

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

Análise histopatológica e perfil protéico de lesões causadas pelo
Citrus leprosis virus tipo nuclear e citoplasmático
em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

João Paulo Rodrigues Marques

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica de Plantas

Piracicaba
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

João Paulo Rodrigues Marques

Biólogo

**Análise histopatológica e perfil protéico de lesões causadas pelo
Citrus leprosis virus tipo nuclear e citoplasmático em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck**

Orientador:

Profa. Dra. **BEATRIZ APPEZZATO-DA-GLÓRIA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de
Plantas

**Piracicaba
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Marques, João Paulo Rodrigues

Análise histopatológica e perfil protéico de lesões causadas pelo Citrus Leprosis virus tipo nuclear e citoplasmático em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck / João Paulo Rodrigues Marques. - - Piracicaba, 2008.

86 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Anatomia vegetal 2. Fitopatologia 3. Frutas cítricas 4. Leprose I.Título

CDD 634.3
M357a

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais que, além do carinho, deram a oportunidade de estudos durante toda a minha vida, ofereço este trabalho.

Dedico este trabalho a Dionísio Tiveron.
Homem sábio que me ensinou o sentido da Dignidade.
(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória pela amizade, dedicação, confiança depositada à minha pessoa e por introduzir a Anatomia Vegetal em minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro através do Projeto Temático (processo 00/11805-0), pela concessão da bolsa de estudos na Iniciação Científica (processo 03/05563-1) e no Mestrado (06/5492-6).

Ao Departamento de Ciências Biológicas (ESALQ/USP), pelas condições fornecidas para a execução deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, por ter possibilitado a realização do presente trabalho e pela concessão da bolsa de Mestrado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de um ano.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima, coordenador do Projeto Temático (processo 00/11805-0), por possibilitar o meu ingresso nesta área tão fascinante que é a Histopatologia Vegetal, e pelo acesso facilitado e ajuda com a Microscopia Eletrônica.

Ao Prof. Dr. Murilo de Melo pela amizade, consideração e orientação nas análises bioquímicas.

À Dra. Juliana de Freitas-Ástua, pela amizade, pelo fornecimento dos materiais inoculados e pelas trocas de idéias ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. César Martins Chagas pelo auxílio no meu crescimento profissional com valiosas sugestões à minha pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Holger Wenzel Flechtman por ter me ensinado os valores da pesquisa acadêmica e ter me assistido sobre os Ácaros Tenuipalpídeos.

Ao Prof. Dr. Jorge Marques Resende por abrir as portas do seu laboratório quando eu mais precisei.

À farmacêutica Sra. Marli K. M. Soares, técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP, pela amizade e pelo apoio técnico durante as atividades práticas.

Ao biólogo Vandeclei Rodrigues funcionário do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, por ter me ajudado com a inoculação das plantas, pessoa de grande importância no meu trabalho.

Aos alunos de Pós-Graduação em Fitopatologia, Maurício e André Beltrame, pela ajuda e paciência durante as análises bioquímicas.

Aos técnicos Antonio Francisco de Campos Amaral (CEBTEC) e José Edivaldo Buriolla (Virologia Vegetal) por terem me auxiliado em seus respectivos laboratórios no desenvolvimento da minha pesquisa.

A todos os colegas da Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ e em Fitopatologia da ESALQ pelo auxílio, amizade e pelos momentos de descontração.

À eficientíssima e simpática secretária da Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ, Sra. Maria Solizéte Granzioil Silva.

Às minhas estimadas colegas de trabalho Dra. Adriana Hissae Hayashi, Dra. Juliana Fernando, Graziela Cury, Aline Redondo Martins, Renata Takassugui Gomes, Aline Bombo, Anielca Soares, Maysa Carvalho, Juliana Mayer e Magda Tessmer, e aos colegas Dr. Luiz Sacramento e João Marcelo Silva, importantes pessoas que me auxiliaram direta e indiretamente no desenvolvimento do meu trabalho.

À Leonide Zulato Tiveron pelo carinho e por sempre me ensinar os reais valores da vida.

Aos amigos Vitor Drumond Mariani (Vitão), Luiz Eduardo (Pite), Guilherme Sacilotto (Guilhermondés), Ivan Barbosa (Balão), Moacir (Buiu), Hermano (Hermanovsky) e Alvari da Silva Filho (Pico).

Aos colegas da turma da Biologia 2005 (UNIMEP), em especial, à Eliane (Lí), Raphael Almeida (Rapha), Marcio Damasceno (Grange Marcião), Rubens Luiz Coelho (Binho) pela valiosa amizade que fiz e carrego comigo.

À minha família, e em especial, à Aricelis Biscaro Mela, por ser uma das minhas fontes de inspiração e por me consolar nas horas mais difíceis.

**“Fraquejar, às vezes.
Desistir jamais”**

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
Referências.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Histórico sobre a Leprose dos Citros.....	15
2.2 O ácaro vetor.....	18
2.3 Histopatologia de plantas infectadas por vírus.....	19
Referências.....	20
3 LESÕES FOLIARES E DE RAMOS DE LARANJEIRA-DOCE CAUSADAS PELA LEPROSE-DOS-CITROS	24
Resumo.....	24
Abstract.....	24
3.1 Introdução.....	25
3.2 Material e Métodos.....	26
3.3 Resultados e Discussão.....	28
3.4 Considerações Finais.....	40
Referências.....	40
4 COMPARAÇÃO ENTRE AS LESÕES CAUSADAS PELA LEPROSE DO TIPO CITOPLASMÁTICA E NUCLEAR EM CITROS	43
Resumo.....	43
Abstract.....	43
4.1 Introdução.....	44
4.2 Material e Métodos.....	45
4.3 Resultados e Discussão.....	48
4.4 Considerações Finais.....	62
Referências.....	62

5 ANATOMIA DAS LESÕES CAULINARES CAUSADAS PELA LEPROSE DOS CITROS	67
Resumo.....	67
Abstract.....	67
5.1 Introdução.....	68
5.2 Material e Métodos.....	69
5.3 Resultados e Discussão.....	70
5.4 Considerações Finais.....	78
Referências.....	78
6 CONSIDERAÇÃO FINAL.....	81
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	82
ANEXOS.....	83

RESUMO

Análise histopatológica e perfil protéico de lesões causadas pelo *Citrus leprosis virus* tipo nuclear e citoplasmático em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

A leprose dos citros é uma doença de grande importância econômica aos citricultores, devido aos prejuízos por ela causados. A doença provoca lesões localizadas nos ramos, frutos e folhas e pode causar grandes perdas aos pomares não tratados. A leprose dos citros possui etiologia viral sendo o vírus denominado *Citrus leprosis virus* (CiLV). Atualmente, atribuí-se a leprose dois tipos de vírus que causam sintomas morfológicos e citopatológicos distintos: o tipo nuclear (CiLV-N) e o tipo citoplasmático (CiLV-C). O presente trabalho teve como objetivo investigar as alterações anatômicas e comparar o perfil protéico entre as lesões causadas pelos dois tipos de vírus em laranjeira-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Para as análises anatômicas foram coletadas amostras de tecidos sadios e de tecidos lesionados. As amostras foram fotografadas e em seguida fixadas em solução de Karnovsky, desidratadas em série etílica, infiltradas em resina hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historesin), seccionadas em micrótomo rotativo a 5-7 μm de espessura, coradas com azul de Toluidina para as análises histológicas usuais. Também foram realizados testes histoquímicos para fenóis, compostos pécnicos, proteína e lipídios. A captura de imagens digitais dos materiais preparados em lâminas foi realizada em microscópio equipado com câmera de vídeo. Para a análise do perfil protéico as amostras coletadas foram imediatamente criofixadas em nitrogênio líquido e armazenadas em refrigerador a -80°C para posterior extração protéica. As proteínas extraídas foram quantificadas e depois separadas por eletroforese em gel de policrilamida. As lesões foliares se iniciaram como pontuações necróticas, envolvidas por halos cloróticos que limitam o crescimento da lesão. Nos ramos, ocorreram dois tipos de lesões com fendas. As lesões de ramos e de folhas provenientes do campo com sintomas de CiLV-C apresentaram similaridades com as amostras inoculadas. No caso das lesões foliares causadas pelo CiLV-N observa-se a presença de três regiões distintas: o centro necrótico, o halo intermediário e o halo clorótico. As lesões nos frutos de ambos os tipos de leprose eram distintas. Ductos traumáticos gomosos foram observados nos ramos infectados pelo CiLV-C e nos feixes vasculares de folhas e frutos infectados pelo CiLV-N. Quanto ao perfil protéico, verificou-se um aumento na concentração protéica nos tecidos infectados, em especial, nas lesões causadas pelo CiLV-N. Foi possível observar que havia um padrão anatômico e histoquímico nas lesões causadas pela leprose em laranjeira doce independente do tipo de vírus, pois em todas as lesões foi verificada hipertrofia e hiperplasia celular, plasmólise, a redução de grãos de amido, o acúmulo de compostos lipídicos nas células da área necrosada e a presença de um halo, ao redor dessa área, constituído de células que acumulam proteínas.

Palavras-chave: Leprose dos citros; Histopatologia; *Citrus sinensis*

ABSTRACT

Histopathological analysis and proteic profile of lesions caused by Citrus leprosis virus nuclear and cytoplasmatic type in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

The citrus leprosis of citrus has been considered a disease of great economic importance to citrus producers due to the damage that it causes. The disease is responsible for lesions found in the twigs, leaves and fruits, and it may cause great losses to the untreated orchards. The citrus leprosis has viral etiology being the virus called Citrus leprosis virus (CiLV). Currently, there are two types of virus attributed to leprosis that cause different morphological and cythopatological symptoms: the nuclear (CiLV-N) and cytoplasmic type (CiLV-C). This study aimed to investigate the anatomical changes and to compare the proteic profile between the injuries caused by two types of virus in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. For anatomical analyses healthy tissue and different lesions were photographed and then fixed in Karnovsky solution, dehydrated in a graded ethylic series, embedded in hidroxy-ethyl methacrylate resin (Leica Historessin), sectioned (5 µm thick), stained and mounted in synthetic resin. The digital images were capture in a microscope with video camera. For the analysis of protein profiles the samples were collected and immediately cryofixed in liquid nitrogen and stored in the refrigerated - 80 ° C. The proteins were extracted, quantified and then separated by gel electrophoresis of polyacrylamide gel. Foliar lesions began as necrotic spots surrounded by a yellow halo that inhibited the lesion expansion. The twigs presented two different lesions: depressed ones and pustules with ruptures. The collected-field lesions of leaves and twigs showed that symptoms of CiLV-C had a certain similarity with the inoculated samples. In the case of foliar lesions caused by CiLV-N there was the presence of three different regions: the necrotic center, the intermediate halo and chlorotic halo. The fruit lesions caused by both types of leprosis virus were different. Ductos traumáticos gomosos foram observados nos ramos infectados pelo CiLV-C e nos feixes vasculares de folhas e frutos infectados pelo CiLV-N. Gummous traumatic ducts in twigs infected by CiLV-C and in the vascular bundles of fruit and leaves infected with CiLV-N were observed. In the proteic profile, there was an increase in protein concentration in the infected tissues especially for injuries caused by CiLV-N. It was possible to observe that there was an anatomical and histochemical pattern in the lesions caused by leprosis in sweet orange independently of the type of virus, therefore in all the injuries was verified hyperplasia, hypertrophy, cell plasmolysis, the reduction of starch grains, the accumulation of lipids compounds in the cells of the necrotic areas and the presence of a halo, surrounding that area, constituted by cells that accumulate proteins.

Keywords: Citrus leprosis; Histopathology; *Citrus sinensis*

1 INTRODUÇÃO

A citricultura tem um papel preponderante na economia nacional atual, contribuindo com mais de US\$1 bilhão/ano em divisas graças às exportações de suco. Além de ter um papel social enorme ao gerar milhares de empregos diretos e indiretos. O Brasil é atualmente o maior produtor mundial, seguido dos EUA, sendo São Paulo o estado com maior participação, seguido pelos estados da Bahia e Sergipe (FNP, 2007). Contudo, a produtividade dos citros ainda é baixa dada a uma série de fatores, dentre os quais os fitossanitários representam uma parcela significativa. Em particular as viroses desempenham papel importante, tendo sido registradas na literatura mundial dezenas delas, algumas atuando como fator limitante para produção de citros.

A leprose dos citros é considerada uma das mais importantes viroses que afetam a produtividade de citros no Brasil. Os danos por ela causados depreciam o valor comercial dos frutos vendidos *in natura* além de afetar as plantas severamente infectadas. A doença se destaca pelos prejuízos que causa quando não prevenida através do controle do ácaro vetor. Apenas no estado de São Paulo, este controle pode atingir cifras da ordem de US\$60-80 milhões/ano, podendo, chegar a US\$ 100 milhões em nível nacional (RODRIGUES et al., 2003), o que representa cerca de 10 a 15% no custo de produção da laranja (FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA, 2004).

A leprose dos citros é a virose transmitida pelo ácaro *Brevipalpus* que possui maior interesse econômico. Trata-se de uma virose que se caracteriza pelo surgimento de lesões cloróticas/anelares nas folhas, lesões corticosas nos ramos e lesões deprimidas cloróticas/pardas nos frutos. Em caso de infecções pesadas há um intenso desfolhamento, queda prematura dos frutos e morte dos ramos, podendo a doença causar nas folhas um déficit ou elevação na concentração de alguns nutrientes (NOGUEIRA et al., 1996). Se não houver cuidados posteriores, a planta pode morrer em alguns anos (BITANCOURT, 1955; RODRIGUES et al., 2003). Hoje se sabe que a leprose é causada por um vírus localizado na região da lesão e que não

se torna sistêmico e é transmitido, no Brasil, pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae).

A doença apresenta dois tipos distintos de sintomas que são causados por dois vírus, o tipo nuclear e o tipo citoplasmático. A leprose do tipo nuclear é causada por um vírus situado no interior do núcleo celular, e a leprose do tipo citoplasmática é causada por um vírus presente no retículo endoplasmático da célula.

Os danos causados pela leprose dos citros ainda não haviam sido investigados no âmbito de se compreender o comportamento dos tecidos vegetais frente à presença do patógeno, sendo este um trabalho inédito e de grande importância para o entendimento da relação planta-patógeno para o patossistema leprose dos citros.

Este trabalho teve por objetivo descrever as principais alterações anatômicas nas folhas, ramos e frutos da laranjeira-doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) 'Pêra' causadas pelos dois tipos de vírus da leprose visando à compreensão das possíveis causas que levam a restrição do crescimento das lesões, assim como o confinamento dos vírus às áreas lesionadas.

O perfil protéico dos diferentes tecidos lesionados foi investigado, visando observar a alteração na quantidade protéica (se alguma) e ainda uma distinção dentre estas proteínas a fim de apresentar uma forma alternativa de distinguir os dois tipos de leprose.

Referências

BITANCOURT, A.A. Estudos sobre a leprose dos *Citrus*. I. Distribuição geográfica e sintomatologia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 22, p. 161-184, 1955.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. Citrus. In: _____. **Agrianual**: anuário da agricultura brasileira. São Paulo, 2007. p. 227 -297.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Manual de leprose**. Araraquara: FUNDECITRUS, 2004. 8 p.

NOGUEIRA, N.L.; RODRIGUES, J.C.V.; CABRAL, C.P. Influence of *Citrus* leprosis on the mineral composition of *Citrus sinensis* leaves. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 53, n. 2/3, p. 354-355, 1996.

RODRIGUES, J.V.C.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M.; MACHADO, M.A. *Citrus* leprosis. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 161-179, 2003.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da Leprose dos Citros

A leprose foi descrita inicialmente pelos sintomas nos ramos (“scaly bark”) e nos frutos (“nail head rust”) e sua etiologia foi controversa no início (BITANCOURT, 1955; FAWCCETT, 1936; KNORR; PRATTE, 1954).

Segundo Bitancourt (1955) o primeiro relato da leprose dos citros ocorreu na Flórida, EUA, no início do século XX, por H. H. Hume, ainda Bitancourt comenta que a leprose dos citros, na Flórida, deve ter sido uma doença grave, tendo em vista os numerosos trabalhos publicados na primeira metade do século XX. No Brasil a leprose foi primeira mente mencionada em 1934 por Bitancourt em seu livro “As Manchas das Laranjas”. Posteriormente, em 1955, Bitancourt apresentou uma série de trabalhos que revelavam as principais características das lesões causadas pela leprose dos citros em plantas de laranjeira, assim como uma série de experimentos sobre o controle da doença. Porém, pouco se sabia a respeito do agente causador da doença. Fawccett (1936) sugeria que a doença era causada por um fungo do gênero *Cladosporium* sp. Em 1945, uma enfermidade de sintomatologia similar, descrita na Argentina e Paraguai como “lepra explosiva”, foi demonstrada ser transmitida pelo ácaro *Tenuipalpus pseudocuneatus* (*Brevipalpus obovatus*) (VERGANI, 1945). No Brasil, Musumecchi e Rossetti (1963) apresentaram evidências de que *Brevipalpus phoenicis* era o vetor da leprose. Knorr (1968) demonstrou nos EUA que a doença era transmissível pelo *B. phoenicis*, *B. obovatus* e *B. californicus*.

A doença aparentemente ocorre apenas no continente americano e, no momento, encontra-se registrada em vários países da América do Sul (Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai, Colômbia e Venezuela) e Central (Panamá, Costa Rica, Honduras e Guatemala). Há relatos de Fawcett (1936) da presença de leprose no sudeste asiático (Índia, Ceilão e Java), Japão, baixo Egito e África do Sul, mas não existem confirmações.

Nos EUA a doença desapareceu nas décadas de 20 e de 30 possivelmente devido à conjugação da introdução do uso de enxofre como acaricida e sucessivas geadas (CHILDERS et al., 2003). Contudo, hoje com o aparecimento da leprose na América Central, há temores de que a leprose reinfecte pomares americanos (RODRIGUES et al., 2003).

A transmissão da leprose por ácaros sugeria fortemente sua etiologia viral, mas defendia-se também a idéia de que as lesões seriam decorrentes de toxinas injetadas pelos ácaros no ato da alimentação. A tese de vírus teve um reforço com a demonstração de que lesões de ramos enxertados propagavam-se ao tecido sadio receptor (KNORR, 1968) e pela detecção de partículas similares a vírus nos tecidos das lesões por microscopia eletrônica (KITAJIMA et al., 1972). Outro avanço importante foi feito em 1995, quando Colariccio et al. conseguiram a transmissão mecânica da leprose de *Citrus* para *Citrus* e para algumas hospedeiras herbáceas. Oficializou-se assim a causa da leprose como viral sendo o vírus formalmente designado pelo International Committee on Taxonomy of Virus (ICTV) de Citrus leprosis virus sendo sua sigla designada como CiLV. Neste mesmo trabalho, descreveram-se partículas nos tecidos, por microscopia eletrônica, distintas daquelas relatadas por Kitajima et al. em 1972. Neste mesmo trabalho os autores sugerem que o CiLV é um vírus pertencente ao grupo dos Rhabdovírus, devido à sua morfologia .

Segundo Bastianel et al. (2006) atualmente se aceita que a leprose apresenta dois tipos de sintomas os quais são causados por dois vírus distintos morfologicamente e com sintomas citopatológicos distintos: **nuclear-** como descrito por Kitajima et al. (1972) em que as partículas são em forma de bastonetes curtos, que ocorrem no nucleoplasma ou citoplasma, comumente associadas perpendicularmente às membranas (retículo endoplasmático ou envelope nuclear) e ocorre a presença de um viroplasma nuclear. Este tipo é referido como CiLV-N; **citoplasmático-** como descrito em Colariccio et al. (1995), em que as partículas são baciliformes, curtas, providas de membrana e ocorrem no lume do retículo endoplasmático, havendo uma massa densa (viroplasma) no citoplasma. É designado de CiLV-C (BASTIANEL et al., 2006). Outro avanço foi a identificação da presença do CiLV-C nos tecidos do *B. phoenecis* feita por Rodrigues (1995).

A respeito da “lepra explosiva”, doença relatada por Bitancourt (1995) como apresentando sintomatologia similar à Leprose dos Citros, Kitajima et al. (1974) realizaram análises ultra-estruturais e constataram a presença de partículas baciliformes presentes no retículo endoplasmático de células infectadas que se assemelham com àquelas descritas para a leprose dos citros.

Em 2005, Locali et al. obtiveram a seqüência completa do genoma do CiLV-C que, apesar de ter morfologia baciliforme, não apresenta qualquer similaridade com *Rhabdovirus* e

sim com membros dos gêneros *Furovirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus* entre outros, com representantes apresentando genomas de RNA de fita simples, senso positivo.

Recentemente foi realizado outro seqüenciamento do CiLV-C sendo verificado um vírus bipartido com seqüência similar ao ss (RNA) (+). O RNA 1 contém gene para uma putativa poliproteína replicase e uma ORF (Open Read Frame) sem função reconhecida. O RNA 2 apresenta 4 ORFs: a p15, p24, p61 (proteínas sem similaridades com as demais conhecidas) e p32 que é similar às proteínas de movimento dos vírus (PASCON et al., 2006). Segundo os autores a comparação da proteína replicase com as demais, pôde incluir o CiLV-C como membro dos Tobamovírus (grupo do *Tobacco Mosaic virus*). Atualmente vem sendo sugerido que o CiLV-C pode ser agrupado em um novo gênero denominado *Cilevirus* (LOCALI et al., 2006).

Outro progresso recente foi obtido por Locali et al. (2003) que, baseados nos trabalhos originais de Rodrigues (2000), obtiveram dsRNA de lesões de leprose. A partir desse dsRNA, produziu-se uma biblioteca genômica e dentre numerosas seqüências conseguiram-se duas que tinham similaridade com aquelas de vírus conhecidos (regiões codificadoras de replicase e proteína de movimento). Produziram-se primers que amplificaram eficiente e especificamente fragmentos de DNA por RT-PCR e que têm sido utilizados na diagnose da doença (FREITAS-ASTÚA et al., 2004; GÓMEZ et al., 2005).

Recentemente Freitas-Astúa et al. (2007) descreveram a expressão dos genes durante a inoculação do CiLV-C por ácaros virulíferos e verificaram diversos genes que podem estar relacionados com o metabolismo e com a defesa da planta, porém nada foi concluído a respeito da expressão de genes ligados às respostas de hipersensibilidade.

Estudos sobre a distribuição do vírus (tipo citoplasmático) nas células infectadas do mesófilo de *Citrus sinensis*, apresentados por Gomes et al. (2004), demonstram que as lesões menores (iniciais) apresentam todas as camadas de células contendo partículas baciliformes no retículo endoplasmático e/ou viroplasma, mas células do parênquima vascular raramente aparecem infectadas. Já em lesões maduras o número de células infectadas cai e, quando presentes, restringem-se ao parênquima lacunoso. Células hipertrofiadas e que sofreram hiperplasia comumente não apresentam o vírus.

