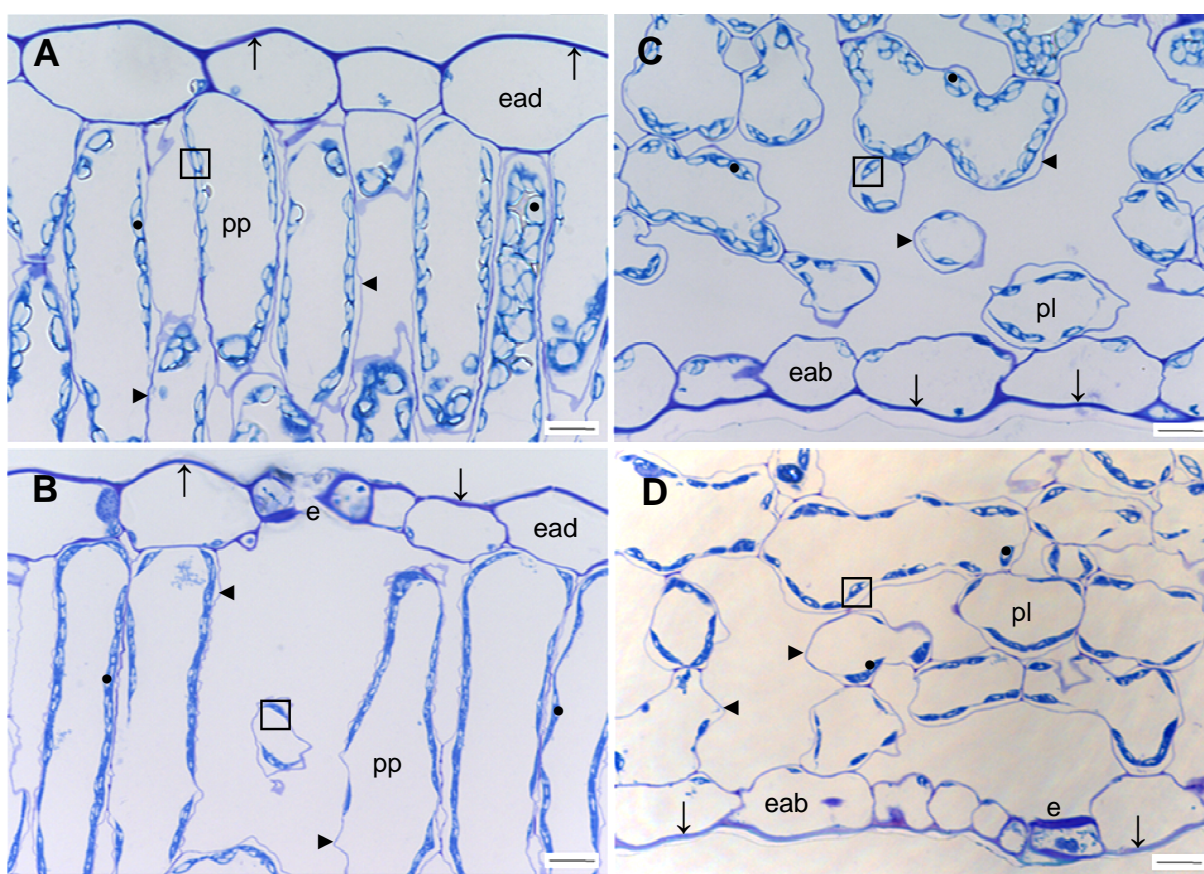


Figura 10. Microscopia óptica da lâmina foliar do genótipo resistente (UENF 1381) de *Capsicum annuum* var. *annuum* em seção transversal da face adaxial e abaxial. A e C - Tratamento com Hoagland. B e D - Tratamento com Hoagland e Metais. Barras: 10µm. Legenda: ead - epiderme adaxial; eab - epiderme abaxial; e - estômato; pp - parênquima paliçádico; pl - parênquima lacunoso; □ - cloroplasto; • - indicativo de amido primário; ▲ - membrana citoplasmática; seta - Cutícula.

Tabela 3. Comparação efeito genótipo com Hoagland.

Face	Genótipo	Espessura cutícula	Acúmulo amido	Retração citoplasmática	Tamanho cloroplasto
Adaxial	L11	X		X	
	UENF 1381		X		X
Abaxial	L11	X		=	=
	UENF 1381		X	=	=

Legenda: X (maior); = (sem diferença significativa).

Tabela 4. Comparação efeito genótipo com Hoagland e Metais.

Face	Genótipo	Espessura cutícula	Acúmulo amido	Retração citoplasmática	Tamanho cloroplasto
Adaxial	L11	X	X	X	X
	UENF 1381				
Abaxial	L11	X	=		=
	UENF 1381		=	x	=

Legenda: X (maior); = (sem diferença significativa).

Tabela 5. Comparação efeito tratamento no genótipo suscetível (L11).

Face	Tratamento	Espessura cutícula	Acúmulo amido	Retração citoplasmática	Tamanho cloroplasto
Adaxial	Hoagland	X	=	X	=
	Hoagland		=		=
	Metais				
Abaxial	Hoagland	X	X	X	=
	Hoagland				=
	Metais				=

Legenda: X (maior); = (sem diferença significativa).

Tabela 6. Comparação efeito tratamento no genótipo resistente (UENF 1381).

Face	Tratamento	Espessura cutícula	Acúmulo amido	Retração citoplasmática	Tamanho cloroplasto
Adaxial	Hoagland	X	X	X	=
	Hoagland				=
	Metais				
Abaxial	Hoagland	X	X	=	=
	Hoagland			=	=
	Metais			=	=

Legenda: X (maior); = (sem diferença significativa).

## Efeito Genótipo

Os genótipos apresentam estômatos do tipo anomocíticos são observados em ambas as superfícies (folha anfiestomáticas) e dispostos no mesmo nível das demais células epidérmicas. Tricomas tectores em sua maioria nas nervuras ou bem próximo delas, raramente no limbo da folha.