2.2 O ácaro vetor

Segundo Flechtman et al. (1995) o *Brevipalpus phoenicis* (espécie de maior importância econômica no Brasil) é encontrado nas regiões tropicais de todo o mundo e no interior de casas de vegetação, em regiões de clima frio. São características dessa espécie: ovos alaranjados com cerca de 0,1 por 0,06mm; larva hexápoda com tonalidade alaranjada medindo cerca de 0,13 por 0,08 mm; protoninfa semelhante à larva, porém esta possui quatro pares de pernas e um tamanho maior; deutoninfa de morfologia semelhante à protoninfa chega a medir 0,32 por 0,17 mm. A fêmea desta espécie chega a medir 0,3 por 0,18mm e possui coloração variável de acordo com a idade, alimento e condições de temperatura. Geralmente as fêmeas apresentam manchas escuras; o macho tem o corpo afilado dorsalmente e não apresenta manchas escuras. Recentemente verificou-se que a feminização dos indivíduos de *B. phoenicis* pode estar correlacionada com a presença de uma bactéria endossimbionte do gênero *Cardinium* sp. Tal bactéria ocorre em todo o corpo do ácaro, incluindo pernas e palpos e sua distribuição é altamente variável entre indivíduos incluindo os diferentes instar e órgãos (KITAJIMA et al., 2007).

Segundo Primiano et al. (2004) a fase adulta do ácaro tem maior importância, devido à sua maior mobilidade e longevidade, fatores que aumentam a chance de contaminação e transmissão da doença. A expansão da doença depende do aumento da população do ácaro vetor, logo o aumento de sintomas deve coincidir com a época de maior sobrevivência e reprodução do ácaro.

Segundo Rodrigues et al. (2003) há três espécies de ácaros tenuipalpídeos capazes de transmitir a leprose dos citros: *Brevipalpus phoenicis*, *B. obovatus*, *B. californicus*. A primeira é responsável por transmitir a virose no Brasil, e as outras duas na Argentina e Estados Unidos, respectivamente.

O *B. phoenicis* atua como vetor de viroses em uma ampla gama de hospedeiras, podendo destacar culturas de grande interesse econômico como *Citrus*, café, maracujá e orquídeas, mas também causa doenças em plantas ornamentais como *Hibiscus* sp., *Malvaviscus* sp., *Chenopodium* sp., *Clerodendron* sp., *Ligustrum* sp., *Solanum* sp. dentre outras espécies herbáceo-arbustivas. Vale destacar que em todas as espécies infectadas os sintomas aparecem como lesões localizadas com pontuações necróticas ou apenas clorose, podendo aparecer como lesões verdes em folhas senescentes (KITAJIMA et al., 2003).

Nunes et al. (2004) demonstraram a transmissibilidade do vírus da leprose de laranjeira para plantas daninhas e de volta para laranjeiras. Ainda não se sabe qual a relevância epidemiológica (se alguma) destes resultados, mesmo assim tais resultados sugerem que o vetor da leprose pode possuir uma ampla gama de hospedeiros.

2.3 Histopatologia de plantas infectadas por vírus

As plantas infectadas por vírus apresentam alguns sintomas patológicos básicos, tais como a morte celular (necrose) ou a intensificação (hipertrofia e hiperplasia) ou inibição (hipoplasia) do crescimento e diferenciação celular, os quais podem agir isoladamente ou em conjunto (ESAU, 1938). Segundo a autora, as lesões necróticas podem estar correlacionadas ou não com a hipertrofia e a hiperplasia, sendo que tais alterações histológicas variam em ordem e intensidade dentre as viroses que atacam as plantas.

As alterações anatômicas ocasionadas por uma lesão clorótica (estágio onde as inclusões virais são produzidas) podem ter duas causas: a degeneração do floema e a deficiência de cloroplasto no mesofilo (ESAU, 1956, 1961). Essas alterações nos tecidos relacionados são resultantes dos métodos de transmissão dos vírus, das mudanças anatômicas nas plantas hospedeiras e da translocação dos vírus nas plantas (ESAU, 1961).

Segundo Esau (1967), nas folhas inoculadas a necrose inicia-se com o colapso das células epidérmicas, enquanto as células do parênquima paliçádico apresentam citoplasma granuloso denso, dissolução da parede e plastídios agrupados, os quais eventualmente perdem a sua identidade. A necrose no parênquima lacunoso causa o colapso das nervuras menores. Nos feixes vasculares, primeiramente ocorre a necrose das células pertencentes à bainha do feixe, subseqüentemente no floema imaturo, e só então nos tecidos vasculares xilemático e floemático já diferenciados.

Em 1967, Esau relata a importância dos sintomas anatômicos como um reforço para o agrupamento das viroses em dois tipos: viroses causadas por vírus que estão em toda parte da planta (sistêmicas) e aquelas causadas por vírus que se restringem somente a alguns tipos de tecidos (não sistêmicas). Seguindo um critério para a localização dos vírus nos tecidos, a referida autora em 1961 elaborou uma classificação quanto às categorias de viroses considerando a relação vírus-tecido: (1) vírus distribuídos através do parênquima, incluindo os tecidos condutores; considerados histologicamente viroses não limitadas; (2) vírus limitados ao floema;

(3) vírus limitados ao xilema. Dentre os vírus que afetam o floema, causando a sua degeneração, Esau (1969) cita dois grupos: os que causam alterações no crescimento do tecido (hiperplasia e hipertrofia), e os que não causam alterações de crescimento.

O desenvolvimento das lesões não sistêmicas envolve reações de hipersensibilidade com mudanças metabólicas nas células afetadas, sendo essas ocasionadas pela relação célula-vírus (ESAU, 1967). A autora também sugere que quinonas induzam a morte celular impedindo o espalhamento do vírus, assim como podem existir algumas substâncias que afetam diretamente a atividade desses vírus.

A partir de estudos sobre a seqüência de degeneração do floema em plantas exibindo ‘curly top’ e infectadas por ‘*Aster Yellow Virus*’, Esau (1969) apresentou uma seqüência dos estágios pelos quais o tecido floemático se apresenta quando infectado por vírus que causam alterações de crescimento: (1) degeneração inicial das células próximas aos primeiros elementos crivados maduros, freqüentemente acompanhados por células hipertrofiadas; (2) necrose das células cromofílicas (primeira necrose); (3) hiperplasia das células não atingidas na primeira necrose (hiperplasia primária); (4) necrose do tecido que sofreu hiperplasia (necrose secundária); (5) hiperplasia e hipertrofia das células que envolvem o tecido necrosado (hipertrofia e hiperplasia secundárias; reações de cicatrização do ferimento). Todavia esta seqüência pode variar dependendo da virose e da planta hospedeira.

Referências

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The *Citrus* leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 211-220, 2006.

BITANCOURT, A.A. **As manchas das laranjas**: descrição das principais manchas, podridões e outras alterações das laranjas, e dos meios de combatê-las. São Paulo: Instituto Biológico, 1934. 135 p. (Boletim, 53).

_____. Estudos sobre a leprose dos *Citrus*. I. Distribuição geográfica e sintomatologia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 22, p. 161-184, 1955.

CHILDERS, C.C.; FRENCH, J.V.; RODRIGUES, J.C. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis*, and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 5-18, 2003.

COLARICCIO, A.; LOVISOLO, A.; CHAGAS, C.M.; GALETTI, S.R.; ROSSETTI, V.E.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultra-structural aspects of Citrus leprosis virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 208-213, 1995.

ESAU, K. Some anatomical aspects of plant virus disease problems. **Botanical Review**, New York, v. 4, p. 548-579, 1938.

_____. An anatomist's view of virus diseases. **American Journal of Botany**, New York, v. 43, p. 739-748, 1956.

_____. **Plants, viruses, and insects**. Cambridge: Harvard University Press, 1961. 110 p.

_____. Anatomy of plant virus infections. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 5, p. 45-76, 1967.

_____. **The phloem**. Handbuch der Pflanzenanatomie. Berlin: Gebriiider Borntraeder, 1969. Band V, Tiel 2, 505 p.

FAWCCETT, H.S. **Citrus diseases and their control**. New York: MacGraw-Hill, 1936. 656 p.

FLECHTMANN, C.H.W.; OLIVEIRA, C.A.L.; SANTOS, J.M. Aspectos taxonômicos do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis*. In: OLIVEIRA, C.A.L.; DONADIO, L.C. **Leprose dos citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p. 31-36.

FREITAS-ASTÚA, J; LOCALI, E. C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; KITAJIMA, E. W.; HILF, E. C.; GOTTWALD, E. C.; MACHADO, M. A. Nationwide detection of *Citrus leprosis virus* in Brazil using RT-PCR. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 16., 2004. **Programs & abstracts...** p. 189.

_____. BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASÍLIO-PALMIERI, A.C.; SILVA-PINHATI, A.C.; TARGON, M.L.PN.; MACHADO, M.A. Differentially expressed stress-related genes in the compatible Citrus-Citrus leprosis virus interaction. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, suppl. 3, p. 980-990, 2007.

GOMES, R.T.; MARQUES, J.P.R.; SALAROLI, R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; KITAJIMA, E.W. Análise ultra-estrutural de lesões foliares causada pela leprose do citros – tipo citoplasmático – e distribuição das células infectadas na lesão. In: MOSTRA ACADÊMICA, 12.; ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2., 2004, Piracicaba. Piracicaba: UNIMEP, 2004. **Resumo expandido...** 1 CD-ROM.

GÓMEZ, E.C.; VARGAS, M.R.; RIVADAMEIRA, C.; LOCALI, E. C; FREITAS-ASTÚA, J; ASTUA-MONGE, G; RODRIGUES, J.C.V.; MESA COBO, N. C; KITAJIMA, E.W. First report of the Citrus leprosis virus on citrus in Santa Cruz, Bolivia. **Plant Disease**, Mount Aukun, v. 89, n. 6, p. 686, 2005.

- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 135-160, 2003.
- KITAJIMA, E.W.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S.; YUKI, W. Shot, rod-like particles associated with *Citrus* leprosis. **Virology**, Amsterdam, v. 50, p. 254-258, 1972.
- KITAJIMA, E.W.; ROSILLO, M.A.; PORTILLO, M.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S. Microscopia eletrônica de tecidos foliares de laranjeiras infectadas pela lepra explosiva da Argentina. **Fitopatologia**, Lima, v. 9, p. 55-56, 1974.
- KITAJIMA, E.W.; GROOT, T.V.M.; NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ALBERTI, G.; MORAES, G.J. In situ observation of the *Cardinium* symbionts of *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) by electron microscopy. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 42, n. 1, p.17-21, 2007.
- KNORR, L.C. Studies on the etiology of leprosis in *Citrus*. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 1968, Gainesville **Proceedings...** Gainesville: University of Florida Press, 1968. p. 332-341.
- KNORR, L.C.; PRICE, W.C. Leprosis. In: PRATT, R. **Citrus insects, diseases and nutritional disorders**. Gainesville: Agricultural Experiment Station, 1958. 191 p.
- LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTUA-MONTE, G.; ANTONELLI, R.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. Diagnose da leprose dos citros através de RT-PCR. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 26., 2003, Araras. **Anais...** Araras: Sociedade Paulista de Fitopatologia, 2003. 1 CD-ROM.
- LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.N.; KISHI, L.; MACHADO, M.A. Sequenciamento completo do genoma do vírus da leprose dos citros (CiLV-C). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 191, 2005.
- LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO M.A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. **Journal General Virology**, Reading, v. 87, p. 2721 – 2729, 2006.
- MUSUMECI, M.R.; ROSSETTI, V. Transmissão dos sintomas da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 228, 1963.

NUNES, M.A.; OLIVEIRA, C.A.L.; KITAJIMA, E.W. **Constatação da transmissibilidade do vírus da leprose dos citros por *Brevipalpus phoenicis* (GEISKES, 1939) em cercas-vivas, quebra-ventos e plantas daninhas por meio da microscopia eletrônica de transmissão.**

Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/pesquibr.html+leprose+dos+citros&hl-pt-BR>>. Acesso em: 21 mar. 2004.

PRIMIANO, E.L.V.; GARCIA, J.F.; MACEDO, L.P.M. Leprose dos Citros uma doença que preocupa os citricultores. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 8, n. 41, ago. 2004.

RODRIGUES, J.C.V. **Relações ácaro-vetor-planta no sistema leprose dos citros**. 2000. 168 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

RODRIGUES, J.V.C.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M.; MACHADO, M.A. *Citrus* leprosis. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 161–179, 2003.

VERGANI, A.R. Transmission y naturaleza de la lepra explosiva del naranjo. **Ministerio de Agricultura de la Nacion Buenos Aires Instituto Sanidad Vegetal**. Série A, Buenos Aires, ano 5, n. 3, p. 1–11, 1945.

3 LESÕES FOLIARES E DE RAMOS DE LARANJEIRA-DOCE CAUSADAS PELA LEPROSE-DOS-CITROS

Resumo

O objetivo deste trabalho foi apresentar a descrição anatômica dos tecidos lesionados pelo Citrus leprosis virus do tipo citoplasmático (CiLV-C), em ramos e folhas de laranjeira-doce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) 'Pêra', e fornecer dados para a compreensão das interações entre o vírus e a planta hospedeira. Tecidos que apresentavam lesões foram seccionados em micrótomo rotativo (5–7 µm de espessura) e, posteriormente, as lâminas foram coradas e montadas em resina sintética. Nas análises realizadas no microscópio eletrônico de varredura, as amostras, depois de fixadas, foram imersas em glicerina 30% e, em seguida, criofraturadas, desidratadas em série etílica, secadas ao ponto crítico de CO₂, e cobertas com uma delgada camada de ouro. As lesões foliares se iniciaram como pontuações necróticas, envolvidas por halos cloróticos que limitam o crescimento da lesão. Nos ramos, ocorreram dois tipos de lesões com fendas. Na região da fenda, houve intensa hiperplasia do parênquima cortical e floemático, que promoveu a obliteração das células condutoras do floema. A formação de ductos gomosos traumáticos nas lesões caulinares foi descrita. As alterações verificadas no floema podem explicar porque o vírus torna-se não-sistêmico.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*; Citrus leprosis vírus; Histopatologia; Ductos gomosos traumáticos

FOLIAR AND TWIGS LESIONS OF SWEET ORANGE CAUSED BY CITRUS LEPROSIS

Abstract

The objective of this work was to present the anatomical description of tissues lesioned by Citrus leprosis virus cytoplasmatic type (CiLV-C), in leaves and twigs of 'Pêra' sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) providing new data to understand the interactions between the virus and the plant host, in Brazil. Leprosis lesions were cut on a rotary microtome (5–7 µm thick), stained and mounted in synthetic resin. For scanning electron microscope analysis, fixed tissues were immersed in glycerin 30% and criofractured, dehydrated in a graded ethylic series, critical point drying and coated with gold. Foliar lesions began as necrotic spots surrounded by a yellow halo that inhibited the lesion expansion. The twigs presented two different lesions: depressed ones and pustules with ruptures. There was hyperplasia of the cortical and phloematic parenchyma cells causing the obliteration of phloematic vessels. These histological alterations of the phloem tissue could explain why the virus does not become systemic even occasionally

infecting phloem parenchyma cells. The development of gummosis traumatic ducts in twig lesions was described here.

Keywords: *Citrus sinensis*; Citrus leprosis virus; Histopathology; Traumatic gum ducts

3.1 Introdução

A cultura de laranja representa uma importante fonte de divisas para o país, sendo o Brasil o maior produtor mundial desta fruta, com grande destaque para o Estado de São Paulo. Contudo, a produção é limitada devido à presença de doenças, com destaque para as viroses, dentre as quais a leprose dos citros possui grande importância, uma vez que apenas os gastos com acaricidas para seu controle podem atingir cifras acima de US\$ 80 milhões por ano (RODRIGUES et al., 2003).

Esta doença possui etiologia viral (KITAJIMA et al., 1972) e tem como agente causal o Citrus leprosis virus (CiLV). Atualmente se aceita que os sintomas da leprose de citros podem ser causados por dois vírus distintos morfologicamente: o tipo nuclear (CiLV-N) descrito por Kitajima et al. (1972) e o tipo citoplasmático (CiLV-C) descrito em Colariccio et al. (1995). Os vetores da doença são ácaros tenuipalpeados, do gênero *Brevipalpus* (RODRIGUES et al., 2003; CHILDERS et al., 2003). No Brasil *B. phoenicis* Geijkes é a única espécie relatada como vetora da doença (BASTIANEL et al., 2006).

A doença caracteriza-se por produzir lesões restritas aos locais de alimentação do vetor, nas folhas, nos frutos e nos ramos infectados. A lesão foliar aparece como um conjunto de halos necróticos intercalados por halos cloróticos. Nos ramos as lesões apresentam-se como pústulas necróticas e, nos frutos, como depressões necróticas. Quando a planta apresenta elevada infecção, ocorre queda prematura dos frutos, definhamento dos ramos, e pode levar a planta à morte (ROSSETTI, 2001).

Pouco se sabe a respeito do comportamento da planta frente à presença deste patógeno, ou seja, das respostas das células e dos tecidos vegetais na tentativa de isolar o vírus para que este não atinja os tecidos vasculares. As partículas virais já foram observadas nas células do mesofilo, no parênquima vascular e raramente nas células companheiras do floema (KITAJIMA et al., 2003), e, segundo esses autores, esta seria a explicação pela qual o CiLV é não sistêmico.

O objetivo deste trabalho foi apresentar a descrição anatômica dos tecidos lesionados pelo CiLV-C, em ramos e folhas de laranjeira-doce e fornecer dados para a compreensão das interações entre o vírus e a planta hospedeira.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Vegetal

As plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pêra’ inoculadas com ácaros virulíferos contendo o CiLV – C foram fornecidas pela Dr^a Juliana de Freitas-Astúa, pesquisadora do Centro de Citricultura Apta “Sylvio Moreira”, IAC, Cordeirópolis/SP. Tais plantas foram inoculadas via ácaros virulíferos (ver metodologia). Destas plantas foram coletadas folhas e ramos apresentando lesões. As plantas inoculadas tinham cerca de 60 cm de altura.

3.2.2 Metodologia

Inoculação do vírus

Para inoculação do CiLV em plantas de *Citrus* sp., uma população do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (população 1), originária de Cordeirópolis, SP e mantida na Clínica Entomológica do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” é multiplicada em plantas oriundas de sementes de laranjeira-doce. Esta população avirulífera foi então transferida com pincéis de poucos pêlos para folhas destacadas de laranjeiras sintomáticas, mantidas em placas de Petri com algodão umedecido, com a finalidade de o ácaro adquirir o vírus da leprose por um período de 72 h (tempo de aquisição). As folhas a serem inoculadas foram previamente tratadas com uma solução de farinha e água, essa solução foi transferida às folhas com auxílio de pincéis espessos. Tal técnica simula um ambiente seguro para o *B. phoenicis*. Após esta etapa, os ácaros virulíferos foram então transferidos para cada planta-teste a fim de transmitirem o vírus.

Este experimento foi realizado duas vezes, sendo utilizadas 10 plantas-teste (cerca de 60 cm cada planta), em cada experimento, e com diferentes concentrações de ácaros em cada planta-teste. No primeiro experimento as plantas foram inoculadas com 70 ácaros virulíferos, no segundo experimento com 30 ácaros virulíferos.

Análises morfoanatômicas

As diferentes amostras de folhas e ramos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, apresentando lesões em estágios distintos causadas pelo CiLV-C mais o material sadio (testemunha) foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Para melhor fixação, as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série etílica e infiltradas em resina hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historesin), seccionadas de 5 a 7 µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045. As secções foram montadas em lâminas de vidro e posteriormente coradas com: azul de Toluidina (SAKAI, 1973) para as análises histológicas usuais; Sudan Black B (PEARSE, 1962) para detectar substâncias de natureza lipofílica; cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para verificar a formação de compostos de natureza fenólica; cloreto de zinco iodado (JENSEN, 1962) para detectar amido nos tecidos estudados; Aniline blue black (FISHER, 1968) para identificar a presença de compostos de natureza protéica; vermelho de rutênio (CHAMBERLAIN, 1932) para a detecção de compostos de natureza péctica, Xylidine Ponceau para detecção de compostos protéicos (CORTELLAZO, 2007). Depois de coradas, as lâminas histológicas foram montadas em resina sintética “Entellan” e as imagens foram capturadas com câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DMLD.

Este método foi repetido, no mínimo, três vezes para cada tratamento.

Técnica utilizada para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises ultra-estruturais, as folhas e os caules apresentando ou não sintomas da leprose tipo citoplasmática, foram coletados e fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Para melhor fixação, as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. Após a fixação, as amostras foram lavadas com tampão fosfato, e colocadas em contato com glicerina 30%, com a finalidade de evitar a formação de cristais de gelo. Após a glicerina, as amostras foram então mergulhadas em nitrogênio líquido, fraturadas (criofratura) e lavadas em água destilada. As amostras resultantes da criofratura foram desidratadas em série etílica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), secas ao método do ponto crítico de CO₂ (HORRIDGE; TAMM, 1969), montadas sobre suportes de alumínio (STUBs) e cobertas com uma delgada camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações e as elétron-micrografias foram feitas ao microscópio eletrônico de varredura modelo LEO VP 435, operado a 20 kV, com as

escalas das elétrón-micrografias diretamente impressas nas mesmas. Este método foi repetido, no mínimo, três vezes para cada tratamento.

3.3 Resultados e Discussão

Ramo Sadio

As descrições a seguir servem tanto para os ramos provenientes de plantas inoculadas quanto para aqueles provenientes do campo, sendo as diferenças mencionadas quando necessário.

A epiderme era uniestratificada e revestida por cutícula relativamente espessa (figuras 1 A e F). Nos caules provenientes de campo verificou-se a instalação da periderme (figura 1D).

O córtex era constituído de 11 a 18 camadas de células parênquimáticas, as quais apresentavam cloroplastos. As células do córtex apresentavam diâmetro reduzido quando próximas à epiderme, e aumentavam em diâmetro nas proximidades do cilindro vascular (figuras 1A e F). A endoderme não era morfológicamente distinta das demais camadas.

No cilindro vascular havia fibras lignificadas de origem pericíclica (REUTHER et al., 1968), sendo estas denominadas fibras pericíclicas. Internamente às fibras, o floema primário estava obliterado (figura 1F) e, portanto, não funcional (REUTHER et al., 1968). Por sua vez, o floema secundário, que esses autores denominam floema funcional, era constituído pela porção adjacente ao câmbio vascular, nesta região observava-se os elementos de tubo crivado cujas células companheiras estavam comumente voltadas para os raios floemáticos (figura 1E). O floema nos caules provenientes de campo apresentava várias camadas de células condutoras que se alternavam com as fibras. A medula era constituída de células parenquimáticas isodiamétricas (Figura 1C).

As células dos parênquimas cortical, floemático, xilemático e medular apresentavam grãos de amido. Quando os caules foram observados sob luz polarizada notou-se a presença de cristais junto ao córtex e tecidos vasculares (Figuras 1 B e C).

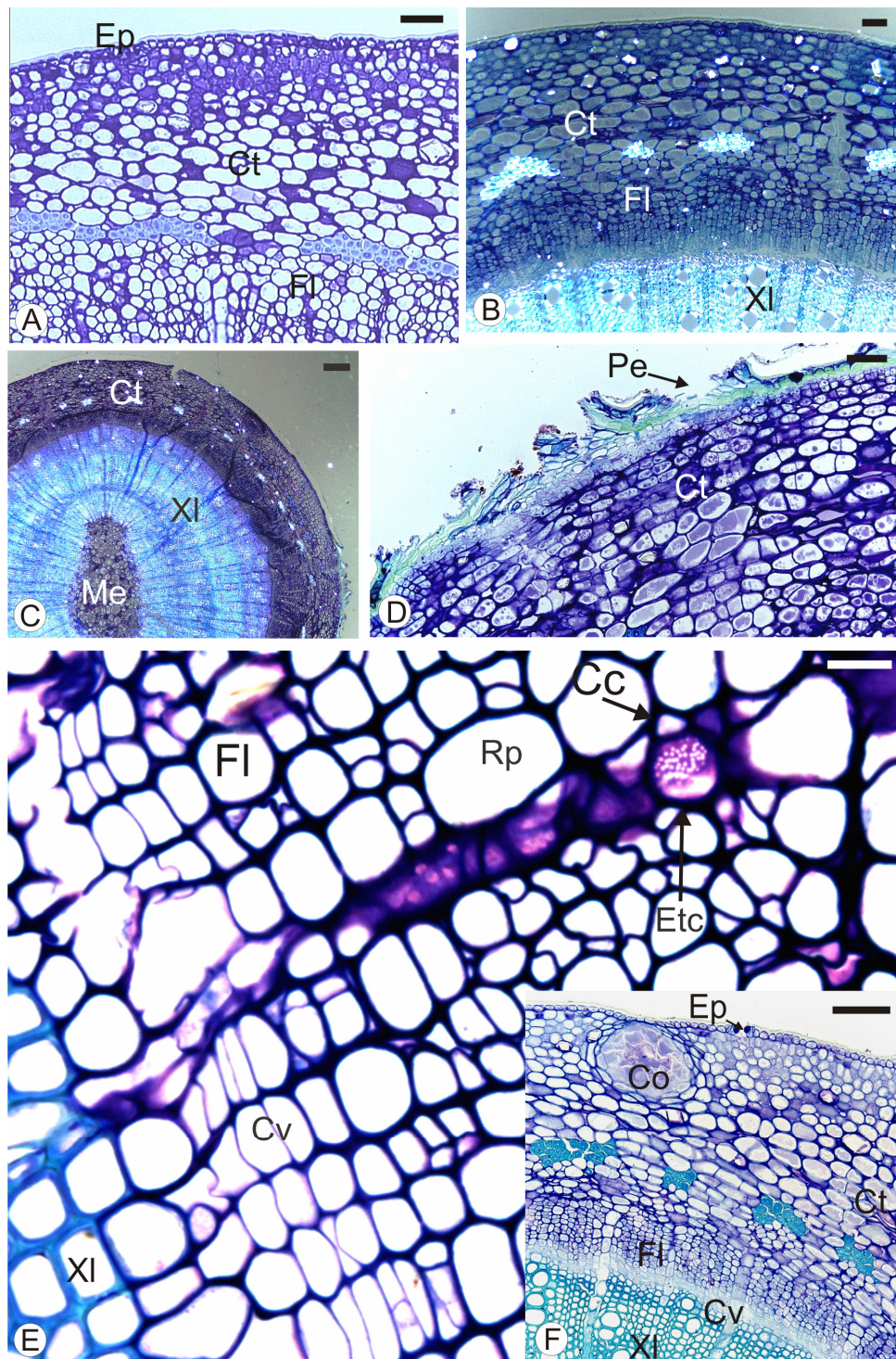


Figura 1 - Cortes transversais do caule sadio. A. Epiderme (Ep) e córtex (Ct) analisados sob luz não polarizada (A) e luz polarizada (B) (Barras – 50 e 30 μm , respectivamente). C. Visão geral do caule visualizado sob luz polarizada (Barra - 100 μm). D. Detalhe da periderme (Pe) em caules mais espessos (Barra – 30 μm). E. Detalhe do floema (Fl) e câmbio vascular (Cv). Notar que as células companheiras (Cc) do elemento de tubo crivado (Etc) encontram-se voltadas para o raio floemático (Rp) (Barra – 10 μm). F. Epiderme, cavidade de óleo (Cv) no córtex e tecidos vasculares (Barra – 30 μm). Me – Medula; Xl – Xilema

Ramos lesionados

Nos ramos inoculados, as lesões começaram a surgir cerca de 30 dias após a inoculação, e ainda se observaram novas lesões até cerca de 70 dias. No caso do experimento com diferentes quantidades de ácaros virulíferos pode-se verificar que em ambos os experimentos as plantas morreram após dois meses. Sugere-se que para a inoculação das plantas para o acompanhamento das lesões utilize-se cerca de 10 ácaros virulíferos por planta.

Foram observados dois tipos principais de lesões: necróticas que formam pústulas com fendas longitudinais na casca dos ramos (figura 2A) e necróticas deprimidas que podem apresentar fendas ou não (figuras 2 B e C). As lesões do tipo pústulas com fendas longitudinais são, em geral, maiores que as lesões deprimidas (figura 2A). A lesão apresenta coloração marrom escura, e as regiões adjacentes podem ser clorofiladas (figura 2B) ou não (figura 2C). É importante destacar que, quando este tipo de lesão coalesceu com outras do mesmo tipo, ou quando estas lesões adquiriram um tamanho maior, elas acabaram por envolver toda a circunferência do ramo (figura 2C). Em uma revisão recente sobre a leprose dos citros, Bastianel et al. (2006) também relatam a coalescência de lesões em ramos jovens e a formação de lesões maiores em ramos mais velhos.

Na lesão do tipo pústula no ramo (figura 2A), na região da fenda, o tecido epidérmico e a região cortical apresentaram-se necrosados (figura 2D). A formação da fenda resultou da lise e separação das células necrosadas devido à pressão exercida pelo aumento do número de camadas celulares no córtex subjacente. Esse aumento foi resultante da hipertrofia e hiperplasia das células corticais na área da lesão (figura 2E) e não pelo acúmulo de goma nos tecidos subepidérmicos, como descrito por Bitancourt (1955) em materiais provenientes do campo. As células necrosadas do córtex apresentaram apenas compostos de natureza lipídica; os testes para fenóis e substâncias pécnicas foram negativos. No entanto, sob as células corticais necrosadas, e acompanhando toda a extensão da fenda, observou-se um meristema de cicatrização cuja camada celular mais externa apresentava conteúdo fenólico (figura 2E). Este tipo de meristema é normalmente formado em áreas lesionadas e desempenha uma função de proteção a despeito da causa do ferimento (MELO-DE-PINNA et al., 2002). As autoras também descrevem a formação do meristema de cicatrização e o aumento do teor de substâncias fenólicas nas células da mina foliar de *Richtergo riparia* causada por uma larva de lepidóptera.

Nas lesões deprimidas (Figuras 2B e C), a superfície do ramo apresentava-se com depressões ou com fendas (Figura 2F). As fendas eram tão profundas que expunham os tecidos vasculares (Figura 2F). Nas regiões deprimidas, as células corticais subjacentes ao tecido epidérmico apresentaram colapso de suas paredes (figura 2G) devido à pressão exercida pela hiperplasia das células do parênquima floemático (figura 2H). Tanto nas regiões de fendas como nas regiões deprimidas, as células da epiderme e o do córtex acumulavam substâncias lipídicas as quais poderiam estar associados na defesa contra patógenos conforme discute Shah (2005). O parênquima floemático, nos dois tipos de lesões, dividiu-se periclinalmente formando várias camadas de células estratificadas (figura 2H), o que promoveu o colapso das células condutoras do floema (figuras 2I e J) e o deslocamento das fibras pericíclicas. Nas lesões deprimidas, as paredes do parênquima floemático apresentaram sinuosidades. Segundo Roberts et al. (1997) para que haja o movimento do vírus a longa distância, o vírus deve entrar nos elementos condutores do floema e uma vez nesses elementos a translocação é inteiramente passiva e é determinada pelo padrão de transporte de fotoassimilados através da planta. Portanto, as alterações no floema descritas nesse estudo podem restringir o CiLV-C à área lesionada evitando a sua translocação para as regiões ainda não infectadas. Isto explicaria porquê de o vírus não tornar-se sistêmico, mesmo tendo sido observada a presença esporádica de partículas virais no parênquima floemático (BASTIANEL et al. 2006). Nas lesões com fendas observou-se a formação de ductos traumáticos gomosos (figuras 3 A-E) semelhantes àqueles descritos por Gedalovich e Fahn (1985) em ramos jovens de citros infectados com o fungo *Phytophthora citrophthora*. O desenvolvimento dos ductos em ambas as doenças começou com a alteração de células-mãe do parênquima xilemático localizadas próximas ao câmbio (figura 3A). No entanto, no presente estudo verificou-se a hipertrofia das células que passaram a secretar mucilagem e, posterior lise dessas para formar o lume do ducto e liberar a secreção (figura 3B-D) enquanto, Gedalovich e Fahn (1985) verificaram a formação esquizógena do lume. As células parenquimáticas vizinhas ao lume recém-formado passaram pelo mesmo processo de hipertrofia e lise, o que levou ao aumento do lume e ao acúmulo da mucilagem no seu interior (figura 3E). A presença de mucilagem também foi verificada no interior dos vasos do xilema.

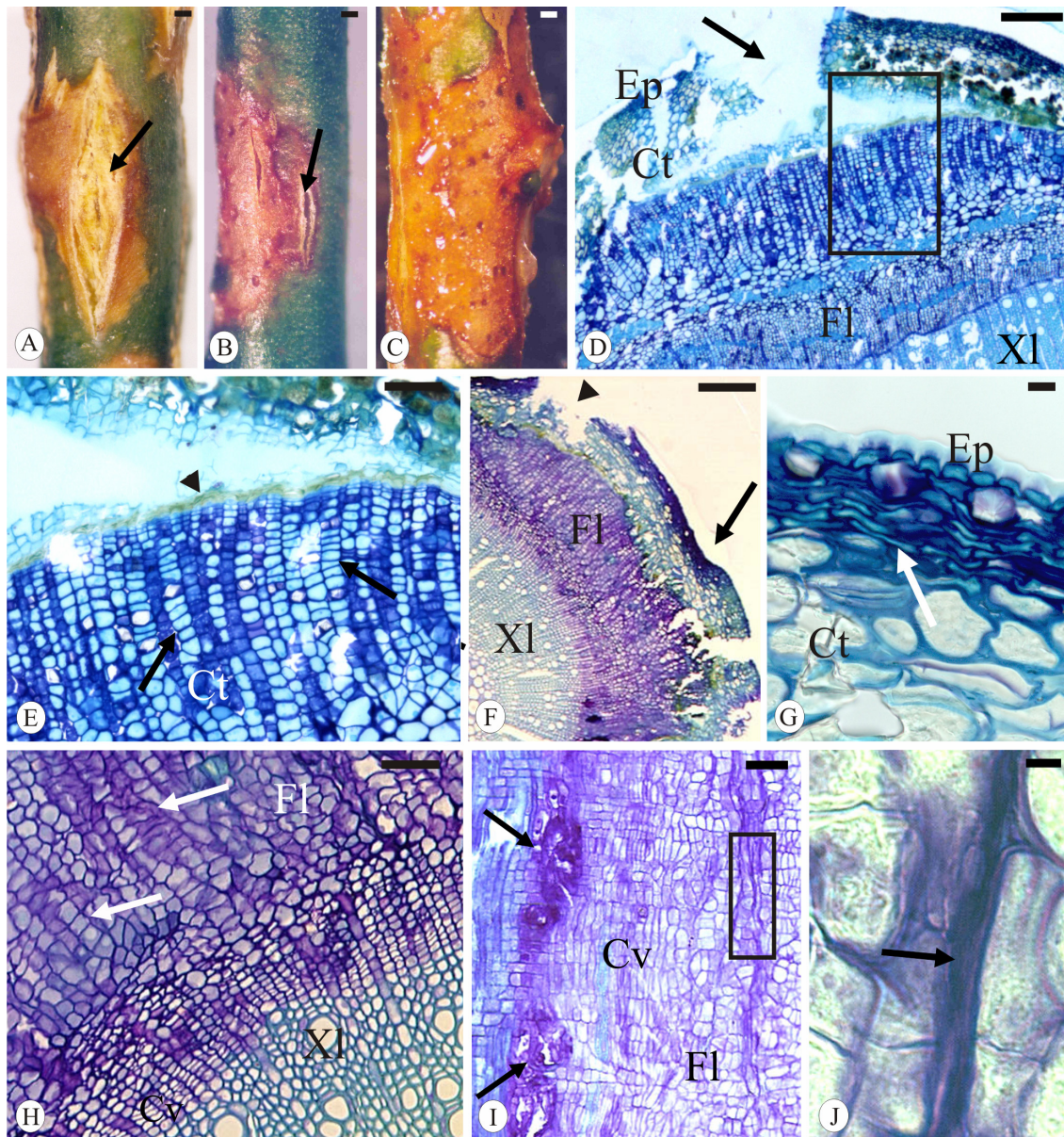


Figura 2 - Aspectos morfológicos (A-C) e anatômicos (D-J) das lesões caulinares causadas pelo CiLV-C em plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra'. A. Lesão necrótica tipo pústula com fenda (seta) (Barra - 2mm). B. Lesão necrótica deprimida apresentando fendas (seta) (Barra - 3,4 mm). C. Lesão necrótica deprimida (Barra - 1,8 mm). D. Secção transversal da lesão na região da fenda. Notar o rompimento da epiderme (Ep) e do córtex (Ct) (seta) (Barra - 100 μ m). E. Detalhe da região em destaque na foto anterior. Notar a hiperplasia das células do parênquima cortical (setas) e a formação do meristema de cicatrização (ponta de seta) (Barra - 50 μ m). F. Visão geral da lesão necrótica deprimida. Notar a presença de fendas (ponta de seta) e de regiões deprimidas (seta) (Barra - 200 μ m). G. Detalhe da região deprimida onde há o colapso das células corticais (seta) (Barra - 10 μ m). H. Detalhe do tecido vascular na lesão deprimida. Notar a intensa hiperplasia (seta branca) (Barra - 50 μ m). I. Secção longitudinal da lesão tipo pústula onde se observa a hiperplasia do tecido floemático e a obliteração de algumas células (destaque). Notar a presença de ductos traumáticos gomosos (setas) (Barra - 50 μ m). J. Detalhe de um setor do destaque na foto anterior onde nota-se o colapso das células condutoras do floema (seta) (Barra - 10 μ m). Cv - Câmbio vascular; Fl - Floema; Xl - Xilema

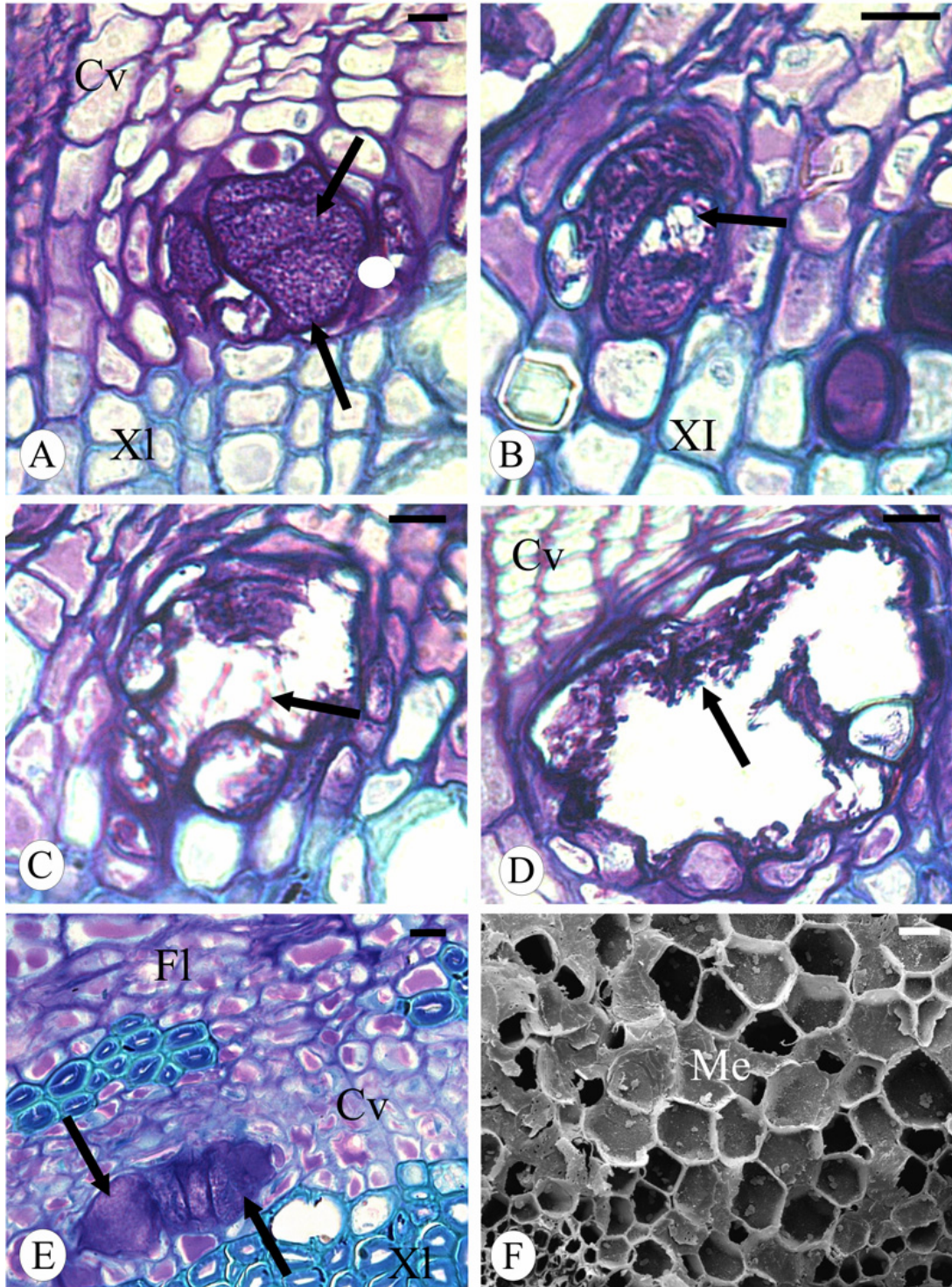


Figura 3 - Secções anatómicas (A-E) e elétron-micrografia (F) dos ramos lesionados de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra'. A-D. Etapas da formação do ducto traumático gomoso (setas) (Barras A-D - 5 μ m). E. Lume do ducto preenchido por compostos de natureza pécica (setas) (Barra - 30 μ m). F. Células da medula (Me) com ausência de grânulos de amido (Barra - 20 μ m). Cv - Câmbio Vascular; Fl - Floema; XI - Xilema

Os ductos traumáticos ocorreram em toda a extensão das lesões. A produção de mucilagem nos ductos é uma resposta da planta à presença do patógeno pelo isolamento da área lesionada como sugerido por Gedalovich e Fahn (1985). Diferentemente do tecido sadio foi verificada a ausência de grânulos de amido nas células da medula (figura 3F), nas células do parênquima vascular e do parênquima cortical, em ambos os tipos de lesões. Essa diferença pode estar relacionada com o aumento da expressão de genes envolvidos na síntese da α -amilase como verificado por Freitas-Astúa et al. (2007) ao estudarem o sequenciamento por Expressed Sequence Tags (ESTs) de bibliotecas de cDNA construídas a partir de folhas de laranjeira Pêra inoculadas com o CiLV-C.

Folha sadia

A folha era hipoestomática (figura 4 A e E). A epiderme da face adaxial apresentava-se com células tabulares e núcleo voltado para o mesofilo. Na face abaxial, as células epidérmicas tinham diâmetro menor em comparação com àquelas da face adaxial (figura 4 A). Em ambas as faces da folha a epiderme era uniestratificada e recoberta por cutícula espessa. O mesofilo dorsiventral (figuras 4 A e E) apresentava parênquima paliçádico constituído por duas a três camadas de células pouco alongadas. As células da terceira camada, quando presente, eram mais curtas. Idioblastos contendo cristais romboédricos de oxalato de cálcio e mucilagem ocorriam entre as células do parênquima paliçádico (figuras 4 A e E). Também foram verificadas cavidades lisígenas oleíferas no mesofilo. O parênquima lacunoso era constituído por dez a onze camadas de células geralmente braciiformes e amplos espaços intercelulares. Próximas à epiderme da face abaxial, as células eram menores e aproximadamente esféricas de arranjo mais compacto.

Os feixes colaterais (figuras 4 A, C-D) apresentavam fibras voltadas para o lado do floema e eram envoltos por bainha, que na maioria dos casos era composta por células parenquimáticas contendo cloroplastídios (figura 4D).

A nervura central era revestida por epiderme uniestratificada cujas células na face abaxial eram diminutas se comparadas com aquelas da face adaxial da nervura central. O parênquima paliçádico podia estar presente na nervura central em algumas regiões da folha. O parênquima aclorofilado possuía arranjo compacto de quatro a oito camadas de células isodiamétricas de diâmetros variáveis. O cilindro vascular colateral quase contínuo era circundado por camadas de fibras gelatinosas (figura 4 B).