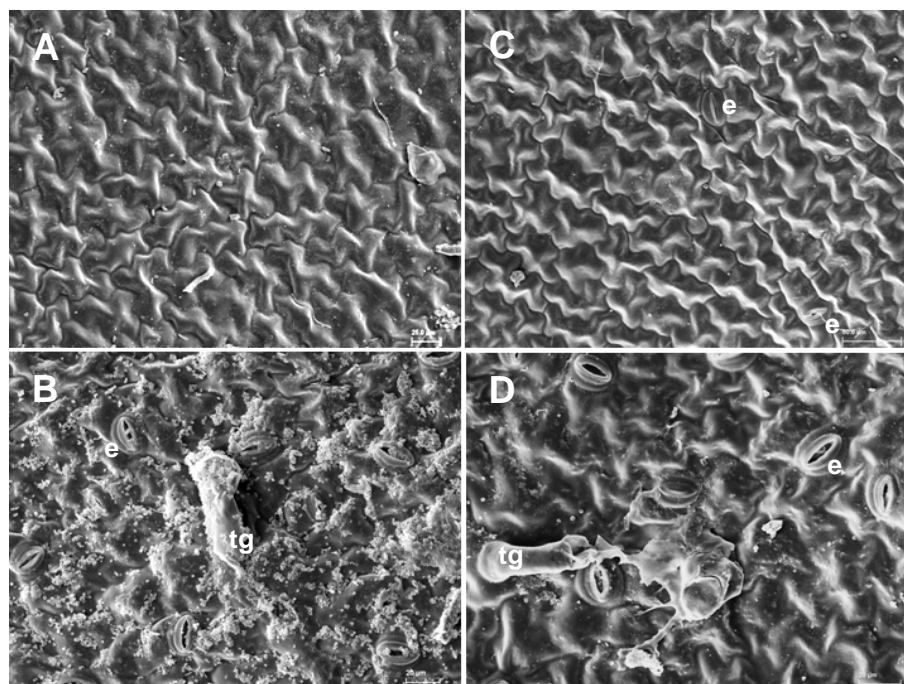


Figura 11. Micrografia eletrônica de varredura da epiderme da folha de *Capsicum annuum* var. *annuum* no tratamento com Hoagland. A - Epiderme adaxial do genótipo suscetível (L11). B - Epiderme abaxial do genótipo suscetível (L11). C - Epiderme adaxial do genótipo resistente (UENF 1381). D - Epiderme abaxial do genótipo resistente (UENF 1381). Barras: A - 25µm; B e D - 20µm; C - 50µm; Legenda: e - estômato; tg - tricoma glandular.

No tratamento com Hoagland, nota-se uma diferença na ornamentação cuticular da superfície adaxial do genótipo suscetível (L11) a *X. euvesicatoria* e do genótipo resistente (UENF 1381), sendo mais alargado no genótipo suscetível, ambas com uma fina camada de cera. Estômatos, embora raros, foram evidenciados no genótipo resistente (Figura 11, C). Na superfície abaxial (Figura 11, B e D) um ligeiro aumento da camada de cera, mais a presença de tricomas granulares e quantidade de estômatos equivalentes em ambos os genótipos.

A ornamentação cuticular é irregular nos dois genótipos no tratamento com Hoagland com acréscimo de metais (Figura 12), a quantidade de estômatos não é diferenciada, ambos apresentam tricomas granulares em sua superfície adaxial. A camada de cera é maior no genótipo suscetível (L11). Na superfície abaxial (Figura 12, B e D), ambos apresentam irregularidade na ornamentação cuticular e quantidade de estômatos equivalente, sendo a camada de cera significativamente maior no genótipo resistente (UENF 1381), com visualização de tricoma tector no genótipo suscetível e tricoma granular no resistente.

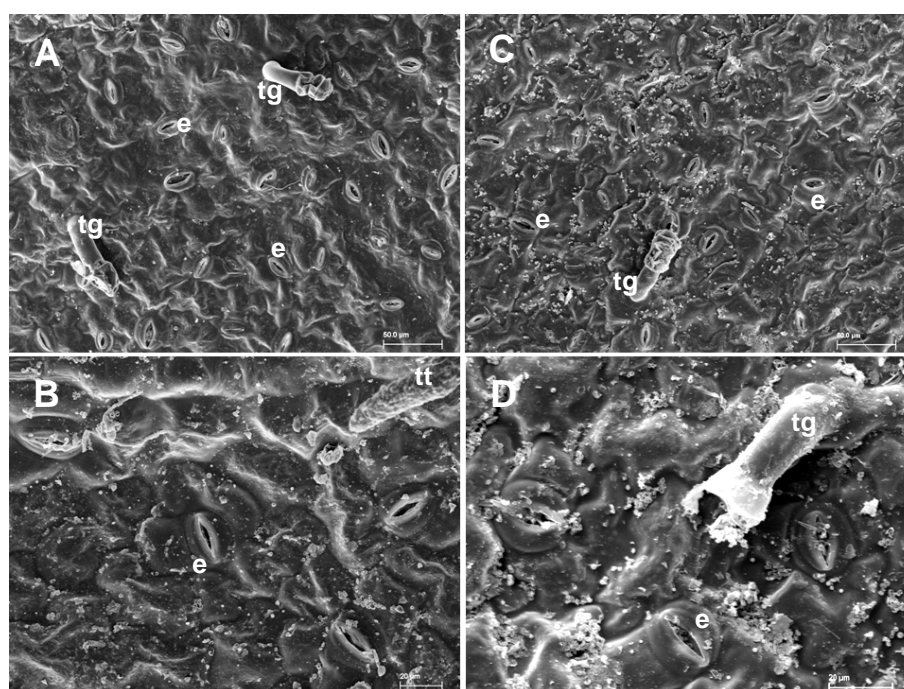


Figura 12. Micrografia eletrônica de varredura da epiderme da folha de *Capsicum annuum* var. *annuum* no tratamento com Hoagland e Metais. A - Epiderme adaxial do genótipo suscetível (L11). B - Epiderme abaxial do genótipo suscetível (L11). C - Epiderme adaxial do genótipo resistente (UENF 1381). D - Epiderme abaxial do genótipo resistente (UENF 1381). Barras: A e C - 50 $\mu$ m; B e D - 20 $\mu$ m; Legenda: e - estômato; tt - tricoma tector; tg - tricoma glandular.