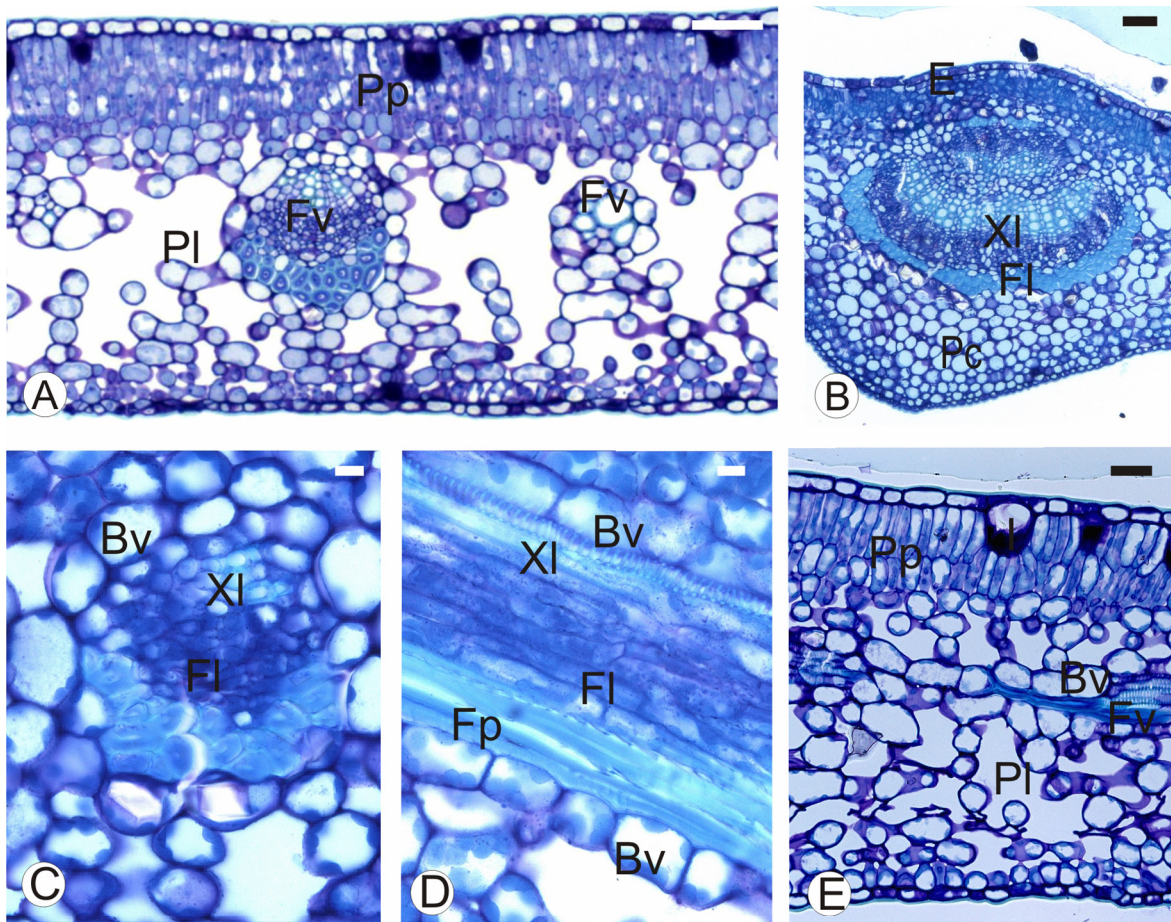


Figura 4 – Cortes transversais (A-C, E) e longitudinal (D) de folhas sadias de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pêra’. A. Visão geral (Barra – 30 μ m) da lâmina foliar. B. Visão geral da nervura central (Barra – 50 μ m). C-D. Feixe vascular colateral (Barras – 10 μ m). E. Detalhe do mesofilo dorsiventral (Barra – 30 μ m)

Folhas lesionadas

Como as lesões foliares da leprose são extremamente variáveis mesmo entre as diferentes cultivares de laranja-doce (BASTIANEL et al., 2006), na seqüência foi apresentada a descrição das mesmas na laranja-doce ‘Pêra’ desde a fase inicial até a avançada (figuras 5 A-G e 6 A-F).

As primeiras lesões foliares surgiram aos 30 dias após a inoculação e possuíam cerca de 1,5 mm de diâmetro. As lesões iniciaram-se como pontuações necróticas (figuras 5 B-C, 6 A). Embora as alterações histológicas indiquem a necrose dos tecidos foliares essas não poderiam ser consideradas como uma reação de hipersensibilidade (RH), pois a RH se manifesta em poucas horas ou dias e resulta em uma interação incompatível (resistência) (KOBAYASHI; VIEIRA, 2000). No caso da leprose, os sintomas demoraram até quatro semanas para aparecer e um estudo recente sugere que, em termos moleculares, após 48 horas da inoculação com CiLV-C, a resposta

de laranjeira ‘Pêra’ ao vírus não se assemelha às respostas normalmente associadas a RH em outras interações patológicas (FREITAS-ASTÚA et al., 2007).

Quando as folhas que apresentavam ácaro virulíferos eram verificadas contra a luz, cerca de 20 dias após a inoculação, verificava-se a presença de pequenas lesões cloróticas (figura 5 A). Este estágio provavelmente antecede à lesão necrótica acima descrita. A observação das folhas contra a luz também foi verificada por Bitancourt (1955), o referido autor também faz menção ao início das lesões serem perceptíveis quando as folhas são visualizadas contra luz. Tais folhas foram submetidas à análise sob MEV, sendo possível verificar uma depressão da epiderme na superfície abaxial da folha (figura 5 B e C), tal depressão media cerca de 20 µm poderia ser resultante da alimentação do *B. phoenicis*.

Anatomicamente estas lesões cloróticas representavam um estágio anterior à formação da depressão do limbo foliar apresentado na figura 6 G. A figura 5 D indica a presença de células do parênquima lacunoso em hiperplasia e hipertrofia celular adjacente à região onde havia necrose celular e acúmulo de compostos lipídicos (figura 5 E), adjacente a estas células, havia a presença de células que acumulavam compostos protéicos (figura 5 F) tais compostos também eram observados como gotículas amorfas no vacúolo de células situadas externamente a região do mesofilo lesionado (figuras 5 G). Outro aspecto importante foi a diminuição da quantidade de grânulos de amidos na região da lesão (figura 5 I-J), em comparação com os tecidos sadios (figura 5 H).

Em regiões do limbo foliar foram verificados estômatos lesionados apresentando conteúdo de natureza lipídica, indicando um possível sítio de alimentação do ácaro. Este fato é uma evidencia de que o *Brevipalpus phoenicis* poderia estar utilizando o estômato no ato de sua alimentação, pois de acordo com Pinto-Lopez (1964 apud Carmona 1996) os ácaros tetraniquídeos, parentes próximos dos ácaros tenuipalpídeos, grupo dos ácaros *Brevipalpus*, podem atingir com o estilete o interior do mesofilo quando se alimentam na superfície abaxial da folha.

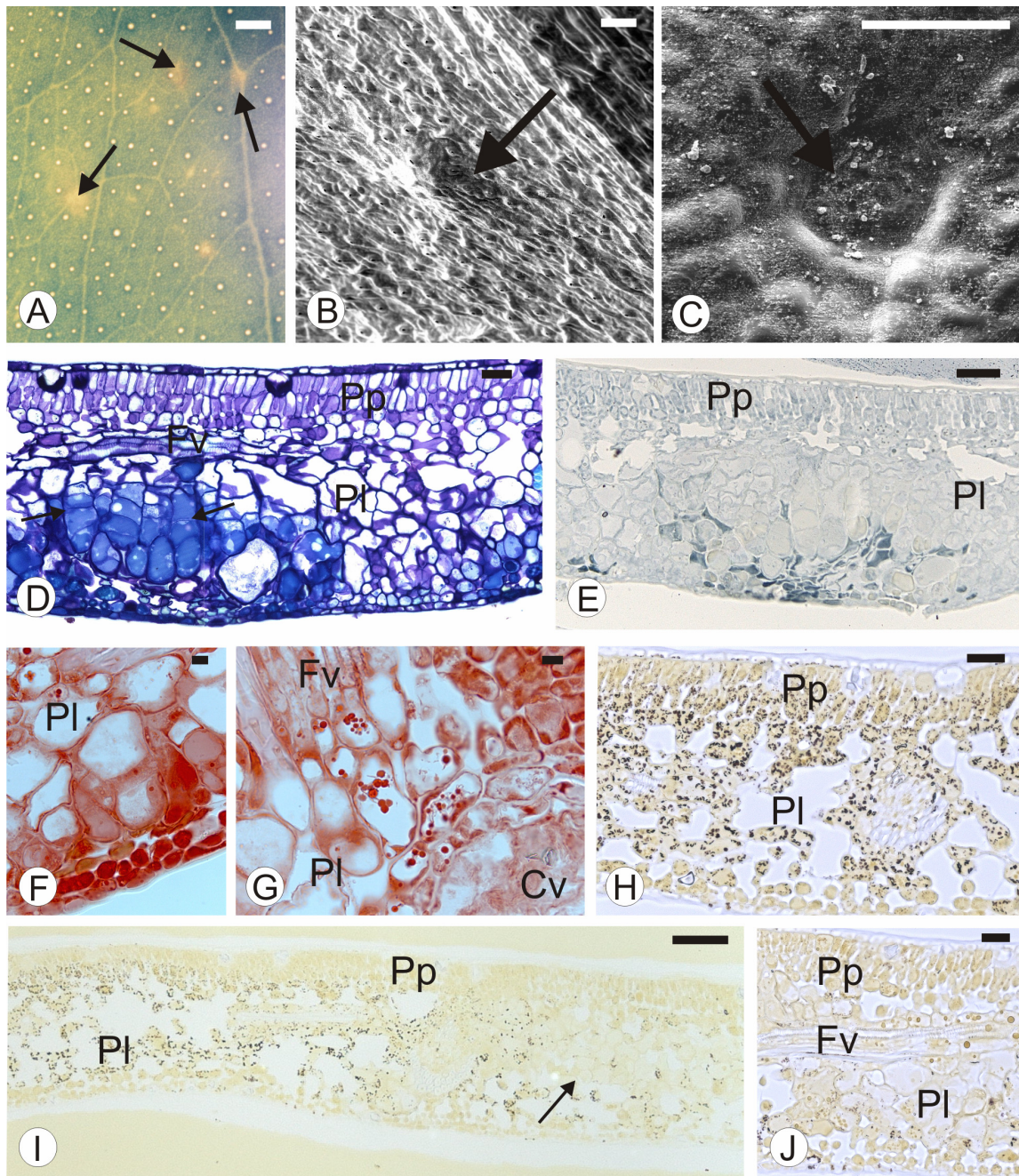


Figura 5 – Estágios iniciais das lesões foliares. A. Lesões cloróticas iniciais (setas) (Barra - 0,5mm). B-C. Elétron-micrografias de varredura das depressões na superfície abaxial do limbo foliar na região das lesões cloróticas apresentadas em A (Barras - 20 μ m). D-E. Cortes transversais das lesões apresentadas em A corados com azul de Toluidina e Sudan Black B, respectivamente. Observar a hiperplasia (setas) e hipertrofia nas células do parênquima lacunoso adjacentes àquelas que acumulam compostos de natureza lipídica (E) (Barras D e E - 30 μ m). F-G. Compostos protéicos evidenciados pelo Xylidine Ponceau nas células adjacentes àquelas que acumulam compostos de natureza lipídica. (Barras F e G - 10 μ m). H-J. Cortes transversais do limbo foliar após reação com cloreto de zinco iodado. Notar a diminuição da quantidade de grânulos de amido (pontos enegrecidos) nas lesões (I, J) em relação ao tecido sadio (H) (Barra I - 50 μ m). (Barras H e J- 30 μ m)

Segundo Mothes e Seitz (1982) o dano causado durante a alimentação pode ter três interpretações: a) durante a alimentação um vácuo é criado forçando o rompimento celular; b) as células adjacentes às células danificadas podem ser influenciadas pela saliva do ácaro e c) o processo de degeneração nas células não puncturadas é resultado da reação dos tecidos danificados das plantas. No presente estudo, observou-se que nas lesões foliares iniciais havia a diminuição da presença de amido nos tecidos situados junto ao provável sítio inicial de inoculação do vírus. Esta diminuição pode estar relacionada tanto com as alterações causadas pelo ácaro na alimentação (TOMCZYK; KROPCZYNSKA, 1985) quanto com a presença do vírus que induz à expressão dos genes para a enzima α -amilase (FREITAS-ASTÚA et al., 2007) a qual pode estar relacionada com a degradação de amido.

Posteriormente a este estágio descrito, ou seja, na lesão com pontuação necrótica visível, havia a formação de depressões isoladas na superfície do limbo foliar, em especial, na face abaxial resultantes da intensa obliteração das células da epiderme e do parênquima lacunoso (figura 6 G), muitas das quais apresentavam conteúdo de natureza lipídica (figura 6 H). As células adjacentes às células obliteradas apresentavam núcleo volumoso e citoplasma com aspecto granular. Na lesão era possível observar feixes vasculares necrosados (figura 6 I e I'). As áreas necróticas deprimidas possuíam cor marrom clara e eram circundadas por uma região clorótica (figura 6 B) observada mais facilmente quando a lesão era examinada contra a luz. Nas áreas cloróticas as células epidérmicas, do parênquima clorofiliano e da bainha do feixe apresentavam-se plasmolisadas (figura 6 J). Com o aumento do halo clorótico, a lesão adquiriu diâmetro maior, cerca de 2 a 2,5 mm, notando-se a formação de pontuações necróticas na margem da lesão as quais coalesceram formando o primeiro halo necrótico (figura 6 D). Após a formação do halo necrótico que circundava a área clorótica inicial, outra área clorótica foi verificada por fora do referido halo, e assim sucessivamente (figura 6 F). Em alguns casos, toda a lesão apresentava intensa necrose (figura 6 E). Nas regiões entre os halos (figura 6 L) notavam-se células com núcleo evidente na bainha do feixe vascular (figura 6 K).

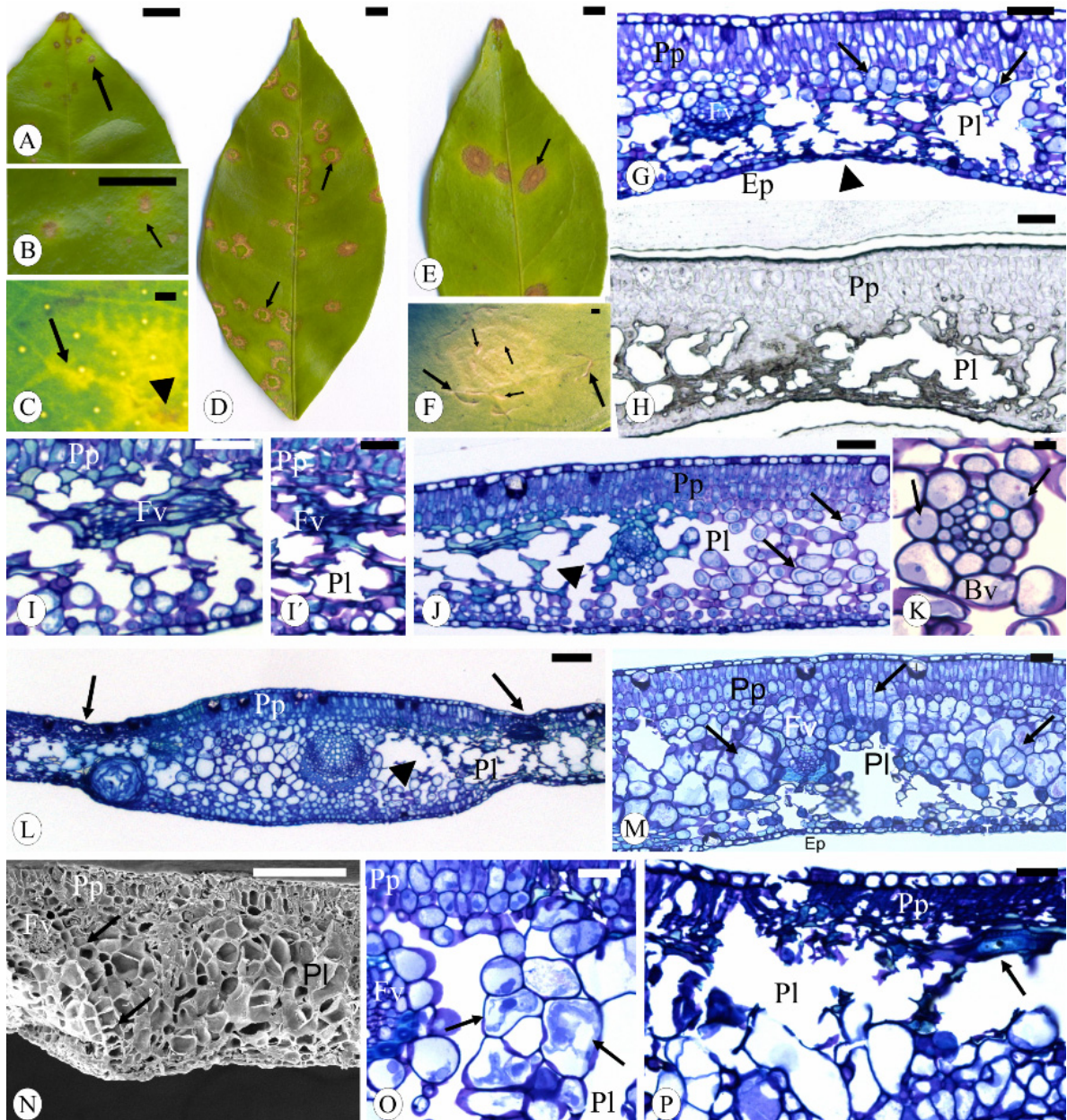


Figura 6 - A-F Lesões lepróticas foliares iniciais (A-C) e avançadas (D-F) em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra'. A. Lesão inicial (seta). B. Lesão inicial com halo clorótico (seta). C. Nervura clorótica (seta) e pontoação necrótica inicial (ponta de seta). D. Lesões com o primeiro halo necrótico (setas). E. Lesão avançada com intensa necrose (setas). F. Halos necróticos (setas menores) e halo externo que delimita a lesão (seta maior) (Barras A, C-F - 1 cm e B - 0,5 cm). G. Depressão no limbo (ponta de seta) e células alteradas (setas) (Barra - 50 μ m). H. Compostos lipídicos evidenciados pelo Sudan Black B (Barra - 50 μ m). I-I'. Feixes vasculares colapsados (Fv) na região da necrose. J. Células plasmolisadas (setas) entre a área necrótica (ponta de seta) e o bordo da lesão. K. Células da bainha vascular (Bv) com núcleo evidente (Barras G-I e J - 50 μ m; I' - 30 μ m; K - 10 μ m). L. As setas indicam as regiões deprimidas onde há intensa lise celular (ponta de seta) (Barra - 100 μ m). M. Células hipertrofiadas em divisão (seta) ao redor da necrose celular (Barra - 50 μ m). N-P. Regiões adjacentes ao halo que delimita a lesão avançada. N. Conjunto de células em hiperplasia (setas) (Barra - 100 μ m). O. Células do parênquima lacunoso hipertrofiadas e plasmolisadas. P. Região de necrose celular próxima a um feixe vascular (seta). (Barras O-P - 30 μ m). Ep - Epiderme; Pl - parênquima lacunoso; Pp - parênquima paliádico

Nas lesões avançadas, entre as áreas das depressões, a hipertrofia celular acentuou-se (figura 6 M), as células do parênquima paliçádico dividiram-se periclinalmente (figura 6 N) e algumas células hipertrofiadas estavam plasmolisadas (figura 6 O). A lise celular e a concomitante necrose do parênquima paliçádico atingiram os feixes vasculares levando ao colapso dos mesmos (figuras 6 I, I' e P) limitando a translocação do vírus para as regiões ainda não infectadas (ROBERTS et al., 1997). As lesões em seu estágio final de maturação caracterizavam-se por apresentar um halo necrótico mais externo que acabava por limitar o tamanho da lesão (figuras 6 E e F). A necrose celular aqui verificada pode limitar o deslocamento do vírus da leprose na folha, pois segundo Murphy e Carr (2002) o sucesso da infecção localizada de um vírus requer a replicação e subsequente movimento célula a célula do vírus a partir de células inicialmente inoculadas para células sadias adjacentes via plasmodesmos.

3.4 Considerações finais

- Ramos gravemente infectados pelo Citrus leprosis virus do tipo citoplasmático (CiLV-C) definham devido ao comprometimento do transporte causado pela obliteração dos elementos de tubo crivado do floema e pela obstrução, pela mucilagem, dos elementos de vaso do xilema.

- As alterações observadas no tecido floemático dos ramos lesionados evitam a infecção sistêmica pelo CiLV-C na planta.

- A necrose dos feixes vasculares na folha limita o deslocamento do vírus-da-leprose.

Referências

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The *Citrus* leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 211-220, 2006.

BITANCOURT, A.A. Estudos sobre a leprose dos *Citrus*. I. Distribuição geográfica e sintomatologia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 22, p. 161-184, 1955.

CHAMBERLAIN, C.J. **Methods in plant histology**. Chicago: The University of Chicago Press, 1932. 416 p.

- CHILDERS, C.C.; FRENCH, J.V.; RODRIGUES, J.C. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis*, and *B. lewisi* (Acari: Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 5-18, 2003.
- COLARICCIO, A.; LOVISOLO, A.; CHAGAS, C.M.; GALETTI, S.R.; ROSSETTI, V.E.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultra-structural aspects of Citrus leprosis virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 208-213, 1995.
- CORTELAZZO, A.L. **Caracterização celular e bioquímica de sementes**. Campinas: UNICAMP, 2007. 13 p.
- FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, Berlin, v.16, p. 92-96, 1968.
- FREITAS-ASTÚA, J.; BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASÍLIO-PALMIERI, A.C.; SILVA-PINHATI, A.C.; TARGON, M.L.PN.; MACHADO, M.A. Differentially expressed estress-related genes in the compatible Citrus-Citrus leprosis virus interaction. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, suppl. 3, p. 980-990, 2007.
- GEDALOVICH, E.; FAHN, A. The development and ultrastructure of gum ducts in Citrus plants formed as a result of brown-rot gummosis. **Protoplasma**, v.127, p.73-81, 1985.
- HORRIDGE, G.A.; TAMM, S.L. Critical point drying for scanning electron microscopy study of ciliar motion. **Science**, Washington, v. 13, n. 3869, p. 871-818, 1969.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: W. H. Freeman, 1962. 408 p.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 135-160, 2003.
- KITAJIMA, E.W.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S.; YUKI, W. Shot, rod-like particles associated with *Citrus* leprosis. **Virology**, Amsterdam, v. 50, p. 254-258, 1972.
- KOBAYASHI, A.K.; VIEIRA, L.G.E. Establishment of an *in vitro* system for studies on the induced resistance of cotton to *Xanthomonas campestris* pv. *Malvacearum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p.719-725, 2000.
- MELO-DE-PINNA, G.F.A.; KRAUS, J.E.; MENEZES, N.L. de. Morphology and anatomy of leaf mine in *Richterago riparia* Roque (Asteraceae) in the campos rupestres of Serra do Cipó, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 62, n. 1, p. 179-185, 2002.

- MOTHES, U.; SEITZ, K.A. Fine structural alterations of bean plant leaves by feeding injury of *Tetranychus urticae* Koch (Acari, Tetranychidae). **Acarologia**, Montpellier, v. 23, n. 2, p.149-157, 1982.
- MURPHY, A.M.; CARR, J.P. Salicylic acid has cell-specific effects on *Tobacco mosaic virus* replication and cell-to-cell movement. **Plant Physiology**, Watesbury, v.128, p. 552-563, 2002.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry, theoretical and applied**. 3rd ed. London: Churchill, 1968. v. 1, 998p.
- PINTO-LOPES, J. Fotossíntese: aspectos biofísicos e bioquímicos. In: CARMONA, M.M.; DIAS, J.C.S. **Fundamentos de acarologia agrícola**. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Naturais, 1996. p. 335-350. (Coleção “Natura”).
- REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H. J. **The citrus industry**. New York:University of California,1968. v. 2: Anatomy, physiology, genetics and reproduction, 85 p.
- ROBERTS, A.G.; SANTA CRUZ, S.; ROBERTS, I.M.; PRIOR, D.A.M.; TURGEON, R.; OPARKA, K.J. Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. **Plant Cell**, Watesbury, v. 9, p. 1381-1396, 1997.
- RODRIGUES, J.V.C.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M.; MACHADO, M.A. *Citrus* leprosis. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 161–179, 2003.
- ROSSETTI, V. **Manual ilustrado de doenças dos citros: doenças de causas desconhecidas**. Piracicaba: FEALQ; FUNDECITRUS, 2001. 270 p.
- SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.
- SHAH, J. Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 229–260, 2005.
- TOMCZYK, A.; KROPCZYNSKA, D. Effects on the host plant. In: HELE, W.; SABELIS, M.W. (Ed.). **Spider mites and their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1985. v. 1A, p. 317–329.

4 COMPARAÇÃO MORFOANATÔMICA ENTRE AS LESÕES LEPRÓTICAS DO TIPO CITOPLASMÁTICA E NUCLEAR EM CITROS

Resumo

A doença leprose apresenta etiologia viral e o Citrus leprosis virus é considerado o agente etiológico. A doença pode apresentar dois tipos de sintomas citopatológicos, causados por dois vírus: o tipo nuclear (CiLV – N) e o tipo citoplasmático (CiLV – C). O objetivo desse trabalho foi comparar as diferenças morfoanatômicas e no perfil protéico de lesões causadas pela leprose do tipo citoplasmática e nuclear em plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pêra’. As lesões em frutos e folhas nos municípios de Piracicaba/SP (tipo citoplasmático) e de Monte Alegre do Sul/SP e Amparo/SP (tipo nuclear). As amostras foram fotografadas e em seguida fixadas em solução de Karnovsky, desidratadas em série etílica, infiltradas em resina hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historessin), seccionadas em micrótomo rotativo a 5 µm de espessura, coradas com azul de Toluidina para as análises histológicas usuais. Também foram realizados testes histoquímicos. A captura de imagens digitais dos materiais preparados em lâminas foi realizada em microscópio equipado com câmera de vídeo. Para a análise do perfil protéico as amostras coletadas foram imediatamente criofixadas em nitrogênio líquido e armazenadas em refrigerador a – 80°C para posterior extração protéica. As proteínas extraídas foram quantificadas e depois separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Nas folhas e nos frutos as lesões causadas pelos dois vírus eram morfologicamente distintas. Apenas a lesão causada pela leprose tipo nuclear apresentava três regiões bem definidas. Em ambas as lesões houve o acúmulo de compostos lipídicos nas regiões necrosadas as quais eram envoltas por células que acumulavam proteína amorfa ou em gotículas. Apenas nas lesões foliares e no fruto causadas pelo vírus do tipo nuclear foram verificados ductos traumáticos gomosos nos feixes vasculares. Houve um aumento da concentração protéica nas lesões causadas pelo vírus CiLV-N.

Palavras-chave: Anatomia; Ductos traumáticos gomosos; Lipídios; Proteína

MORPHOANATOMICAL COMPARATION BETWEEN THE LESIONS CAUSED BY CITOPLASMATIC AND NUCLEAR LEPROSIS IN CITRUS

Abstract

The leprosis disease shows a viral etiology and the Citrus leprosis virus is considered the etiologic agent. The disease may show two types of cytopathologic symptom caused by two virus: the nuclear type (CiLV – N) and the cytoplasmatic type (CiLV – C). The aim of this study was to compare the morphological and protein profile differences in the lesions caused by leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pêra’. Fruit and foliar lesions were collected in Piracicaba/SP (cytoplasmatic type) and Monte Alegre do Sul/SP and Amparo/SP (nuclear type). The samples were photographed and then fixed in Karnovsky solution, dehydrated in a graded ethylic series, embedded in hydroxy-ethyl methacrylate resin (Leica Historessin), sectioned (5 µm thick), stained and mounted in synthetic resin. The digital images were capture

in a microscope with video camera. For the analysis of proteic profiles the samples were collected and immediately cryofixed in liquid nitrogen and stored in the refrigerated - 80 ° C. The proteins were extracted, quantified and then separated by gel electrophoresis of polyacrylamide gel. Foliar and fruit lesions caused by the two viruses were morphologically distinct. Only the lesion caused by CiLV – N virus presented three well-defined regions. In both lesions there was the accumulation of lipidic substances in necrotic areas which were surrounded by cells with amorphous or droplets protein. Only foliar and fruit lesions caused by CiLV – N virus exhibited gummosis traumatic ducts in vascular bundles. There was an increase of protein concentration in lesion tissues caused by CiLV-N virus.

Keywords: Anatomy; Gommosis traumatic ducts; Lipids; Protein

4.1 Introdução

A leprose dos citros é uma doença de grande importância econômica devido aos prejuízos econômicos por elas causados, podendo em alguns casos levar ao definhamento da planta e à queda prematura de frutos (RODRIGUES et al., 2003; BITACOURT, 1955).

Esta doença possui etiologia viral. Segundo Bastianel et al. (2006) a leprose apresenta diferentes sintomas citopatológicos os quais são causados por dois vírus morfologicamente distintos: **nuclear** - como descrito por Kitajima et al. (1972) em que as partículas são em forma de bastonetes curtos, que ocorrem no nucleoplasma ou citoplasma, comumente associadas perpendicularmente às membranas (retículo endoplasmático ou envelope nuclear) e ocorre a presença de um viroplasma nuclear. Este tipo é referido como CiLV-N; **citoplasmático**- como descrito em Colariccio et al. (1995), em que as partículas são baciliformes, curtas, providas de membrana e ocorrem no lume do retículo endoplasmático, havendo uma massa densa (viroplasma) no citoplasma. . Este tipo é referido como CiLV-C (RODRIGUES et al., 2003).

O CiLV-C tem prevalecido em quase todas as amostragens feitas no Brasil, Argentina, Venezuela, Costa Rica, Panamá e Guatemala, já o CiLV-N tem sido raro, ocorrendo em Boquete, Panamá, e em poucos locais no Estado de São Paulo (Amparo, Monte Alegre do Sul, Santo Antônio da Posse e Serra Negra) e Rio Grande do Sul (KITAJIMA et al., 2004; FREITAS-ASTÚA et al., 2004a). Recentemente, foi demonstrado que CiLV-N e CiLV-C são de fato vírus distintos, uma vez que inúmeros pares de primers utilizados para a amplificação do genoma do CiLV-C não amplificam regiões do CiLV-N (FREITAS-ASTÚA et al., 2005). Do ponto de vista morfológico e citopatológico, o CiLV-N se assemelha aos vírus das manchas anulares da orquídea (*Orchid fleck virus* - OFV) e do cafeeiro (*Coffee ringspot virus* - CoRSV), tais viroses

possuem como agente vetor ácaros do gênero *Brevipalpus* (CHAGAS 1978, 1980; KITAJIMA; COSTA 1972; KITAJIMA et al., 2003).

O CiLV-C foi considerado com membro putativo do grupo dos *Rhabdovirus* (KITAJIMA et al., 1972). No entanto, Locali et al (2005) verificaram que CiLV-C apresenta similaridade com membros dos gêneros *Furovirus*, *Tobamovirus*, *Tobravirus* que apresentam genomas de RNA de fita simples, senso positivo. Recentemente foi sugerido um novo gênero para o CiLV-C denominado *Cilevirus* (LOCALI et al., 2006).

Contudo, ainda são poucos os estudos da relação do vírus com o seu hospedeiro. Marques et al. (2007b) estudaram as alterações anatômicas causadas pela leprose do citoplasmática e relacionaram algumas delas com a restrição da lesão para que a doença não se torne sistêmica. De acordo com Kubo (2006), as alterações anatômicas causadas pelo *Orchid fleck virus* em orquídeas induzem a hipertrofia celular e o acúmulo de compostos lipídicos. Tais respostas, também foram relatadas para plantas inoculadas com o CiLV-C (MARQUES et al., 2007b) sendo este um indicativo de que as lesões induzidas por vírus transmitidos por *Brevipalpus* (VTBs) apresentam um padrão anatômico, porém ainda não se sabe os fatores que levam a estas alterações.

Segundo Esau (1938) os estudos anatômicos contribuem para a elucidação das interações entre o vírus e a planta hospedeira. Logo, o estabelecimento de padrões histopatológicos poderia revelar o porquê de uma lesão ser menor que a outra, ou seja, como os tecidos vegetais reagem à presença do vírus CiLV-C e do vírus CiLV-N. Portanto, o objetivo desse trabalho foi comparar as diferenças morfoanatômicas e no perfil protéico de lesões causadas pela leprose do tipo citoplasmática e nuclear em plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra'.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material Vegetal

Folhas e frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra' apresentando sintomas da leprose tipo citoplasmática foram coletadas na Coleção de Citrus do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba/SP. As folhas e os frutos de *C. sinensis* apresentando sintomas causados pelo CiLV-N foram fornecidas pelo Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Tais amostras foram provenientes de laranjais situados nos municípios de Monte Alegre do Sul/SP e Amparo/SP. As lesões (quatro de cada tipo) foram coletadas de acordo com a sua morfologia e tamanho.

4.2.2 Metodologia

Análises morfoanatômicas

As diferentes amostras de folhas, frutos e ramos de *C. sinensis*, apresentando lesões em estágios distintos causadas pela leprose do tipo citoplasmática e do tipo nuclear, mais o material sadio (testemunha) foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Para melhor fixação, as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série etílica e infiltradas em resina hidróxi-etil metacrilato (Leica Historessin), seccionadas de 5 a 7 µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045. As secções foram montadas em lâminas de vidro e posteriormente coradas com: azul de Toluidina (SAKAI, 1973) para as análises histológicas usuais; Sudan Black B para detectar substâncias lipídicas (PEARSE, 1962); cloreto férrico para verificar compostos de natureza fenólica (JOHANSEN, 1940); cloreto de zinco iodado para detectar amido (JENSEN, 1962); Aniline blue black para identificar a presença de compostos de natureza protéica (FISHER, 1968); vermelho de rutênio para a detecção de compostos de natureza péctica (CHAMBERLAIN, 1932), Xylidine Ponceau para detecção de compostos protéicos (CORTELLAZO, 2007). Depois de coradas, as lâminas histológicas foram montadas em resina sintética "Entellan" e as imagens foram capturadas com câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DMLD.

Técnica utilizada para a extração protéica

As amostras de folhas foram extraídas das plantas com a ajuda de um bisturi e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido sendo posteriormente armazenadas em freezer a - 80°C.

As amostras foram então maceradas em um almofariz com auxílio de um pistilo com tampão PBS-T + PVP a 2%, na proporção 0,2g de tecido foliar para cada 1 mL de tampão. O extrato resultante foi transferido para eppendorfs previamente identificados e em seguida

rotacionados a 4.800 rpm por cerca de 20 min a 4°C em centrífuga refrigerada Eppendorf 5804R. Desta etapa foi coletado o sobrenadante e armazenado em freezer a - 20 °C.

Método de análise para a quantificação protéica

Para a quantificação protéica, o extrato das amostras foi misturado ao reagente de Bradford (ver soluções no anexo) na proporção de 1:1, essa mistura foi colocada em uma cuba de 1cm², e então submetida ao espectrofotômetro para verificar a absorbância a 595nm. Anteriormente à quantificação dos extratos das amostras, foi determinada a equação de absorbância/concentração protéica do reagente de Bradford (feito previamente) com diferentes concentrações da proteína BSA (Albumina de Soro Bovino).

Técnica para corrida das amostras em gel de poliacrilamida

Depois de extraídas e quantificadas foram coletadas cerca de 10µL do extrato e a eles adicionados volume igual de uma solução carreadora das amostras (Cracking Buffer) sem a presença de SDS e β-Mercaptoetanol para evitar desnaturação (ver soluções no anexo). O volume final da mistura das amostras mais a solução carreadora foram adicionados a cada canaleta correspondente no gel de poliacrilamida (ver soluções no anexo) com auxílio de uma micropipeta. Utilizou-se também o marcador molecular Rainbow de 250 Kda.

Foram feitos géis com concentrações diferentes de proteínas, ou seja, em um dos géis foi adicionado volume duas vezes maior de amostra a fim de verificar se havia alguma alteração na formação das bandas. O gel, por sua vez, estava situado em uma cuba, a qual foi imersa numa solução de corrida (ver solução no anexo), e em seguida o equipamento foi ligado à energia.

Para a eletroforese utilizou-se do equipamento marca BioRad. A corrida do primeiro gel (gel de empilhamento) utilizou-se de 120 v por cerca de 1h, e posteriormente a corrente foi alterada para cerca de 200 v (porção do gel de separação) até a corrida das amostras ao final do gel. Todo processo foi realizado em câmara fria a 4°C a fim de evitar a desnaturação.

Depois de feita a eletroforese os géis foram retirados do aparelho, e em seguida fixados na solução fixadora (ver solução no anexo) por cerca de 15 minutos. O fixador foi descartado e então foi adicionada a solução de coloração com Coomassie Blue por 15 minutos. Depois de corado o gel foi submetido à descoloração (ver solução no anexo) por cerca de 30 minutos, sendo realizado este procedimento quatro vezes. Posteriormente, o gel foi lavado várias vezes em água

destilada, e em seguida colocadas em um saco plástico transparente para facilitar o manuseio do gel. Os géis foram então escaneados e processados no computador.

4.3 Resultados e Discussão

Análise morfológica das lesões foliares

As amostras provenientes de Monte Alegre do Sul e de Amparo apresentavam morfologia foliar semelhante. As lesões causadas pelo CiLV-N nas folhas eram menores e em maior número (figura 1 A) que aquelas do tipo citoplasmático (figuras 2 F e G).

As lesões maduras causadas pelo CiLV-N caracterizavam-se pela presença de três regiões distintas: centro necrótico, halo intermediário de tonalidade laranja, e halo clorótico externo (figura 1 B). No centro necrótico observava-se a ligeira diminuição na espessura do limbo foliar já no halo intermediário havia o aumento na espessura do limbo foliar (figura 1B). Foi possível verificar que, em alguns casos, a região central necrótica pode acompanhar uma nervura em toda a sua extensão.

Diferentemente das lesões causadas pelo CiLV-N, as lesões causadas pelo CiLV-C caracterizavam-se pela presença de halos necróticos deprimidos sucessivos (figura 2 G) ou por pontuações necróticas que alternavam-se com regiões cloróticas. Ambas as lesões apresentavam um halo clorótico mais externo que delimitava a lesão (figuras 1 C e 2 G), porém esse era mais evidente nas lesões causadas pelo CiLV-N (figura 1 C). As lesões maduras causadas pelo CiLV-C apresentavam halos necróticos sucessivos (figura 2 G) similares aos descritos para as lesões foliares de plantas inoculadas por Marques et al. (2007b).

Foi possível verificar diferentes estágios da lesão de leprose tipo nuclear (figuras 1 C-F). A lesão iniciou-se como uma pontuação necrótica (figura 1 C), a qual adquiriu diâmetro maior devido ao aumento da região necrosada e à presença do halo clorótico externo (figura 1 D). Na etapa seguinte já era possível verificar o início da formação do halo intermediário (figura 1 E). Houve então o aumento da região clorótica e conseqüente expansão do halo intermediário (figura 1 F). Comparando esses resultados com a evolução das lesões causadas pelo CiLV-C, analisadas por Marques et al. (2007b) em plantas inoculadas, verificou-se que o surgimento do halo intermediário era uma característica diferencial entre as duas lesões.

Análise anatômica das lesões

As três regiões descritas para a lesão causada pelo CiLV-N eram anatomicamente diferentes (figura 1 G).

No bordo da lesão madura (halo clorótico externo), as células do mesofilo apresentam-se plasmolisadas (figura 1H). Nas lesões causadas pelo CiLV-C esta característica também foi observada (figura 2 M). Coutts (1978) relatou que a plasmólise causou a supressão do desenvolvimento de lesões localizadas em plantas de *Vigna unguiculata* inoculadas com *Tobacco necrosis virus*. Como os vírus se deslocam entre as células via plasmodesmos (GILBERTSON et al., 1996) que podem apresentar alterações em sua estrutura (KITAJIMA; LAURITIS, 1969), a presença de camadas de células plasmolisadas no bordo das lesões pode estar relacionada com o não deslocamento das partículas virais limitando o tamanho da lesão. De acordo com Oparka (1994) o funcionamento dos plasmodesmos das células plasmolisadas pode ser impedido devido às alterações na região do desmotúbulo dos plasmodesmos como a retração da membrana plasmática. Estas alterações poderiam comprometer o deslocamento viral entre tais células. No caso da leprose dos citros foi verificado que nas lesões causadas pelo CiLV-N a plasmólise ocorre próxima ao centro necrótico da lesão, provável sítio inicial de inoculação, o que favoreceria a formação de uma lesão menor. Por sua vez, na lesão causada pelo CiLV-C a plasmólise ocorre quando a lesão já está avançada e ocupando uma grande região do limbo foliar.

No halo intermediário de tonalidade laranja, na lesão causada pelo CiLV-N, ocorreu aumento da espessura do limbo devido à intensa hipertrofia e atividade hiperplásica das células do parênquima lacunoso (figura 1 K), especialmente quando esta região estava associada ao feixe vascular (figura 1 J). A hipertrofia celular na bainha do feixe vascular foi verificada (figura 1 L). A hipertrofia e hiperplasia no parênquima lacunoso ocorreu em toda a extensão da lesão causada pelo CiLV-C (figuras 2 C, E e H). O parênquima lacunoso situado acima dos feixes vasculares dividiu-se periclinalmente (figura 2 D) e as células acima dessa área de divisão acumularam compostos lipídicos (figura 2 J). Ambas as lesões apresentaram a hiperplasia do parênquima lacunoso acima dos feixes vasculares, porém no caso das lesões causadas pelo CiLV-N esta hiperplasia não leva à formação de elevações no mesofilo semelhantes às observadas para o CiLV-C (figura 2 C). Gomes et al. (2004b) ao analisarem a distribuição do CiLV-C nos tecidos lesionados verificaram que o vírus não ocorre em células hipertrofiadas e em hiperplasia. A presença de células hipertrofiadas e em hiperplasia no halo intermediário das lesões causadas

pelo CiLV-N poderia conjuntamente com o halo clorótico prover uma barreira para que o vírus permanecesse confinado à lesão.

Na região central da lesão causada pelo CiLV-C o parênquima paliçádico apresentava alterações nos cloroplastos das células (figura 2 K) já relatadas por Rodrigues (1995). No caso de outras viroses transmitidas por *Brevipalpus* apenas na Mancha Anular do Cafeeiro foram observadas alterações nos cloroplastos (CHAGAS, 1978). Na lesão causada pelo CiLV-N observou-se na região de interface entre as células em hiperplasia e as células necrosadas do centro necrótico, células que acumulavam compostos protéicos. O centro necrótico (figura 1 I) era constituído por células do parênquima clorofiliano, especialmente do tipo lacunoso, e vascular que acumulavam compostos lipídicos. Esse acúmulo de lipídios também foi verificado nos halos necróticos das lesões causadas pelo CiLV-C (figuras 2 A-B e L).

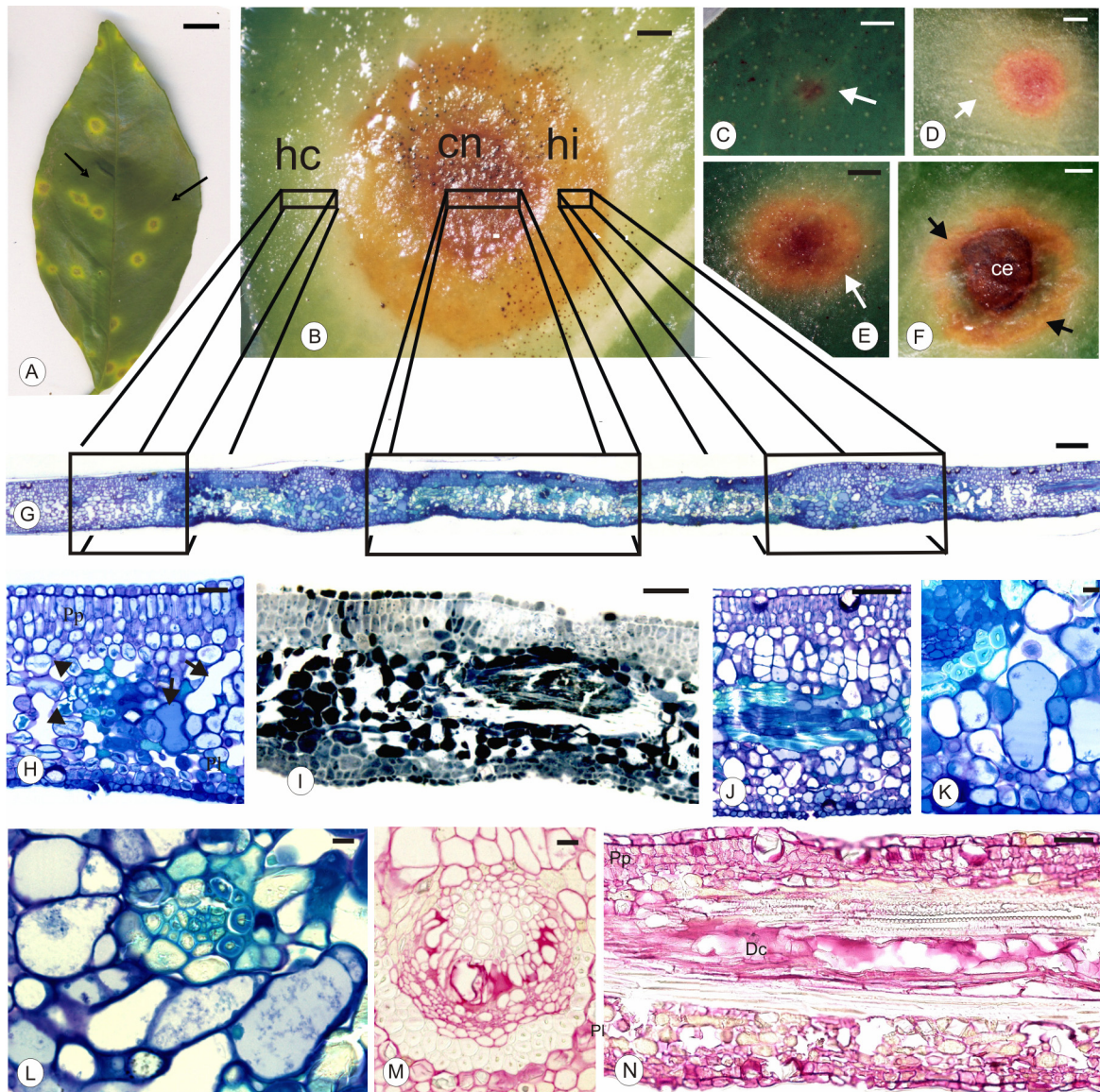


Figura 1 - Lesões foliares causadas pelo CiLV-N em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra'. A. Visão geral da folha lesionada (Barra - 1 cm). B. Lesão típica apresentando as três regiões: Cn - Centro Necrótico; Hi - Halo intermediário; Hc - Halo Clorótico. C-F. Etapas na formação da lesão. As setas nas fotos indicam o surgimento do halo intermediário (Barras B-F - 0,5 mm). G. Corte transversal da lesão no qual cada retângulo corresponde à região indicada em B (Barra - 100 μ m). H. Região do halo clorótico. Notar a plasmólise no parênquima lacunoso (setas) (Barra - 30 μ m). I. Centro necrótico da lesão. Reação positiva para o Sudan Black B (Barra - 30 μ m). J-N. Região do halo intermediário. J. Hiperplasia das células acima do feixe vascular (Barra - 30 μ m). K-L Hipertrofia das células do parênquima lacunoso e da bainha do feixe vascular (Barras - 10 μ m). M-N. Cortes transversal (M) e longitudinal (N) dos ductos traumáticos gomosos reagindo para vermelho de rutênio (Barras M-N - 30 μ m). E - Epiderme; Fv - Feixe Vascular; Pl - Parênquima Lacunoso; Pp - Parênquima Paliçádico