Os Tricomas glandulares possuem células especializadas que produzem exsudados tóxicos que, em contato com predadores podem prender, irritar ou potencialmente matar algumas pragas ou patógenos (Simmons et al., 2003).

## Efeito Tratamento

No tratamento com Hoagland e acréscimo de metais, o genótipo suscetível (L11) apresentou diferenças quanto a irregularidade na ornamentação cuticular (mais irregular) na superfície adaxial, possivelmente pelo arranjo no aumento considerável de estômatos e de tricomas granulares. Na superfície abaxial, nota-se também um aumento da camada de cera em relação ao tratamento com Hoagland e presença de tricomas tectores no limbo foliar (Figura 13).

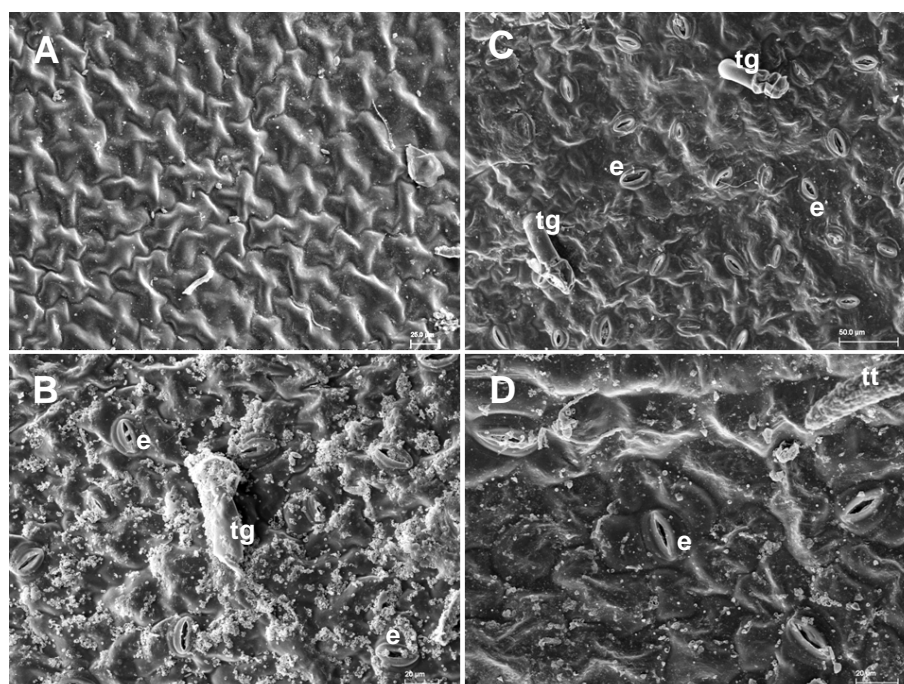


Figura 13. Micrografia eletrônica de varredura da epiderme da folha do genótipo suscetível (L11) de *Capsicum annuum* var. *annuum*. A - Epiderme adaxial Tratamento com Hoagland. B - Epiderme abaxial Tratamento com Hoagland. C - Epiderme adaxial Tratamento com Hoagland e Metais. D - Epiderme abaxial Tratamento com Hoagland e Metais. Barras: A - 25µm; B e D - 20µm; C - 50µm; Legenda: e - estômato; tt - tricoma tector; tg - tricoma glandular.

Quanto à frequência estomática, as plantas cultivadas com acréscimo de metais apresentaram maior quantidade, principalmente na face adaxial, independentemente do genótipo. O aumento quantitativo de estômatos pode permitir que a planta aumente a condutância de gases e, assim, evitar que a fotossíntese seja limitada sob diferentes condições de ambiente (Castro, 2002). A baixa frequência e menor abertura de estômatos constituem mecanismos morfológicos de defesa, induzindo menor número de lesões por área foliar (Mew et al. 1984).

O genótipo resistente (UENF 1381) no tratamento com Hoagland e acréscimo de metais, também apresentou diferenças quanto a irregularidade na ornamentação cuticular (mais irregular), menos que o anterior, e também um aumento considerável de estômatos e de tricomas granulares na superfície adaxial visivelmente com ornamentação mais alargada. Na superfície abaxial do mesmo tratamento, nota-se um aumento da camada de cera, a superfície também com ornamentação mais alargada. As quantidades de estômatos se assemelham assim como a disposição de tricomas granulares (Figura 14).

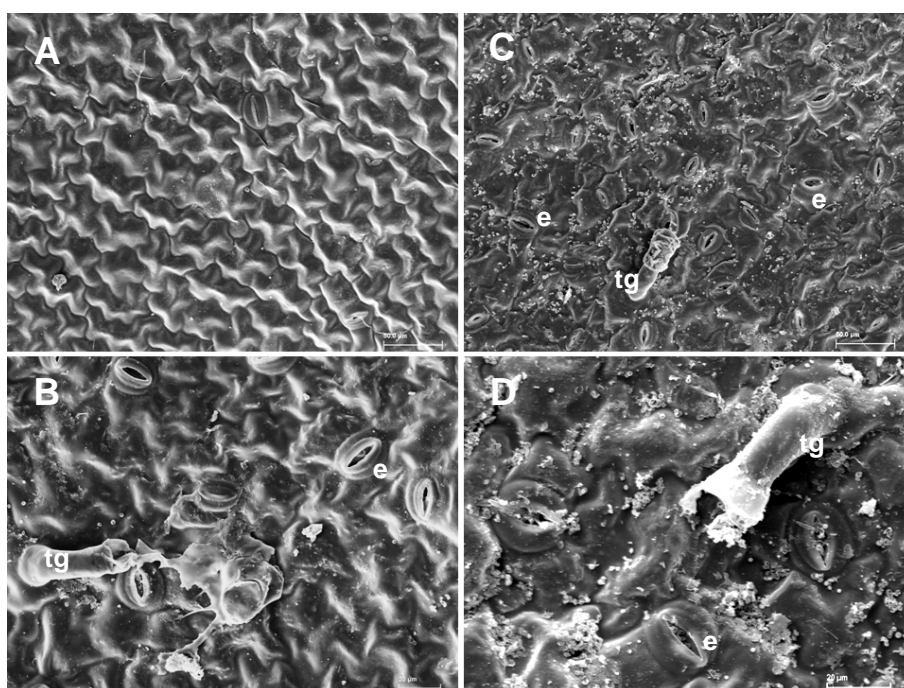


Figura 14. Micrografia eletrônica de varredura da epiderme da folha do genótipo resistente (UENF 1381) de *Capsicum annuum* var. *annuum*. A - Epiderme adaxial Tratamento com Hoagland. B - Epiderme abaxial Tratamento com Hoagland. C - Epiderme adaxial Tratamento com Hoagland e Metais. D - Epiderme abaxial Tratamento com Hoagland e Metais. Barras: A e C - 50 $\mu$ m; B e D - 20 $\mu$ m; Legenda: e - estômato; tg - tricoma glandular.

A câmara subestomática funciona como via de ingresso e saída para as bactérias, que delas emergem na forma de exsudatos de massa bacteriana, constituindo inóculo secundário para disseminação (Miles et al.,1977). *Capsicum annuum* apresenta cerca de 200 estômatos por mm, a abertura ostiolar é de 22-32 $\mu$ m de padrão cruciferáceo, anfiestomática, tendo células epidérmicas de formato sinuoso em ambas as faces foliares (Ahmad, 1964). Maior número e frequência de

estômatos na face abaxial (Cutter, 1987) e indica que esta face como o principal sítio de infecção (Lima et al., 2010).

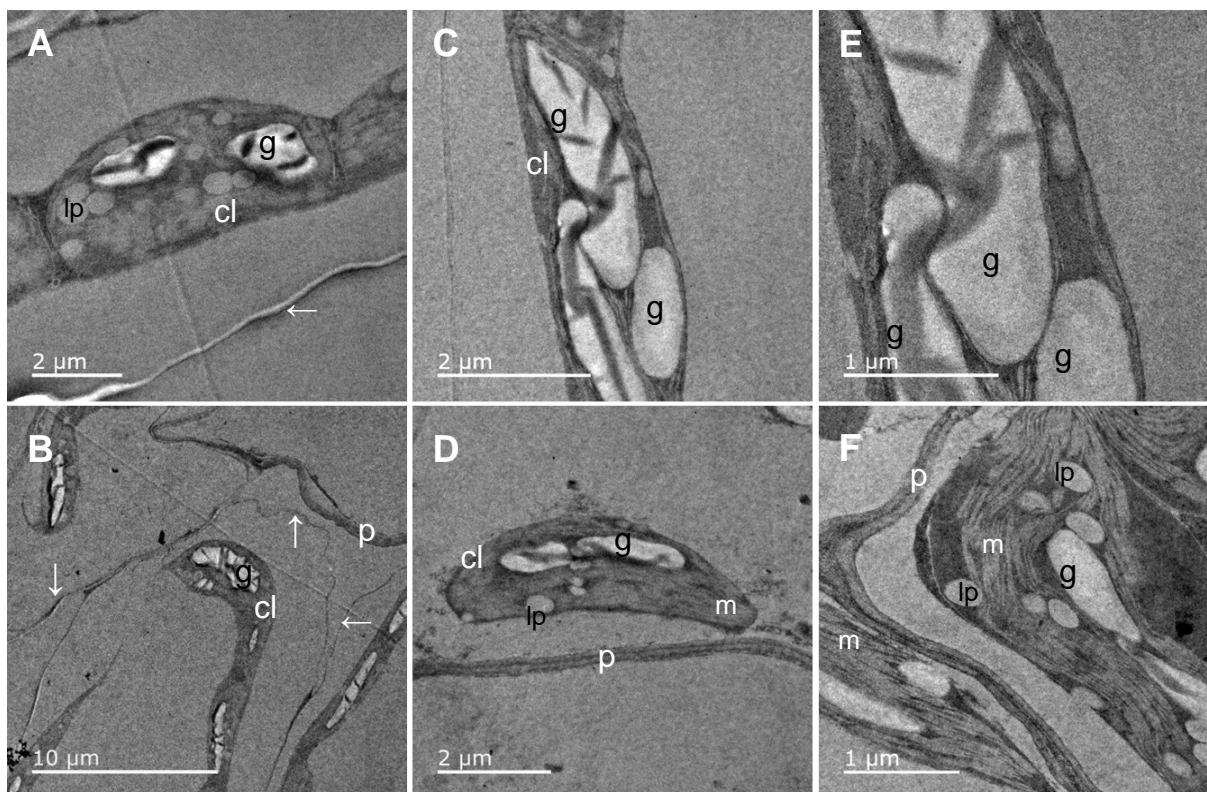


Figura 15. Micrografia eletrônica de transmissão dos cloroplastos dos genótipos de *Capsicum annuum* var. *annuum* e seus tratamentos. A - Genótipo suscetível (L11) com tratamento Hoagland. B - Genótipo suscetível (L11) com tratamento Hoagland e Metais. C e E - Genótipo resistente (UENF 1381) com tratamento Hoagland. D e F - Genótipo resistente (UENF 1381) com tratamento Hoagland e Metais. Legenda: cl - cloroplasto; g - grânulo de amido; p - parede celular; m - membranas tilacóides; seta - retração citoplasmática; lp - gotas de lipídeos.