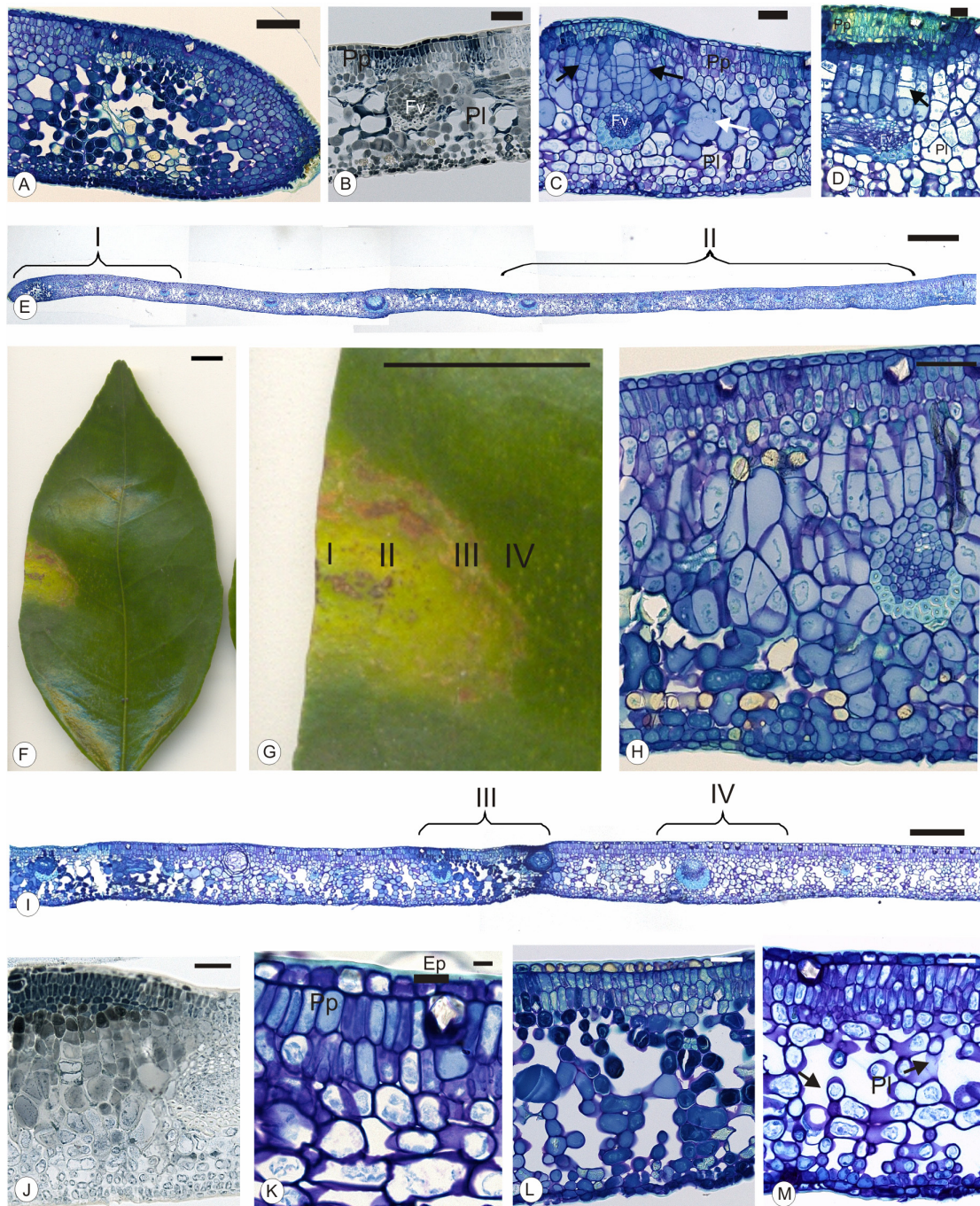


Figura 2 - Lesões foliares causadas pelo CiLV-C em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra'. A-B. Cortes transversais correspondentes ao setor I indicado em G. As figuras C-D, H, J e K correspondem aos setores II, e L e M correspondem aos setores III e IV, respectivamente. A. Azul de Toluidina (Barra - 30 μ m). B. Sudan Black B (Barras - 50 μ m). C-D. Elevações na superfície adaxial resultante da hiperplasia celular no mesofilo (setas); células hipertrofiadas (seta branca em C) (Barras - 30 μ m). E. Corte transversal da lesão indicada em G nos setores I e II (Barra - 200 μ m). F-G. Visão geral e detalhe da lesão com os setores de I a IV, respectivamente (Barras - 1,0 cm e 1,5 cm). H. Corte transversal do setor II da lesão (Barra - 30 μ m). I. Corte transversal da lesão indicada em G nos setores III e IV (Barra - 200 μ m). J. Teste positivo para Sudan Black B (região enegrecida) na região de elevação do mesofilo indicada em D (Barra - 30 μ m). K. Detalhe do parênquima paliçádico. Notar ausência de cloroplastos (Barra - 10 μ m). L. Corte transversal dos setores III e IV, respectivamente (Barras - 30 μ m)

Nos feixes vasculares das lesões causadas pelo CiLV-N verificou-se a presença de ductos traumáticos gomosos (figura 1 M e N) na região do halo intermediário. Segundo Fanh (1988) a produção de goma pelos tecidos lesionados é usualmente referida como gomose. A presença desse composto produzido pelos ductos traumáticos gomosos é uma das características da leprose dos citros, ela ocorre nos tecidos caulinares lesionados pelo CiLV-C (MARQUES et al., 2007b). Segundo Gedalovich e Fanh (1985), o conteúdo da goma produzida em caules de *Citrus* lesionados por *Phytophthora* é um polissacarídeo constituído basicamente por cadeias ramificadas de galactose, com ramos laterais contendo arabinose ou ácido glucorônico.

Em todas as lesões foliares causadas pela leprose dos citros, seja no tipo nuclear ou no tipo citoplasmático, houve decréscimo na quantidade de grãos de amido (dados não ilustrados). No entanto, essas lesões diferiram na morfologia externa e interna. É fato que a mesma espécie de ácaro, ou seja, *Brevipalpus phoenicis* causa esses dois sintomas (BASTIANEL et al., 2006) e que os dois vírus são distintos (FREITAS-ASTÚA et al., 2005). Segundo Bastianel et al. (2006) o clima ameno pode favorecer a presença do CiLV-N, uma vez que a temperatura média anual dos municípios de Amparo é de 21.0 °C e de Monte Alegre do Sul é de 20.8 °C, enquanto em Piracicaba é de 21.6 °C (CEPAGRI, 2008). Segundo Tomczyk e Kropczynska (1985), os sintomas dos ataques por ácaros podem ser alterados pelo clima durante e após a sua alimentação, pois o calor e a umidade podem intensificar os sintomas do dano. Além disso, a movimentação dos vírus nos tecidos lesionados também é influenciada pela alta temperatura (BOYKO et al., 2000), esta informação vem de encontro com a hipótese de que a movimentação do CiLV-C pode ser diferente da do CiLV-N.

A respeito das viroses transmitidas por *Brevipalpus* (VTBs) já foram realizados estudos anatômicos na Mancha Anular do Cafeeiro (MAC) (CHAGAS, 1978), *Orchid fleck virus* (OFV) (KUBO, 2006), Leprose dos Citros (MARQUES et al., 2004; 2005; 2007a e b) e lesões em *Ligustrum lucidum* (mancha anular do ligustrum – LiRSV) e *Hibiscus rosa-sinensis* (GOMES et al., 2005), *Solanum violaeifolium ringspot virus* (SvRSV) (FERREIRA et al., 2005). No caso das lesões causadas pelo OFV, e pelo SvRSV são observadas células hipertrofiadas e células necrosadas (com acúmulo de lipídio em OFV). No caso das lesões em *Ligustrum lucidum* (mancha anular do ligustrum - LiRSV), *Solanum violaeifolium* e *Hibiscus rosa-sinensis*, a hipertrofia, hiperplasia e plasmólise são observadas, sintomas estes freqüentemente encontrados nas lesões virais causadas pelo CiLV. Gomes et al. (2004a) estudaram as alterações anatômicas

em folhas de *Citrus* sp. causadas pelas doenças não sistêmicas “Concentric Ring Blotch” (CRB) e ‘Clorose Zonada’(CZ) que, segundo Bitancourt (1934 e 1955), teriam sintomas morfológicos similares aos da leprose. As alterações anatômicas observadas foram hipertrofia e necrose celular. Apenas nas lesões de CRB havia acúmulo de cristais de oxalato de cálcio nos espaços intercelulares (GOMES et al., 2005). Tais cristais possuem função na morte celular programada (CEITA et al., 2007) e são relatados para os tecidos caulinares lesionados (Capítulo 5).

Eletroforese Protéica

Para realizar a eletroforese de proteínas, foram utilizados tecidos foliares com ou sem lesões. Na tabela 1 é apresentada a relação das amostras que foram utilizadas.

Tabela 1 - Relação das amostras utilizadas e suas respectivas procedências

Nº da amostra	Tipo de tecido		Procedência
1	Tecido sadio		Monte Alegre
2	Tecido sadio		Piracicaba
3	Tecido sadio		Laboratório
4	Lesão Inicial	(CiLV-C)	Laboratório
5	Lesão Intermediária	(CiLV-C)	Laboratório
6	Lesão Avançada	(CiLV-C)	Laboratório
7	Lesão Pequenas	(CiLV-C)	Piracicaba
8	Lesão Maior	(CiLV-C)	Piracicaba
9	Lesão Pequenas	(CiLV-N)	Monte Alegre do Sul
10	Lesão Maior	(CiLV-N)	Monte Alegre do Sul

Análise quantitativa pelo método de Bradford

Os resultados obtidos com a quantificação protéica dos tecidos lesionados mostram que ocorreu aumento na quantidade de proteínas em relação aos respectivos tecidos sadios (tabela 2).

As plantas sadias provenientes de campo apresentaram maior concentração protéica em comparação com as plantas sadias provenientes do experimento de inoculação.

Para as plantas inoculadas, observou-se que há um ligeiro aumento na concentração protéica das amostras. As folhas com lesões causadas pelo CiLV-C provenientes do campo apresentaram maior concentração protéica em relação àquelas provenientes de inoculação. Nas amostras de lesões causadas pelo CiLV-N ocorreu um aumento na concentração protéica em relação aos tecidos lesionados pelo CiLV-C.

Tabela 2 - Absorbância dos extratos das amostras. A última coluna corresponde ao valor final da concentração protéica das amostras

Amostra	Abs 595		Abs média		Conc (mg/mL)
1	0,216	0,185	0,148	0,183	1,910
2	0,175	0,157	0,222	0,185	1,929
3	0,164	0,044	0,125	0,111	1,114
4	0,163	0,216	0,138	0,172	1,792
5	0,183	0,065	0,147	0,132	1,342
6	0,094	0,111	0,123	0,109	1,095
7	0,211	0,253	0,256	0,240	2,541
8	0,253	0,218	0,188	0,220	2,316
9	0,214	0,294	0,264	0,257	2,732
10	0,261	0,26	0,302	0,274	2,920

Análise protéica por géis de policrilamida

Foram corridos géis contendo duas concentrações diferentes das amostras (figuras 3 e 4), com a finalidade de se esclarecer se a ausência de bandas na amostra 3 (tecidos sadios provenientes de inoculação) era devido à baixa concentração protéica nos tecidos. Ficou evidenciado com estas análises, que nessa amostra havia de fato uma menor concentração protéica, e conseqüente menor intensidade das bandas. Isto, provavelmente, se deveu ao fato de que as demais plantas sadias eram provenientes de campo, e, portanto, submetidas aos fatores ambientais os quais poderiam induzir a expressão de diversas proteínas.

Os tecidos sadios provenientes de Monte Alegre do Sul e de Piracicaba apresentaram similaridades quanto aos perfis protéicos (amostras 1 e 2). Porém, quando comparadas com os tecidos sadios provenientes do laboratório verificou-se que estes últimos não apresentaram a

mesma intensidade para as bandas protéicas das amostras de tecidos sadios provenientes de campo.

Em relação às lesões provenientes de inoculação mantidas em laboratório ocorreu um aumento na intensidade das bandas situadas próximas a 64 Kda (figura 3). As lesões causadas pelo CiLV-C provenientes de campo apresentaram maior intensidade na banda situada entre 64 e 55 Kda, e menor intensidade na banda situada a 98 Kda (figura 3).

As amostras contendo lesões causadas pelo CiLV-N (amostras 9 e 10) apresentaram aumento na intensidade da banda situada a 98 Kda em comparação com os tecidos sadios. Comparando com as lesões causadas pelo CiLV-C (amostras 7 e 8) notou-se menor intensidade na banda situada entre 64 e 50 Kda, e uma maior intensidade da banda situada a 98 Kda (figuras 3 e 4). Outra diferença observada foi a ausência da banda situada a 250 Kda, a qual estava presente tanto nos tecidos sadios provenientes de Monte Alegre do Sul (amostra 1) quanto nas lesões causadas pelo CiLV-C (amostras 4 a 8) (figura 3).

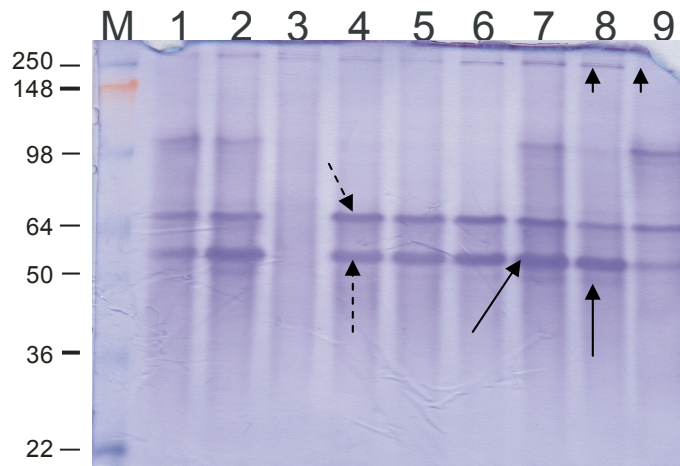


Figura 3 - Gel de Poliacrilamida com concentração das amostras em 1X o valor estipulado no espectrofotômetro. As setas menores indicam a comparação da presença (amostra 8) e ausência (amostra 9) da banda situada a 250 Kda. As setas tracejadas indicam a presença das bandas nas amostras provenientes de inoculação. As setas maiores indicam a intensidade das bandas situadas entre 50 e 64 Kda

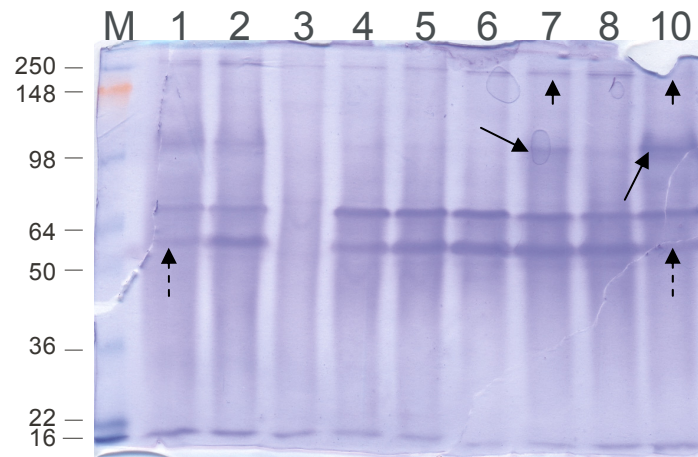


Figura 4 - Gel de Poliacrilamida com concentração das amostras em 2X o valor estipulado no espectrofotômetro. As setas menores indicam a comparação da presença (amostra 8) e ausência (amostra 10) da banda situada a 250 Kda. As setas tracejadas indicam a comparação entre as bandas situadas entre 64 e 50 Kda. As setas maiores indicam um aumento de intensidade da banda a 98 Kda na amostra 10 em comparação com a amostra 7

As amostras de folhas contendo lesões causadas pelo CiLV-C provenientes de inoculação não apresentaram a banda situada a 98 Kda, mas apresentaram duas bandas com alta intensidade de coloração situadas próximas a 64 Kda. Em comparação com o tecido controle as lesões de CiLV-C apresentaram uma banda bem distinta situada a 98 Kda e duas outras situadas próximas a 64 Kda, estas últimas apresentaram-se com maior intensidade quando comparadas com os tecidos sem lesões.

Os tecidos de todas as amostras lesionadas tanto com o CiLV-N quanto com o CiLV-C apresentaram as bandas na faixa de 64 Kda, só diferindo quanto à intensidade das bandas a 98 Kda (figura 4). A ausência desta banda em plantas inoculadas poderia estar correlacionada com a não síntese dessas proteínas, ou ainda com a sua degradação durante a infecção pelo CiLV-C. Talvez essa banda consista de proteínas relacionadas com a defesa da planta, uma vez que nas lesões com o CiLV-N essas proteínas estavam presentes em maior quantidade do que naquelas lesões causadas pelo CiLV-C. Um outro fator de distinção entre as duas lesões foi a presença de bandas à 250 kda em todas as amostras exceto nas amostras com lesões causadas pelo CiLV-N (figura 4).

Análise morfoanatômica das lesões nos frutos

Os frutos de ambos os tipos de leprose eram diferentes quanto ao número de lesões e aparência das mesmas. Sendo as lesões de leprose do tipo nuclear mais numerosas que as lesões de leprose do tipo citoplasmática (figuras 6 A e 7A). Tais resultados são semelhantes aos descritos por Bastianel et al. (2006).

Foram coletadas lesões com tamanhos distintos nos frutos com o CiLV-N, sendo observados os possíveis estágios da evolução das lesões nesses frutos (figura 5).

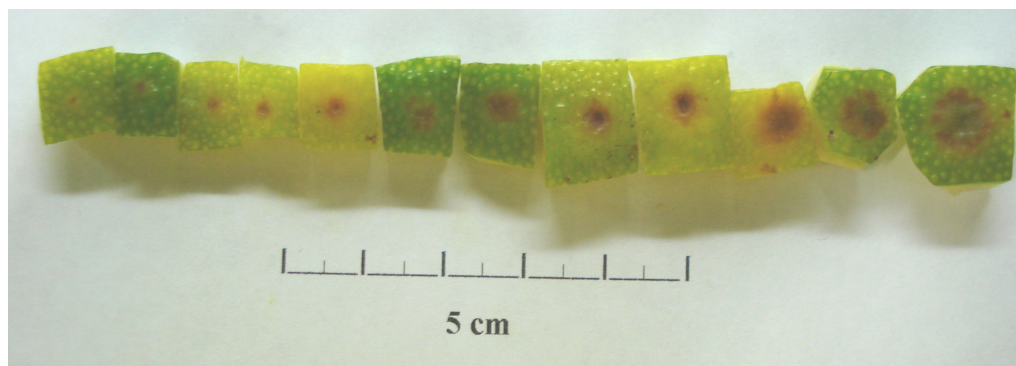


Figura 5 - Possíveis estágios da evolução das lesões causadas pelo CiLV-N nos frutos de laranja-doce

Os dois tipos de lesões (CiLV-C e CiLV-N) iniciavam como um ponto avermelhado no pericarpo envolvido por um halo clorótico pouco perceptível (dados não ilustrados). Porém, houve diferença entre as lesões na fase avançada (figuras 6 B e 7 B). Nessa fase, os dois tipos de lesões apresentaram o centro necrótico, o halo intermediário e o halo clorótico. Nas lesões causadas pelo CiLV-N o halo intermediário era avermelhado e o halo clorótico era mais intenso (figura 6 B). Nas lesões causadas pelo CiLV-C o halo intermediário era clorofilado e envolvido pelo halo necrótico e, este último, pelo halo clorótico (figura 7 B). As lesões citoplasmáticas possuíam um halo adicional e, portanto, eram maiores. Posteriormente havia o coalescimento do halo com a região central necrótica, promovendo uma lesão necrosada deprimida (dados não ilustrados). Em ambas as lesões a depressão na superfície do fruto na região central era perceptível. De acordo com Bitancourt (1995) as lesões nos frutos maduros apresentam o halo clorótico pouco perceptível, pois se confunde com o epicarpo amarelo.