Através microscopia eletrônica de transmissão, foi possível confirmar e observar as diferenças significativas na ultraestrutura dos cloroplastos. O indicativo de amido (grânulo de amido) pode ser observado, assim como a retração citoplasmática, membranas tilacóides e gotas de lipídeos. Há uma tendência dos cloroplastos do tratamento Hoagland ter mais amido em ambos genótipos na face adaxial (Figura 15, B) e menos no tratamento Hoagland e Metais na mesma face. Na face abaxial, verificou-se a mesma dinâmica. Estas estruturas são responsáveis pelo armazenamento e produção de energia para a planta, pois a circulação de substâncias pela planta requer um alto consumo de energia (Sant'Anna-Santos et

al., 2006). A estrutura e o tamanho dos cloroplastos mudaram em relação ao genótipo e ao tratamento. Alguns cloroplastos estão mais localizados próximos à parede celular (genótipo resistente) (Figura 15, D) e outros encontram-se mais dispersos no meio intracelular, estando paralelamente às paredes celulares (genótipo suscetível) (Figura 15, B), tendo efeito direto na eficiência fotossintética ou de redução de danos pelo excesso de luz, intensa atividade metabólica ou até mesmo falha na preparação das amostras.

As membranas tilacóides e as gotas de óleo, podem ser melhor observadas na face abaxial em tratamento com acréscimo de metais em ambos os genótipos, sendo maior no genótipo resistente (UENF 1381) (Figura 15, F).

Tabela 7. Absorção dos nutrientes ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) pela planta segundo Silva (2018).

Nutriente	Genótipo e Tratamento			
	SH	SHM	RH	RHM
Macro				
K	12,48	16,06	9,63	8,51
Mg	17,43	20,45	20,01	21,65
Ca	17,01	18,08	18,02	16,99
P	1,55	0,93	1,74	1,05
S	1,99	2,44	1,83	1,54
Na	0,43	0,54	0,11	0,15
Micro e Metais Potencialmente Tóxicos				
Fe	41,62	36,57	48,07	30,32
Mn	29,17	35,95	46,52	40,02
B	26,41	10,34	20,75	20,43
Mo	14,69	8,05	9,19	7,01
Zn	<LD	1,40	<LD	<LD
Ni	7,47	5,60	7,38	5,29
Cu	2,78	1,96	2,44	1,39
Cd	<LD	0,70	<LD	0,95
Co	<LD	3,00	<LD	3,81
Cr	0,95	2,74	1,08	2,49
Pb	<LD	8,45	<LD	8,97
Li	NA	NA	NA	NA

Legenda: SH ( L11 com Hoagland); SHM (L11 com Hoagland e Metais); RH (UENF 1381 com Hoagland); RHM (UENF 1381 com Hoagland e Metais) ; NA (não analisado) e; LD (Limite de Detecção).



De acordo com a Tabela 7 (Silva, 2018), pode-se observar que no genótipo resistente (UENF 1381) tratado com Hoagland com acréscimo de metais teve maior teor de metais potencialmente tóxicos, exceto o cromo em relação ao genótipo suscetível (L11).

## 5. CONCLUSÕES

O acréscimo de metais promoveu diferenças anatômicas e ultraestruturais em genótipo suscetível (L11) e genótipo resistente (UENF 1381) a *X. euvesicatoria*;

A solução nutritiva Hoagland com metais influenciou no aumento da frequência de estômatos nos dois genótipos, sugerindo aumento de suscetibilidade no genótipo resistente (UENF 1381);

O genótipo suscetível (L11) no tratamento com Hoagland apresentou cutícula mais espessa que o tratamento com metal, sugerindo aumento de resistência estrutural apesar da suscetibilidade genética, possivelmente devido aos metais acrescentados que inibiram a resposta do mecanismo de defesa estrutural;

O tratamento com Hoagland com acréscimo de metais no genótipo resistente, desenvolveu as espessuras dos parênquimas paliçádicos e lacunosos, portanto espera-se que tais folhas tenham maiores taxas fotossintéticas, sugerindo a diminuição do acúmulo de amido principalmente na superfície abaxial, observados no tratamento com Hoagland.

A estrutura e o tamanho dos cloroplastos mudaram em relação ao genótipo e ao tratamento. Os cloroplastos do genótipo resistente estão mais localizados próximos a parede celular, sugerindo um efeito direto na eficiência fotossintética e/ou intensa atividade metabólica.

O genótipo resistente (UENF 1381) tratado com Hoagland com acréscimo de metais absorveu um maior teor de metais potencialmente tóxicos, exceto o cromo em relação ao genótipo suscetível (L11), sugere que este fator influenciou no maior acúmulo de amido nos cloroplastos da superfície abaxial no genótipo resistente, provavelmente devido ao estresse causado pelos metais, a células responde aumentando as reservas de polissacarídeos, além do aumento da retração citoplasmática.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A. C. et al. Comparative study of capsaicinoid composition in *Capsicum* peppers grown in Brazil. *International Journal of Food Properties*, 19(6), p. 1292-1302, 2016.
- AGRIOS, G. N. Escape from disease. *Plant Disease-An Advanced Treatise-How Plants Defend Themselves*, 5, p. 18-35, 1980.
- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 5ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, p. 922, 2005.
- ANDRADE, S. A. L. D. Atenuação, pela associação micorrizica arbuscular, do estresse causado por cádmio em plantas, 2005.
- AHMAD, K.J. Cuticular studies in Solanaceae. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, v.42, p. 793-803, 1964.
- BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*. p. 643-654, 1981.
- BALDANI, V. L. D. et al. Técnicas microscópicas aplicadas na identificação e localização de bactérias fixadoras de nitrogênio e biomacromoléculas em tecidos vegetais. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p. 27, 1998.
- BARTZ, J. A.; Geraldson, G. M.; Crill, J. P. Nitrogen nutrition of tomato plants and susceptibility of the fruit to bacterial soft rot. *Phytopathology*, 69 (2), p. 163, 1979.
- BASHAIR, M.; Javed, N.; Atiq, M.; Wakil, W. Mineral profiling of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) inoculated with *Colletotrichum capsici* (Sydow), Butler and Bisby. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 26 (5), 2016.
- BENTO, C. S. et al. Resistências genéticas multiplas em *Capsicum* spp. *Genética e pesquisa molecular: GMR*, 16 (3), 2017.
- BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R.; Draxler, G. Functional leaf anatomy. Hall, D. O. et al. *Photosynthesis and production in a changing environment*. London: Chapenan e Hall. p. 91-112, 1993.
- BOUMAN, R. The ovule. In: JOHRI, B.M. (Ed.). *Embryology of angiosperms*. Berlin-Heidelberg; Springer-Verlag, 1984.