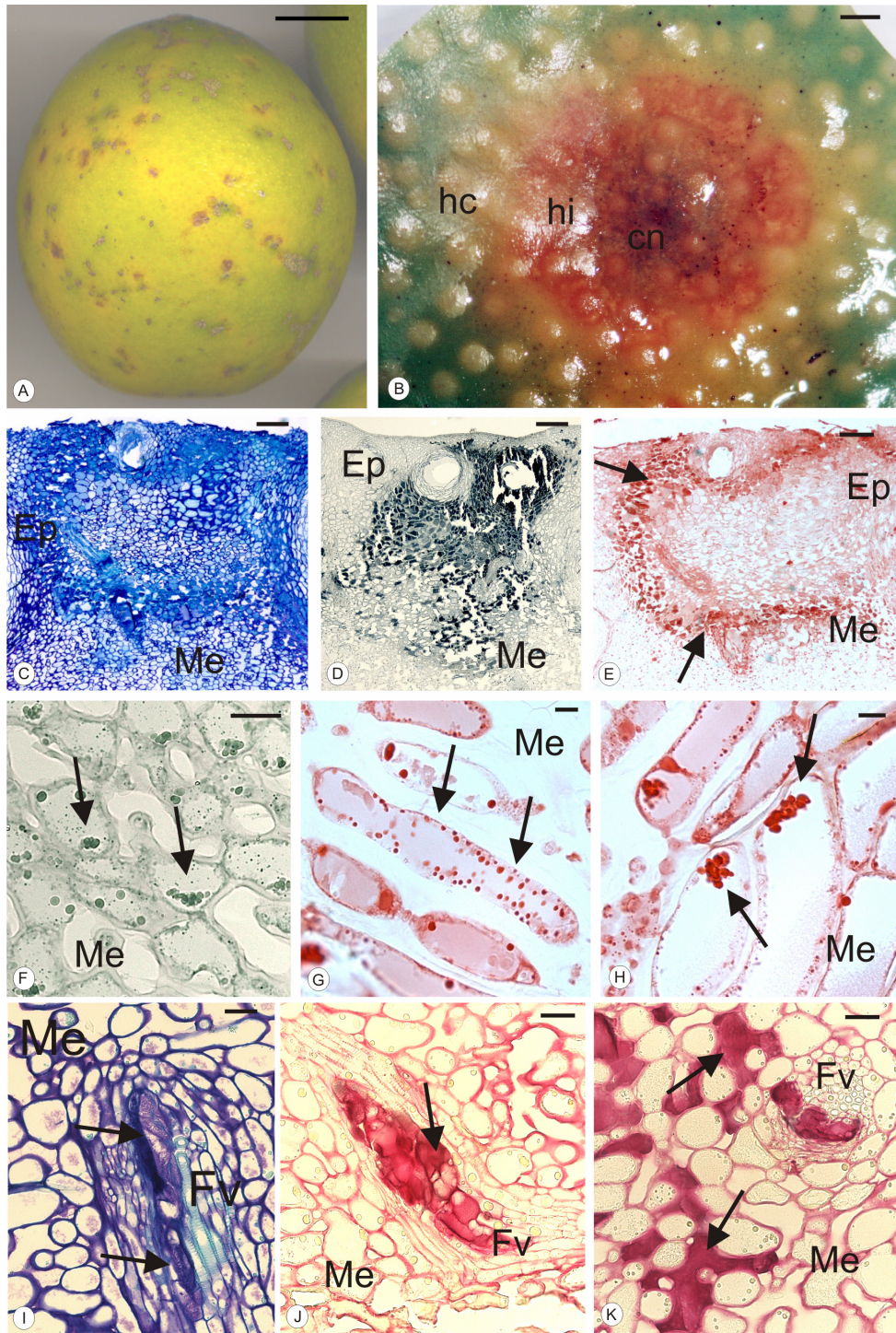


Figura 6 - Lesões nos frutos de laranjeira-doce causadas pelo CiLV-N. A. Visão geral (Barra - 1,2 cm). B. Lesão típica com suas respectivas regiões: Cn - centro necrótico; Hi - halo intermediário; Hc - halo clorótico (Barra - 1mm). C-K. Cortes transversais da lesão indicada em B. C. Visão geral (Barra - 100 μ m). D-E. Acúmulo de lipídios no centro necrótico (D) e de proteínas (E) no halo externo ao centro (setas) (Barras - 100 μ m). F-G. Gotículas no interior das células que coram com Sudan Black B (F) e Xylydine Ponceau (G e H) (Barras F-H - 10 μ m). I. Ducto traumático gomoso (seta) junto do feixe vascular (Barra - 30 μ m). J. Reação positiva para vermelho de rutênio no ducto traumático gomoso (Barra - 30 μ m). K. Presença de compostos pécicos nos espaços intercelulares do mesocarpo (setas). Notar que nesta região há um ducto traumático gomoso (Barra - 30 μ m). Ep - Epicarpo; Me - Mesocarpo; Fv - Feixe Vascular

Nas lesões avançadas causadas pelo CiLV-C e pelo CiLV-N foram verificadas alterações no epicarpo e no mesocarpo (figuras 6 C-E e 7 C e F). No epicarpo era possível notar no caso das lesões causadas pelo CiLV-C que havia o colapso das células das cavidades de óleo assim como do epicarpo (figura 7 J). Estes fatos corroboram com o exposto por Bitancourt em 1934 de que a depressão da lesão no fruto tinha como causa o colapso dos tecidos. O referido autor comenta que não há formação de tecido corticoso fato este comprovado pelas análises anatômicas aqui apresentadas.

Os tecidos situados no centro de ambas as lesões acumulavam compostos de natureza lipídica (figura 6 D). Nas lesões nos frutos e nas lesões foliares causadas tanto pelo CiLV-C quanto pelo CiLV-N observou-se o acúmulo de compostos de natureza lipídica nos tecidos necrosados. Freitas-Astúa et al. (2007) verificaram a indução à expressão dos genes para a enzima lipoxigenase (LOX) a qual está correlacionada com a biossíntese de lipídios poliinsaturados (FEUSSNER; WASTERACK, 2002), sendo que os intermediários gerados na via da lipoxigenase possuem função de defesa da planta. Shah (2005) comenta que o metabolismo de lipídios tem um papel crítico na patogênese e na expressão de respostas de defesa nas plantas. No entanto, não há na literatura trabalho relacionando necrose com o acúmulo de compostos lipídicos, nem o tipo de lipídio que poderia estar sendo acumulado.

A região central de ambas as lesões que acumulavam compostos de natureza lipídica estavam delimitadas por um grupo de células que acumulavam compostos de natureza protéica (figuras 6 E e 7 F) que, por sua vez, era delimitado por células contendo gotas que reagem tanto para Sudan Black B (figuras 6 F-H e 7 H) quanto para Xylidine Ponceau (figura 6 G-H e 7 G). Essas gotas também foram verificadas no mesocarpo junto ao parênquima vascular dos feixes vasculares (figura 7 I) e ocorriam como gotículas espalhadas pelas células (figura 6 G) ou como agregados (figura 6 H). De acordo com KOPITO (2000), a formação de agregados protéicos é facilitada por um estresse oxidativo, térmico e alterações na estrutura primária das proteínas. No caso da leprose dos citros estes agregados protéicos podem ser resultantes do estresse causado pela infecção viral.

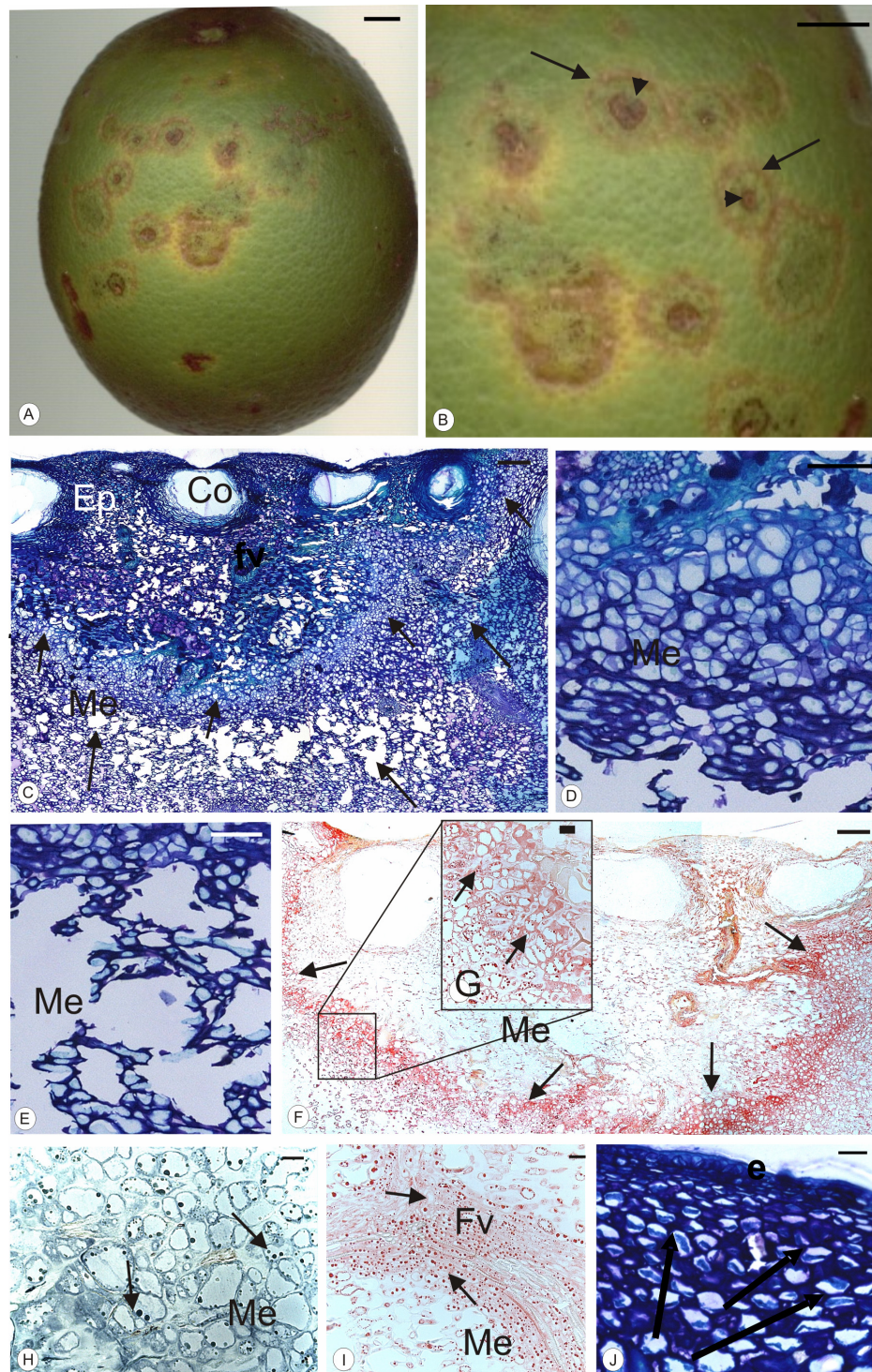


Figura 7 - Lesões nos frutos de laranja-doce causadas pelo CiLV-C. A-B. Visão geral e detalhe das lesões nos frutos com halos necróticos (setas) ao redor dos centros necróticos (ponta de seta) (Barras - 1 cm). C-J. Cortes transversais da lesão. C. Região de lise (setas) em destaque em E, e hiperplasia (setas) em destaque em D (Barras - C - 100 μ m; D-E - 30 μ m). F. Halo protéico após coloração com Xylidine Ponceau (setas) (Barra - 100 μ m). G-H. Detalhes da região em destaque em F com gotículas protéicas (setas em G) e lipídicas (setas em H) (Barras - 30 μ m e 10 μ m). I. Gotículas (setas) situadas junto ao feixe vascular (Fv) no mesocarpo (me) (Barra - 30 μ m). J. Detalhe da região necrosada (Barra - 10 μ m). Co - cavidade oleífera; E - epiderme; Ep - epicarpo

Na lesão avançada causada pelo CiLV-C no limite entre a região com acúmulo de lipídio e aquela com acúmulo de proteínas (figura 7 G) havia uma faixa de células em divisão (figura 7 D) delimitada em quase toda a sua extensão (figura 7 C) por células que sofreram lise (figura 7E). Essas faixas de células podem de algum modo restringir o tamanho da lesão de acordo com a premissa de que as células em hiperplasia não apresentam partículas virais em seu interior (GOMES et al., 2004b).

No caso das lesões causadas pelo CiLV-N foram observados ductos traumáticos gomosos nos feixes vasculares situados adjacentes à região lesionada (figuras 3 J e K) e, em alguns setores, o acúmulo de compostos de natureza pectínica nos espaços intercelulares (figura 3K).

4.4 Considerações finais

- O centro necrótico nas lesões causadas pelo CiLV-N e os halos, pontoações e elevações necróticas causadas pelo CiLV-C possuem natureza lipídica. Tais regiões são envoltas por células que acumulam compostos protéicos. Esse padrão é uma característica das lesões lepróticas.

- As lesões causadas pelo CiLV-N diferem daquelas causadas pelo CiLV-C por apresentarem ductos traumáticos gomosos nos feixes vasculares tanto nos frutos como na folhas.

- A plasmólise foi verificada em ambas as lesões e pode ser um fator importante na restrição do crescimento da lesão.

Referências

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The *Citrus* leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 211-220, 2006.

BITANCOURT, A.A. **As manchas das laranjas**: descrição das principais manchas, podridões e outras alterações das laranjas, e dos meios de combatê-las. São Paulo: Instituto Biológico, 1934. 135 p. (Boletim, 53).

_____. Estudos sobre a leprose dos *Citrus*. I. Distribuição geográfica e sintomatologia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 22, p. 161-184, 1955.

BOYKO, V.; FERRALLI, J.; HEINLEIN, M. Cell-to-cell movement of TMV rna is temperature dependent and corresponds to the association of movement protein with microtubules. **The Plant Journal**, New York, v. 22, n. 4, p. 315-325, 2000.

CEITA, G.O.; MACEDO, J.N.A.; SANTOS, T.B.; ALEMANNI, L.; DA SILVA GESTEIRA, A.; MICHELI, F.; MARIANO, A.C.; GRAMACHO, K.P.; DA COSTA SILVA, D.; MEINHARDT, L.W.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C.M.; Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*, **Plant Science**, Shannon, v. 173, n. 2, p.106-117, 2007.

CENTRO DE PESQUISAS METEREOLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS À AGRICULTURA. Disponível em: <<http://www.cpa.unicamp.br>>. Acesso em: 16 jan. 2008.

CHAGAS, C.M. **Mancha anular do cafeeiro**: transmissibilidade, identificação do vetor e aspectos anatomo-patológicos. 1978. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978.

_____. Morphology and intracellular behaviour of coffee ringspot virus (CRV) in tissues of coffee (*Coffea arabica* L.). **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 99, p. 301-309, 1980.

CHAMBERLAIN, C.J. **Methods in plant histology**. Chicago: The University of Chicago Press, 1932. 416 p.

COLARICCIO, A.; LOVISOLO, A.; CHAGAS, C.M.; GALETTI, S.R.; ROSSETTI, V.E.; KITAJIMA, E.W. Mechanical transmission and ultra-structural aspects of Citrus leprosis virus. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 208-213, 1995.

COUTTS, R.H.A. Supression of virus induced local lesions in plamolysed leaf tissue. **Plant Science Letters**, Limerick, v. 12, p. 77-85, 1978.

CORTELAZZO, A.L. **Caracterização CELULAR E BIOQUÍMICA DE SEMENTES**. Campinas: UNICAMP, 2007. 13 p.

ESAU, K. Some anatomical aspects of plant virus disease problems. **Botanical Review**, New York, v. 4, p. 548-579, 1938.

FANH, A. Secretory tissues in vascular plants. Tansley review N° 14, **New Phytologist**, Lancaster, v. 108, p. 229-257, 1988.

FERREIRA, P.T.O. **Characterization of a baciliform virus isolated from *Solanum violaeifolium* transmited by *Brevipalpus phoenicis geijskes* (Acari: Tenuipalpidae)**. 2005. 85p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C. The lipoxygenase pathway. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 275-297, 2002.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, Berlin, v.16, p. 92-96, 1968.

FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; BASTIANLE, M.; LOCALI, E.C.; ANTOLNIOLI, R.; MACHADO, M.A. Identification of Citrus leprosis virus - nuclear type (CiLV-N) in sweet orange in the State of Rio Grande do Sul. **Virus Reviews & Research**, Manghuinhos, suppl. 9, p. 247, 2004a.

FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; LOCALI, E.C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A.. Further evidence to support that Citrus leprosis virus-cytoplasmic and nuclear types are different viruses. In: CONGRESO ANUAL DE LA SOCIEDAD AMERICANA DE FITOPATOLOGÍA, 45., 2005, Porto Rico: División Caribe, 2005. 1 CD-ROM.

FREITAS-ASTÚA, J.; BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E.C.; NOVELLI, V.M.; BASÍLIO-PALMIERI, A.C.; SILVA-PINHATI, A.C.; TARGON, M.L.PN.; MACHADO, M.A. Differentially expressed stress-related genes in the compatible Citrus-Citrus leprosis virus interaction. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, suppl. 3, p. 980-990, 2007.

GEDALOVICH, E.; FAHN, A. The development and ultrastructure of gum ducts in Citrus plants formed as a result of brown-rot gummosis. **Protoplasma**, New York. v. 127, p. 73-81, 1985.

GILBERTSON, R.L.; LUCAS, W.J. How do viruses traffic on the vascular highway? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 1, n. 8, p. 250-251, Ago. 1996.

GOMES, R.T.; MARQUES, J.P.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; KITAJIMA, E.W. Anatomical comparison of *Citrus* leprosis (cytoplasmic and nuclear types), *Citrus* zonate chlorosis and *Citrus* chlorotic ring blotch lesions. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 15., 2004, São Pedro. **Anais...** São Paulo: Sociedade de Virologia Nacional, 2004a. 1 CD-ROM

_____. Anatomical comparison of leaves lesions caused by some cytoplasmic and nuclear type of viruses transmitted by *Brevipalpus* (Acari: Tenuipalpidae) mites. In: CONGRESO ANUAL DE LA SOCIEDAD AMERICANA DE FITOPATOLOGÍA, 45., 2005, Porto Rico: División Caribe, 2005. 1 CD-ROM.

GOMES, R.T.; MARQUES, J.P.R.; SALAROLI, R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; KITAJIMA, E.W. Análise ultra-estrutural de lesões foliares causada pela leprose do citros – tipo citoplasmático – e distribuição das células infectadas na lesão. In: MOSTRA ACADÊMICA, 12.; ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2., 2004, Piracicaba. **Resumo expandido...** Piracicaba: UNIMEP, 2004b. 1 CD-ROM.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: W. H. Freeman, 1962. 408 p.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.

KITAJIMA, E.W.; COSTA, A.S. Partículas baciliformes associadas à mancha anular do cafeeiro. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 24, p. 542-45, 1972.

KITAJIMA, E.W.; LAURITIS, J.A. Plant virions in plasmodesmata. **Virology**, New York, v.37, n. 4, p. 681-684, 1969.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M.; RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 135-160, 2003.

KITAJIMA, E.W.; FERREIRA, P.T.O.; FREITAS-ASTÚA, J. Ocorrência da leprose dos citros, tipo nuclear (CiLV-N), nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n.1, p. 68, 2004.

KITAJIMA, E.W.; MULLER, G.W.; COSTA, A.S.; YUKI, W. Shot, rod-like particles associated with *Citrus* leprosis. **Virology**, Amsterdam, v. 50, p. 254-258, 1972.

KOPITO, R.R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. **Trends in Cell Biology**, London, v. 10, p. 524-530, 2000.

KUBO, K. **Detecção e variabilidade do gene de nucleocapsídeo de isolados de diferentes regiões geográficas do vírus da mancha das orquídeas (“Orquid fleck virus” - OFV)**. 2006. 101 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2006.

LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.N.; KISHI, L.; MACHADO, M.A. Sequenciamento completo do genoma do vírus da leprose dos citros (CiLV-C). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 191, 2005.

LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M.L.P.N.; MACHADO M.A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of *Citrus* leprosis virus cytoplasmic type. **Journal General Virology**, Reading, v. 87, p. 2721–2729, 2006.

MARQUES, J.P.R.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Estudo histológico de lesões foliares causadas pelo *Citrus* leprosis vírus nuclear type (CiLV_N) em laranja doce. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 58., 2007, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Botânica, 2007. 1 CD-ROM

MARQUES, J.P.R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTUA, J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomia de lesões lepróticas foliares e de frutos de duas espécies do gênero *Citrus*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 12., 2004, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 2004. 1 CD-ROM.

- MARQUES, J.P.R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTUA, J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomia, histoquímica e ultra-estrutura das lesões lepróticas caulinares e foliares em *Citrus sinensis* (L.) Osb. 'Pêra'. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 13., Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 2005. 1 CD-ROM.
- MARQUES, J.P.R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTUA, J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose-dos-citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1531-1536, nov. 2007.
- OPARKA, K.J. Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. **Plant Cell**, Watesbury, v. 9, p. 1381-1396, 1997.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry, theoretical and applied**. 3rd ed. London: Churchill, 1968. v. 1, 998 p.
- RODRIGUES, J.C.V. **Leprose dos citros: cito-histopatologia, transmissibilidade e relação com o vetor *Brevipalpus phoenicis***. 1995. 79 p. Dissertação (Mestre em Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.
- RODRIGUES, J.V.C.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M.; MACHADO, M.A. *Citrus* leprosis. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 161–179, 2003.
- SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.
- SHAH, J. Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 229–260, 2005.
- TOMCZYK, A.; KROPCZYNSKA, D. Effects on the host plant. In: HELE, W.; SABELIS, M.W. (Ed.). **Spider mites and their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1985. v. 1A, p. 317–329.

5 ANATOMIA DAS LESÕES CAULINARES CAUSADAS PELA LEPROSE DOS CITROS

Resumo

A leprose dos citros é responsável por causar grandes danos à citricultura. Nos troncos e ramos a doença caracteriza-se por causar lesões corticosas de tonalidade avermelhada. Dependendo do estágio da doença, as lesões podem ser denominadas pústulas e apresentar fendas no sentido longitudinal. O objetivo desse estudo foi analisar a evolução das lesões da leprose do tipo CiLV – C e as alterações anatômicas nos ramos de plantas provenientes do campo a fim de compará-las com a evolução das lesões foliares e com as lesões de ramos de plantas inoculadas descritas na literatura. Para tal, amostras de lesões em diferentes estágios de desenvolvimento foram coletadas, fotografadas e fixadas em solução de Karnovsky. Posteriormente estas amostras foram submetidas à desidratação em série etílica e infiltradas em resina hidróxi-etil-metacrilato (Leica Historessin). As amostras foram seccionadas em micrótomo rotativo a 5-7 µm de espessura e coradas com azul de toluidina para as análises histológicas usuais. Também foram realizados testes histoquímicos. A captura de imagens digitais dos materiais preparados em lâminas foi realizada em microscópio equipado com câmera de vídeo. A evolução das lesões nos ramos seguiu o mesmo padrão descrito para as lesões foliares, ou seja, houve a formação de uma pontuação necrótica central e de um halo necrótico circundante. Na região da necrose havia o acúmulo de compostos lipídicos. O parênquima cortical e/ou floemático apresentava hiperplasia. Em ambas as lesões houve a diminuição da quantidade de amido, aumento de cristais de oxalato de cálcio e a presença de ductos traumáticos gomosos.

Palavras-chave: Amido; *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; Cristais; Ductos gomosos

ANATOMY OF TWIG LESIONS CAUSED BY CITRUS LEPROSIS

Abstract

The leprosis of citrus is responsible for causing major damage in fruit production. The disease, in the stems, is characterized by caused “scaly bark” lesions of reddish tone, depending on the stage they can be called blisters and make ruptures in the longitudinal direction. The aim of this study was to analyze the evolution of leprosis lesions of type CiLV-C and the anatomical alterations in the twigs of field-collected plants in order to compare to the evolution of the foliar and twigs lesions of inoculated plants already described in literature. For anatomical analysis, the samples were fixed in Karnovsky solution, dehydrated in a graded ethylic series, embedded in hydroxy-ethyl methacrylate resin (Leica Historessin), sectioned (5-7 µm thick), and stained with Toluidine blue for usual histological analysis. Histochemical tests were also carried out. The digital images were capture in a microscope with video camera. The analyzed lesion followed the

same pattern as described to foliar lesions, i.e., there was a necrotic center surrounded by a halo also necrotic. In the necrotic region there was the accumulation of lipid compounds. The cortical and, or phloematic parenchyma exhibited hyperplasia. In both lesions it was verified the decrease of starch amount and the increase of quantity of calcium oxalate crystals, and the presence of gummosis traumatic ducts.