- BRAGA, T. R. et al. Caracterização físico-química de progênies de pimentas (*Capsicum frutescens* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata*, 112(1), p. 6-10, 2013.
- CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; Appezzato-da-Glória, B. Anatomia vegetal. UFV, Brasil, 2006.
- CASTRO, E. M. Alterações anatômicas, fisiológicas e fitoquímicas em plantas de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. p. 221, 2002.
- CEAGESP (2018) <http://www.ceagesp.gov.br/produtos/pimenta>. Acessado em 19 de fevereiro de 2018.
- CHEN, H. M.; Zheng, C. R.; Tu, C.; Shen, Z. G. Chemical methods and phytoremediation of soil contaminated with heavy metals. *Chemosphere*, 41(1-2), p. 229-234, 2000.
- CUTTER, E. Anatomia vegetal. Parte 1. Células e tecidos. São Paulo: Roca. p. 304, 1987.
- DAWES, C. J. Biological techniques in electron microscopy. New York: Barnes e Noble, p. 193, 1971.
- DÍAZ, J. et al. Indução de shikimat desidrogenase e peroxidase em mudas de pimenta (*Capsicum annum* L.) em resposta ao estresse do cobre e sua relação com a lignificação. *Plant Science*, v. 161, n. 1, p. 179-188, 2001.
- DOUMETT, S. et al. Heavy metal distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa*, in a pilot-scale assisted phytoremediation study: Influence of different complexing agents. *Chemosphere*, 72, p. 1481-1490, 2008.
- DYKSTRA, M. J. A manual of applied techniques for biological electron microscopy. New York: Plenum Press. p. 257, 1993.
- ELIAS, S. R. M.; Assis, R. M.; Stacciarini-Seraphin, E.; Rezende, M. H. Anatomia foliar em plantas jovens de *Solanum lycocarpum* A.St.-Hil. (Solanaceae). *Revista Brasil. Bot.*, v. 26, n. 2, p. 169-174, 2003.

- EMBRAPA Hortaliças. Sistemas de produção, 2 (2007). Disponível em: [https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta\\_capsicum\\_spp/doencas.html#virus](https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/doencas.html#virus). Acesso em 28 set, 2016
- EPSTEIN, E. Silicon. *Annual review of plant biology*, 50(1), p. 641-664, 1999.
- EVANS, H. J.; Sorger, G. J. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annual review of plant physiology*, 17 (1), p. 47-76, 1966.
- FORNAZIER, R. F. et al. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biologia Plantarum* 45, p. 91-97. 2002.
- GALIOVÁ, M. et al. Utilization of laser induced breakdown spectroscopy for investigation of the metal accumulation in vegetal tissues. *Spectrochim Acta B*. p. 1597-1605, 2007.
- GALIOVÁ, M.; Kaiser, J.; Novotný, K.; Hartl, M.; Kizek, R.; Babula, P. Utilization of laser-assisted analytical methods for monitoring of lead and nutrition elements distribution in fresh and dried *Capsicum annuum* L. leaves. *Microscopy research and technique*, 74 (9), p. 845-852, 2011.
- GARCÍA, C. C. et al. Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of botany*, 118 (1), p. 35-51, 2016.
- GUPTA, U.C. Micronutrientes e elementos tóxicos em plantas e animais. In: Ferreira, M. E. (Org.). Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura. Jaboticabal: POTAFOS, p. 13-42, 2001.
- GRAHAM, R. D. Efeitos do estresse nutricional na suscetibilidade de plantas à doença, com referência particular aos oligoelementos. *Avanços na pesquisa botânica* 10, p. 221-276, 1983.
- HAJIBOLAND, R. Efeito das deficiências de micronutrientes nas respostas ao estresse das plantas. Em resposta a estresse abiótico em plantas. Springer, Nova Iorque, NY, p. 283-329, 2012.
- HALL, J. L.; Hawes, C. Electron microscopy of plant cell. London: Academic Press. p. 466, 1991.
- HAYAT, M. A. Basic electron microscopy techniques. New York: UNR. p. 119, 1972.
- HOAGLAND, D. R.; Arnon, D. I. O método da cultura da água para o cultivo de plantas sem solo. Circular. Estação experimental agrícola da Califórnia, v. 347, n. 2, 1950.

- HU, J.; Zheng, A.; Pei, D.; Shi, G. Bioaccumulation and chemical forms of cadmium, copper and lead in aquatic plants, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2010.
- HUNZIKER, A. T. The Genera of Solanaceae Illustrated, Arranged According to a New System, Gantner, ARG. *Ruggell*, 500, 2001.
- JERBA, V. F.; Rodella, R. A.; Furtado, E. L. Relação entre a estrutura foliar de feijoeiro e a pré-infecção por *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, n.3, p. 217-223, 2005.
- JONES, J. B.; Woltz, S. S.; Jones, J. P. Effect of foliar and soil magnesium application on bacterial leaf spot of peppers. *Plant disease*, 67 (6), p. 623-624, 1983.
- JUNG, M. C. Heavy metal concentrations in soils and factors affecting metal uptake by plants in the vicinity of a Korean Cu-W mine. *Sensors*, 8 (4), p. 2413-2423, 2008.
- KANG, Z.; Buchenauer, H. Investigação ultraestrutural e imunocitoquímica do desenvolvimento de patógenos e respostas de hospedeiros em espigas de trigo resistentes e suscetíveis infectadas por *Fusarium culmorum*. *Patologia de Plantas Fisiológicas e Moleculares*, v. 57, n. 6, p. 255-268, 2000.
- KARNOVSK, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Vol. 27*. p. 137-138, 1965.
- KESSEL, R. G.; Shih, C. Y. Scanning electron microscopy in biology. New York: Springer-Verlag. p. 190, 1976.
- KIRKBY, E. A.; Römheld, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade. *Informações agronômicas*, 118(2), p. 1-24, 2007.
- KO, M. T.; Ahn, T. I.; Shin, J. H.; Son, J. E. Effects of Renewal Pattern of Recycled Nutrient Solution on the Ion Balance in Nutrient Solutions and Root Media and the Growth and Ion Uptake of Paprika (*Capsicum annuum* L.) in Closed Soilless Cultures, 32 (4), p. 463-472, 2014.
- KRÄMER, U. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current opinion in biotechnology*, 16 (2), p. 133-141, 2005.
- LAHNER, B. et al. Perfil de escala genômica de nutrientes e oligoelementos em *Arabidopsis thaliana*. *Nature biotechnology*, 21 (10), 1215, 2003.

- LEVANONY, H. et al. Localização ultraestrutural e identificação do Cz de *Azospirillum brasilense* sobre e dentro da raiz de trigo por marcação imuno-ouro. *Planta e solo*, v. 117, n. 2, p. 207-218, 1989.
- LIMA, M. L. P. et al. Stomatal patterns of *Capsicum* genotypes resistant or susceptible to *Oidiopsis haplophylli*. *Summa Phytopathologica*. v. 36. p. 25-29, 2010.
- LIMA, R. D. S. O complexo da mancha-bacteriana em *Capsicum* no Brasil: espécies e sua sensibilidade ao cobre. vi, 87 f., il. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- LIMA, W. Q. F. et al. Avaliação fitoquímica e antioxidante de plantas medicinais do Norte do Mato Grosso. Research Gate, Janeiro, 2013.
- LIU, X. Q. et al. Melhoria da absorção e redução de nitratos pelo tratamento com aminoácidos mistos em pimentão (*Capsicum annuum* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica Seção B-Solo e Plant Science*, v. 57, n. 2, p. 167-172, 2007.
- MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.
- MARSCHNER, H.; Römheld, V.; Kissel, M. Different strategies in higher plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of plant nutrition*, 9 (3-7), p. 695-713, 1986.
- MARSCHNER, H. Marschner's mineral nutrition of higher plants, vol. 89, 2012.
- MAÜSETH, J. D. Plant anatomy. Califórnia: Commings Publishing Co, 1988.
- METCALFE, C. R.; Chalk, L. Anatomia das Dicotiledôneas. Na The Clarendon Press, Oxford. Londres, 1950.
- MCGUIRE, R. G.; Kelman, A. *Erwinia carotovora* pv. *atroseptica*. *Phytopathology*, 76, p. 401-406, 1986.
- MENGEL, K.; Kirkby, E. A. Principles of Plant Nutrition, 5<sup>th</sup> ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2001.
- MEW, T. W.; Mew, I. C.; Huang, J. S. Scanning electron microscopy of virulent and avirulent strains on *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* on rice leaves. The American Phytopathological Society, v. 74, n. 6, p. 635-641, 1984.
- MILES, W. G.; Daines, R. H.; Rue, J. W. Presymptomatic egress of *Xanthomonas prunii* from infected peach leaves. *Phytopathology*, v. 67, p. 895-897, 1977.

- MOSCONE, E. A. et al. The evolution of chili peppers (*Capsicum-Solanaceae*): a cytogenetic perspective. In *VI International Solanaceae Conference: Genomics Meets Biodiversity 745*. p. 137-170, 2007.
- NETO, J. J. S. et al. Variabilidade em população base de pimenteiras ornamentais (*Capsicum annuum* L.) 1/Variability in a base population of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Revista Ceres*, 61(1), p. 84, 2014.
- NOVO, M. et al. Sulphur accumulation after *Verticillium dahliae* infection of two pepper cultivars differing in degree of resistance. *Plant pathology*, 56 (6), p. 998-1004, 2007.
- NWOKEM, C. O. et al. Determination of capsaicin content and pungency level of five different peppers grown in Nigeria. *New York Science Journal* 3: p. 17-21, 2010.
- OLIVEIRA, J. A. D. et al. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 2001.
- OTHMAN, Z. A. A. et al. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruit samples using high performance liquid chromatography. *Molecules*, 16(10), p. 8919-8929, 2011.
- PANDEY, V.; Ahmed, Z.; Kumar, N. Heterosis and combining ability in diallel crosses of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) *Veg. Sci*, v. 29, n. 1, p. 66-67, 2002.
- PASCHOLATI, S. F.; Leite, B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ, W.C. (Ed.). *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. Vol. II. Passo Fundo, RAPP, p.1-52, 1994.
- PASCHOLATI, S. F.; Leite, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.) *Manual de fitopatologia: princípios e conceitos*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v.1, p.193-217, 1995.
- PAULITZ, T.; Schroeder, K. L. Acid soils: how do they interact with root diseases? *Washington State University Extension*, p. 5, 2016.
- PEREIRA, G. J. G. et al. Atividade de enzimas antioxidantes em resposta ao cádmio em *Crotalaria juncea*. *Planta e solo*, v. 239, n. 1, p. 123-132, 2002.
- PINHEIRO, J. B. et al. Reação de genótipos de *Capsicum* ao nematoide-das-galhas. *Horticultura Brasileira*. Brasília, v.32, p. 371-375, 2014.

- PINTO, C. M. F.; de Oliveira Pinto, C. L.; Donzeles, S. M. L. Pimenta Capsicum: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial para o agronegócio. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 3 (2), 2013.
- PITSCHMANN, V.; Hon, Z. Military importance of natural toxins and their analogs. *Molecules*, 21(5), p. 556, 2016.
- POTNIS, N. et al. Mancha bacteriana de tomate e pimenta: diversas espécies de anthomonas X com uma ampla variedade de fatores de virulência, representando um desafio mundial. *Patologia de plantas moleculares*, v. 16, n. 9, p. 907-920, 2015.
- RAMOS, L. J.; Narayanan, K. R.; Mcmillan, R. T. Association of stomatal frequency and morphology in *Lycopersicon* species with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Plant Pathology*, v. 41, p. 157-164. 1992.
- RAMOS, J. L. et al. Mecanismos de tolerância a solventes em bactérias gram-negativas. *Revisões Anuais em Microbiologia*, v. 56, n. 1, p. 743-768, 2002.
- RAVEN P. H. *Biology of plants*. New York: Worth Publisher, p. 728, 1996.
- REINA-PINTO, J. J.; Yephremov, A. Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiology and Biochemistry*. p. 540–549, 2009.
- REIS JR, R. A. Produção, qualidade de tubérculos e teores de potássio no solo e no pecíolo de batateira em resposta à adubação potássica. Tese de Mestrado. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, p. 115, 1995.
- ROACH, R. et al. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. *European Journal of Plant Pathology*, v. 150, n. 3, p. 595-608, 2018.
- RUSCITTI, M.; Ronco, M.; Beltrano, J. Inoculation with mycorrhizal fungi modifies proline metabolism and increases chromium tolerance in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Brazilian Journal plant Physiology*, v. 23, n. 1, p. 15-25, 2015.
- SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; Thadeo, M.; Meira, R. M. S. A.; Ascensão, L. Anatomy and histochemistry of stem secretory structures of *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). *Revista Árvore*. p. 481-489, 2006.



- SCHMELZER, E. Cell polarization, a crucial process in fungal defence. Trends in Plant Science, 2002.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; Stangarlin, J. R.; Pascholati, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati, S.F.; Leite, B. & Stangarlin, J.R.; Cia, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno - Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248, 2008.
- SHAH, N. P. Functional foods from probiotics and prebiotics. Food technol., Chicago, v. 55, n. 11, p. 46-52, 2001.
- SIDHU, G. P. S. Physiological, biochemical and molecular mechanisms of zinc uptake, toxicity and tolerance in plants. *Journal of Global Biosciences*, 5 (9), p. 4603-4633, 2016.
- SILVA, A. C. et al. Extrato vegetal, fosfito e sulfato de zinco no controle do oídio em eucalipto. *Revista Ciência Agronômica*, 47 (1), p. 93-100, 2016.
- SILVA, A. P. S. Perfil mineral em folhas de *Capsicum annum* var. *annuum* de um genótipo resistente e outro suscetível a *Xanthomonas euvesicatoria*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes/RJ, 2018.
- SIMMONS, A. T. et al. Trichomes of *Lycopersicon* spp. and their effect on *Myzus persicae* (Sulzer), Hemiptera: Aphidae. *Austr. J. Entomol.*, v. 42, p. 373–378, 2003.
- SOARES, A. M. S. e Machado, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*, 1(1), p. 10, 2007.
- STALL, R. E.; Jones, J. B.; Minsavage, G. V. Durability of resistance in tomato and pepper to Xanthomonads causing bacterial spot. *Annu Rev Phytopathol.* 47, p. 265-284, 2009.
- STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. *Scientia Agraria Paranaensis*, v. 10, n. 1, p. 18, 2011.
- STEFANOV, K. L. et al. Efeito de íons de chumbo sobre a atividade dos lipídios e complexos antioxidantes de folhas, pericarpo e sementes de *Capsicum annum* L. *Jornal da Ciência da Alimentação e Agricultura*, v. 67, n. 2, p. 259-266, 1995.

- STUIVER, C. E. E. et al. Zinc exposure has differential effects on uptake and metabolism of sulfur and nitrogen in Chinese cabbage. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177 (5), p. 748-757, 2014.
- TAIZ, L.; Zeiger, E. Fisiologia vegetal 5ª ed. *Porto Alegre: Editora Artmed*. 2013.
- TOFOLI, J. G. *Ação de fungicidas e indutores de resistência no controle da requeima e pinta preta na cultura da batata*. Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2011.
- TOFOLI, J. G.; Mello, S. C.; Domingues, R. J. Effect of potassium phosphite alone and in mixture with fungicides on the control of late blight in tomato crop. *Arquivos do Instituto Biológico*, 79 (2), p. 201-208, 2012.
- VANDEN BOSCH, K. A. Light and electron microscopic visualization of uricase by immunogold labelling of sections of resin-embedded soybean. *Journal of Microscopy*, Oxford, v.143, p.187-197, 1986.
- VITÓRIA, A. P.; Lea, P. J.; Azevedo R. A. Antioxidante enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, v. 57, p. 710-715, 2001.
- WAHOCHO, N. A. et al. Growth and productivity of Chilli (*Capsicum annum L.*) under various nitrogen levels. *Science International*, 28 (2), 2016.
- WATSON, R. W. The effect of cuticular hardening on the form of epidermal cells. *New Phytol.* v. 41, p. 223-229, 1942.
- WHITE, P. J. Ion uptake mechanisms of individual cells and roots: short-distance transport. *Marschner's mineral nutrition of higher plants, 3rd edn. Academic, London*, p. 7-47, 2012.
- WILLIAMS, J. S. et al. Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiology*, 128(1), p. 150-159, 2002.
- WOLDRINGH, C. L. Effect of cations on the organization of the nucleoplasm in *Escherichia coli* prefixed with osmium tetroxide or glutaraldehyde. *Citobiologie*, v.8, p. 97-111, 1973.
- ZAMBOLIM, L.; Ventura, J. A. Resistência induzida pela nutrição mineral das plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo*, 1, p. 275-318, 1993.

- ZHAO, H. et al. Small RNA profiling reveals phosphorus deficiency as a contributing factor in symptom expression for citrus huanglongbing disease. *Molecular plant*, 6(2), p. 301-310, 2013.
- ZHOU, L. et al. Overexpression of GmAKT2 potassium channel enhances resistance to soybean mosaic virus. *BMC plant biology*, 14 (1), p. 154, 2014.