Keywords: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; Crystals; Gummosis ducts; Starch

5.1 Introdução

A leprose do citros é considerada a virose de maior importância nos pomares do estado de São Paulo (PRIMIANO et al., 2004) acarretando danos às plantas cítricas, como a queda total dos frutos e folhas, secagem dos ramos e morte da planta, podendo a doença causar a redução de até 100% na produtividade, dependendo da variedade.

A doença possui etiologia viral, sendo o ácaro *Brevipalpus phoenicis* o principal vetor da doença no Brasil (BASTIANEL et al., 2006). O controle deste ácaro exige medidas de prevenção e controle que oneram os custos de produção, causando anualmente prejuízos da ordem de US\$ 40 a 60 milhões nos pomares do estado de São Paulo (PRIMIANO et al., 2004).

As lesões causadas pela doença são caracterizadas por afetar frutos, folhas, ramos, causando lesões localizadas, geralmente anelares, com regiões e pontuações necróticas que se alternam com regiões cloróticas. De acordo com Rossetti (2001) as lesões nos ramos são corticosas, salientes, acinzentadas, pardas ou avermelhadas, podem coalescer e provocar o secamento e morte dos mesmos. Nos ramos, inoculados via ácaros virulíferos, as lesões iniciam-se como uma saliência clorótica a qual pode evoluir para uma pústula necrótica onde são perceptíveis fendas. Tais lesões podem coalescer causando o anelamento do ramo (MARQUES et al., 2007b), e posterior morte dos mesmos. Segundo Bitancourt (1955), as lesões nos ramos provenientes de campo iniciam-se como pequenas manchas, ligeiramente salientes, devido à formação de goma nos tecidos por baixo da epiderme, arredondadas de coloração amarela verde pálida.

Nos caules inoculados com o vírus da leprose do tipo citoplasmática (CiLV – C) foram verificadas alterações nos tecidos vasculares, em especial, no floema e a produção de ductos traumáticos gomosos (MARQUES et al., 2007b). A produção de goma pelos ductos pode ser referida como gomose (FAHN, 1988). Em *Citrus* sp. já foram identificadas outras duas doenças que levam à gomose, ambas causadas por fungos, gomose causada por *Phytophthora citrophthora*

(GEDALOVICH; FAHN, 1985) e gomose causada por *Dothiorella gregária* (MORAES et al., 2007). Em ambas as doenças há danos irreversíveis à produção e à longevidade das plantas.

O objetivo desse estudo foi analisar a evolução das lesões da leprose do tipo CiLV – C e as alterações anatômicas nos ramos de plantas provenientes do campo a fim de compará-las com a evolução das lesões foliares e com as lesões de plantas inoculadas com o mesmo vírus descritas por Marques et al. (2007b).

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Material Vegetal

Ramos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Pêra’ apresentando diferentes sintomas da leprose tipo citoplasmática (CiLV – C) foram coletados na Coleção de Citrus do Departamento de Produção Vegetal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba/SP.

5.2.2 Metodologia

Análises morfoanatômicas

Amostras de ramos, apresentando lesões em estágios distintos e de ramos sadios (controle) foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) e levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar contido nos tecidos. Em seguida, foram desidratadas em série etílica e infiltradas em resina hidróxi-etil-metacrilato (Leica Histo-resin). Os blocos obtidos foram seccionados a 5-7 µm de espessura (secções transversais e/ou longitudinais) em micrótomo rotatório (Leica RM 2045) com navalha de aço do tipo C. Posteriormente, os cortes foram corados com azul de toluidina 0,05% (SAKAI 1973) para as análises histológicas usuais. Também foram utilizados corantes e reagentes em cortes preparados em lâminas. O Sudan black B (PEARSE, 1968) foi utilizada para detectar substâncias de natureza lipídica; o cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para verificar a formação de compostos de natureza fenólica; o cloreto de zinco iodado (JENSEN, 1962) para detectar amido; a aniline blue black (FISHER, 1968) para compostos de natureza protéica; o vermelho de rutênio (CHAMBERLAIN, 1932) para a detecção de compostos de natureza péctica; o Xylidine Ponceau para detecção de compostos protéicos (CORTELLAZO, 2007). Depois de coradas, as lâminas histológicas foram montadas em resina

sintética “Entellan” e as imagens foram capturadas com câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DMLD. Também foi utilizada a observação sob luz polarizada para a visualização dos cristais de oxalato de cálcio e fibras. As escalas micrométricas foram obtidas nas mesmas condições ópticas utilizadas.

5.3 Resultados e Discussão

Análise Morfológica

Nas lesões nos ramos ocorriam estágios similares da evolução da lesão observados para as folhas por Appezzato-da-Glória et al. (2006) em relação à presença da lesão intermediária, ou seja, com uma pontoação necrótica central e um halo necrótico circundante (figuras 1 A, D-E) e a presença de halos necróticos sucessivos (figura 1E). No entanto, nos estágios seguintes as lesões nos ramos diferiam daquelas descritas para as folhas, por apresentar a superfície necrosada e ligeiramente deprimida (figuras 1 B-C) sendo caracterizada como lesão necrótica deprimida. Numa etapa seguinte, a lesão tornava-se corticosa caracterizada pela presença de escamas ou pústulas que se sobressaiam em relação ao eixo caulinar (figuras 1 F-G), algumas pústulas podiam apresentar-se com morfologia circular (figura 1 F) ou com fendas. Este tipo de lesão era frequentemente observado em ramos mais velhos e, segundo Knorr e Price (1958), este estágio da lesão denomina-se “scaly bark”. Às vezes torna-se impossível distinguir as lesões em ramos severamente infectados devido à coalescência das mesmas (dados não ilustrados).

Os ramos ainda clorofilados apresentavam lesões em suas bases (figura 1 H). A presença dessas lesões em muitas bases de ramos já secos (figura 1 I e J) seria um indicativo de que essas poderiam estar correlacionadas com o definhamento dos ramos, como verificado por Bitancourt (1955).

Aspectos anatômicos

As lesões dos ramos de material proveniente do campo seguem o mesmo padrão descrito por Marques et al. (2007b) em ramos inoculados pelo CiLV-C. Há alterações na epiderme, no córtex e no tecido vascular, sendo que as alterações neste último, provavelmente estejam correlacionadas com o definhamento dos ramos, pois há o acúmulo de compostos de natureza péctica nos espaços intercelulares (Figuras 2 F e G e 3 G e H) e o colapso de células floemáticas

(figuras 3 G e H) sintomas já verificados em ramos inoculados por Marques et al. (2007b). A translocação do vírus das regiões lesionadas para as regiões não lesionadas também é comprometida, pois conforme discutido por Marques et al. (2007b), a movimentação do vírus a longas distâncias ocorre de acordo com a translocação de fotoassimilados (ROBERTS et al. 1997).



Figura 1 - Lesões da leprose do tipo CiLV – C em ramos de *Citrus sinensis* L. Osbeck ‘Pêra’ provenientes do campo. A D e E. Lesões Intermediárias. Notar os halos necróticos (setas) (Barras - 1mm). B-C. Lesões necróticas deprimidas. A seta em B indica o halo necrótico da lesão intermediária (Barras - 1mm). F-G. Lesões corticosas. As lesões podem apresentar halos (seta em F) ou fendas (seta em G). H. Lesões na base dos ramos clorofilados (setas). I. Lesões na base de um ramo seco (setas). J. Conjunto de ramos secos onde eram perceptíveis lesões de leprose em suas bases

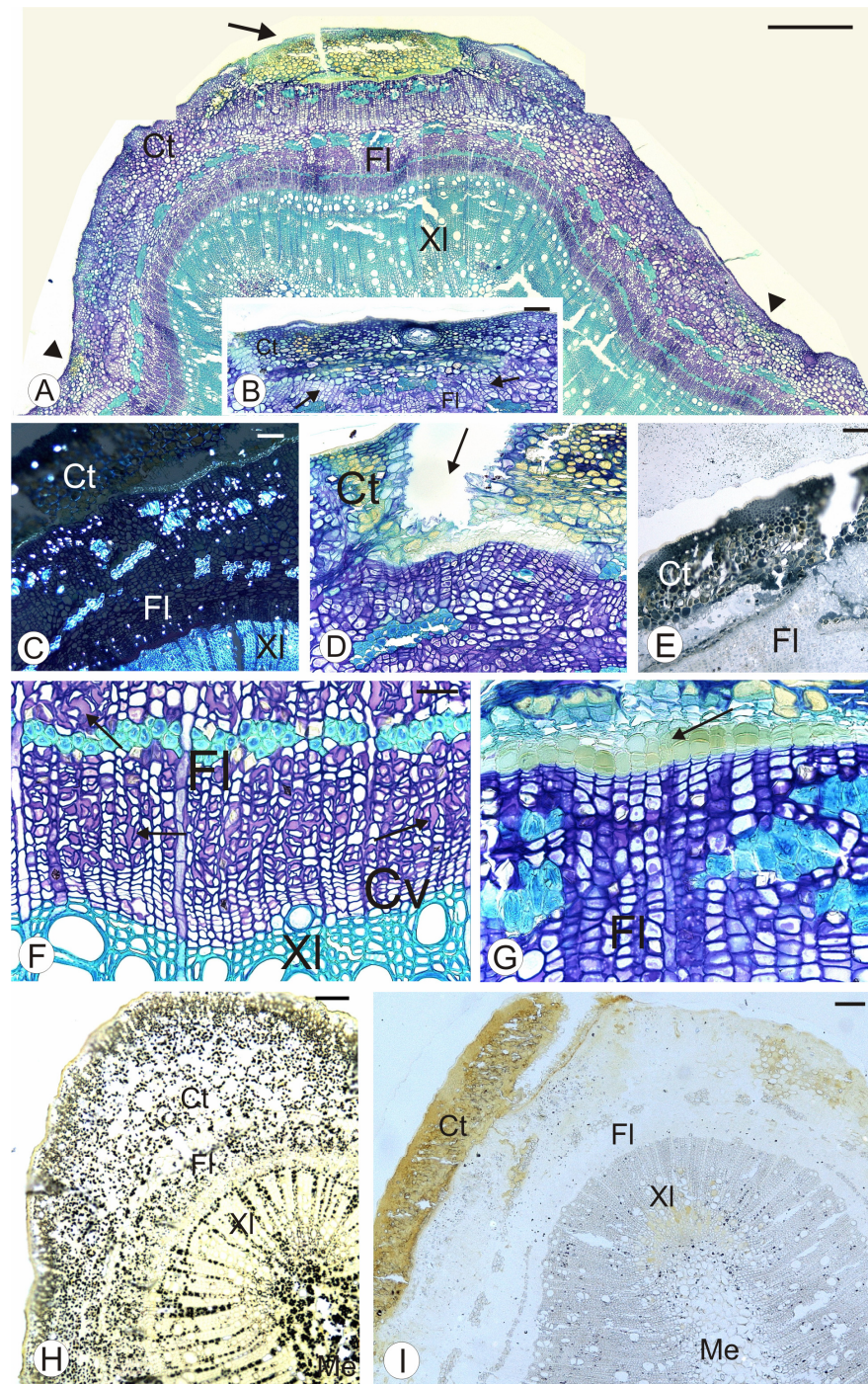


Figura 2 - Cortes transversais das lesões intermediárias causadas pela leprose do tipo CiLV – C em ramos de *Citrus sinensis* L. Osbeck ‘Pêra’. A. Região central da lesão (seta) e o halo necrótico (pontas de seta) (Barra - 200µm). B. Detalhe do halo necrótico (Barra - 50µm). C. Cristais de oxalato de cálcio no córtex e no floema observados sob luz polarizada. (Barra - 30µm). D. Fenda na superfície do caule resultante da hiperplasia das células corticais (Barra - 30µm). E. Região necrosada corada pelo Sudan Black B (Barra - 30µm). F. Floema secundário apresentando acúmulo de compostos pécicos nos espaços intercelulares (Barra - 30µm). G. Região de hiperplasia do floema e formação do meristema de cicatrização (seta) (Barra - 30µm). H-I. Teste com cloreto de zinco iodado. Notar a alta quantidade de amido (pontos enegrecidos) nos tecidos saudáveis (H) em relação aos tecidos lesionados (I) (Barras - 100µm). Ct – Córtex; Cv – Câmbio vascular; Ep – Epiderme; Fl – floema; XI – Xilema

As lesões necróticas deprimidas apresentam similaridades quanto à sua estrutura anatômica quando comparada com a lesão intermediária, portanto aqui apenas serão descritos os caracteres anatômicos da lesão intermediária. Nas lesões intermediárias foi verificada a presença de uma região necrótica central e duas regiões necróticas adjacentes as quais correspondiam ao halo que circunda a lesão (figuras 1A e 2A). Na região da necrose as células epidérmicas e corticais acumulavam compostos de natureza lipídica (figura 2E). Tanto na região da necrose central como na região da necrose do halo (figura 2A) as células corticais dividiam-se no sentido periclinal (figura 2B). A hiperplasia promovida pelas células corticais adjacentes à necrose promovia o rompimento dos tecidos necrosados pressionados e a formação de fenda (figura 2 D).

Já nas lesões corticosas, as regiões ainda revestidas pela epiderme, passavam a acumular compostos de natureza lipídica. Os parênquimas cortical e floemático apresentavam intensa divisão celular no sentido anti e periclinal (figuras 3 A e D) em toda a extensão do caule uma vez que toda a circunferência deste órgão apresenta-se lesionada (figuras 3 E e F) pressionando os tecidos necrosados acima situados com a formação de elevações (figura 3 F) e, posteriormente de fendas (Figura 2D).

A formação da fenda nas diferentes lesões de ramos provenientes do campo, assim como em ramos inoculados (MARQUES et al, 2007b), resultou da lise e separação das células necrosadas devido à pressão exercida pelo aumento do número de camadas celulares no córtex subjacente. Esse aumento foi resultante da hipertrofia e hiperplasia das células corticais na área da lesão e não pelo acúmulo de goma nos tecidos subepidérmicos, como descrito por Bitancourt (1955) em materiais provenientes do campo. As células necrosadas do córtex apresentaram apenas compostos de natureza lipídica; os testes para fenóis e substâncias pécnicas foram negativos. No entanto, sob as células corticais necrosadas, e acompanhando toda a extensão da fenda, observou-se um meristema de cicatrização formado a partir das células corticais ou floemáticas (figuras 2 H e 3 F). Nas lesões corticosas (figura 3F) os tecidos substituídos (epiderme e córtex) que se encontram destacados do ramo constituem as ‘escamas’ mencionadas por Knorr e Price (1958). Foi verificado que tais ‘escamas’ eram compostas por células que acumulavam compostos de natureza lipídica (dado não ilustrado). Na camada de células do meristema de cicatrização em contato com o ambiente havia o acúmulo de compostos de natureza fenólica (figura 3E). O meristema de cicatrização, também observado em ramos inoculados por

Marques et al. (2007b), é normalmente formado em áreas lesionadas e pode desempenhar uma função de proteção a

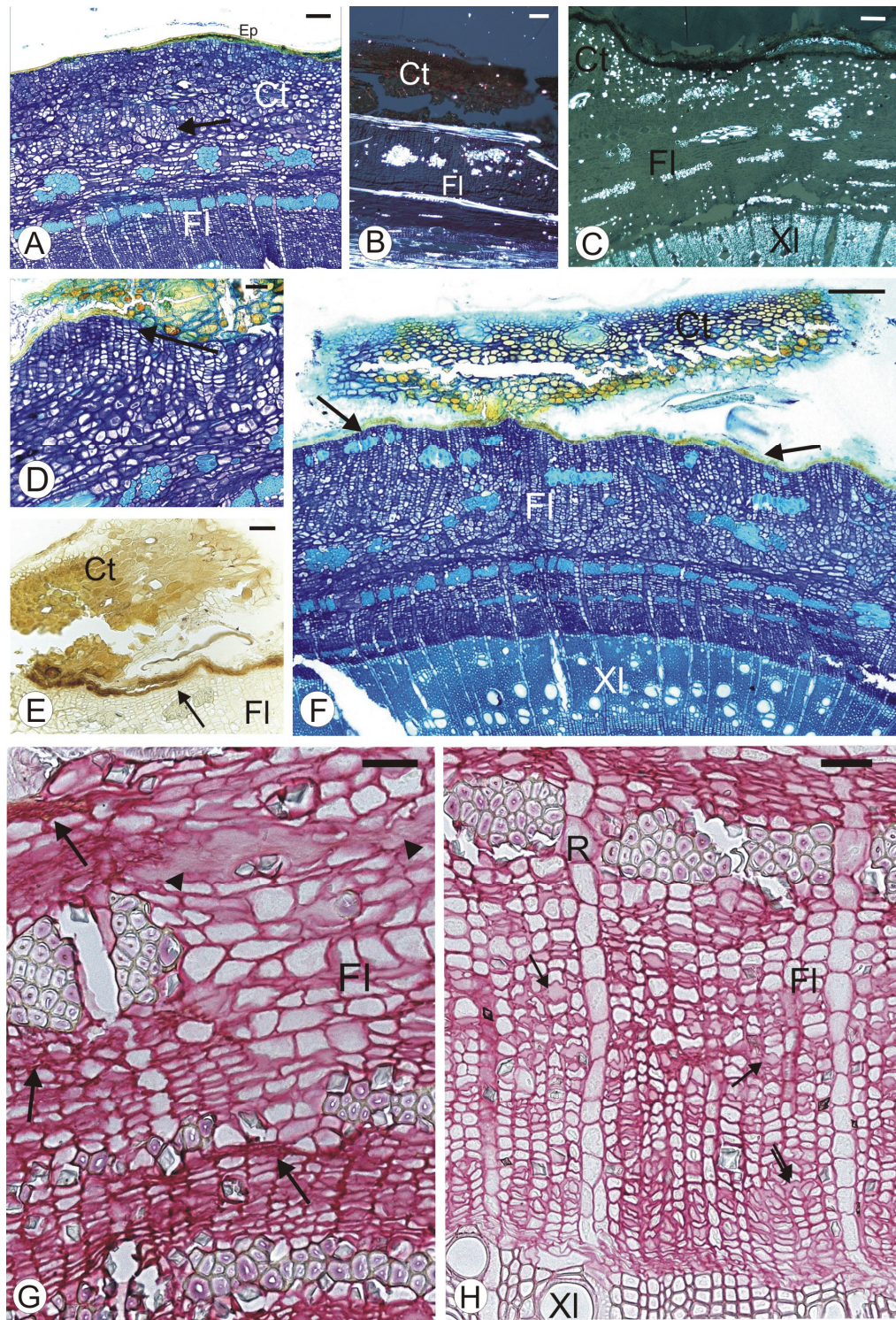


Figura 3 - Cortes transversais das lesões corticais causadas pela leprose do tipo CiLV – C em ramos de *Citrus sinensis* L. Osbeck ‘Pêra’. A. Hiperplasia no tecido cortical (setas) (Barra - 50 μm). B-C. Cristais de oxalato de cálcio observados sob luz polarizada (Barras - 50 μm). D. Divisões celulares no córtex situado abaixo das células necrosadas (Barra - 30 μm). E-F. Desligamento do córtex sob o qual está o meristema de cicatrização (setas) (Barras - 30 μm). G-H. Compostos pécicos nos espaços intercelulares do floema (pontas de seta em G e setas em H) e presença de células colapsadas (setas em G) (Barras – 10 μm). Ct – Córtex; Cv – Câmbio vascular; Ep – Epiderme; FI – floema; R – Raio vascular. XI - xilema.

despeito da causa do ferimento conforme discutido por Melo-de-Pinna et al. (2002). As autoras também descrevem a formação do meristema de cicatrização e o aumento do teor de substâncias fenólicas nas células da mina foliar de *Richterago riparia* causada por uma larva de lepidóptera.

A formação de ductos traumáticos gomosos em ramos inoculados pelo CiLV-C (Marques et al., 2007b) indicam que a formação de ductos traumáticos gomosos observada nas lesões de campo (figuras 4 A-E) é de fato induzida pelo vírus da leprose e não uma interação deste com outras viroses como foi questionado inicialmente. As células-mãe do parênquima xilemático originavam os ductos traumáticos gomosos os quais podiam ser observados entre as células do xilema secundário (figuras 4 A e B) à medida que o crescimento progredia. Em secção longitudinal foi possível verificar que as células do parênquima axial circundavam os ductos já formados (figura 4B) e possuíam conteúdo de natureza péctica. No entanto, não foi verificada a lise de células hipertrofiadas como descrita nos estágios iniciais da formação dos ductos nos ramos inoculados a qual caracteriza a origem lisígena desses (Marques et al., 2007b). Já os ductos gomosos causados por *Phytophthora critricarpa* em *Citrus* sp. (GEDALOVICH; FANH, 1985) e os ductos formados em Rosáceas (SANIEWSKI et al., 2005) resultam da dissolução da lamela média e conseqüente formação de uma cavidade esquizógena.

O caule quando analisado sob luz polarizada revelou um grande acúmulo de cristais nos tecidos da região da lesão em comparação com os tecidos sadios (figuras 2 C e 3 B-C). Marques et al. (2007b) já haviam relatado tal acúmulo em ramos inoculados pelo CiLV-C. Também Ceita et al. (2007) verificaram o aumento de cristais de oxalato de cálcio intracelulares em tecidos de *Theobroma cacao* infectados por *Moniliophthora perniciosa* fungo causador da ‘vassoura-de-bruxa’. Os autores sugerem que a degradação de oxalato de cálcio pode estar correlacionada com a apoptose celular, pois na reação de degradação do oxalato há produção de peróxido de hidrogênio, molécula que possui um efeito benéfico para o vegetal por neutralizar a estratégia de alguns patógenos.

Outra característica observada em material de campo e em ramos inoculados (MARQUES et al., 2007b) foi a alteração na posição das fibras do xilema na região onde estão presentes dos ductos.

Em todos os tipos de lesões foram realizados testes para a presença de amido, sendo obtido resultado negativo na presença deste polissacarídeo nos tecidos lesionados (figura 2 I), diferentemente do observado nos tecidos não lesionados (figura 2 H). De acordo com Fahn

(1988) a matéria-prima para a síntese de goma (polissacarídeos) pelos ductos traumáticos provém do amido. Porém, não se descarta a hipótese de que o amido degradado poderia prover energia e esqueleto carbônico para a intensa hiperplasia que ocorre nos tecidos caulinares lesionados.

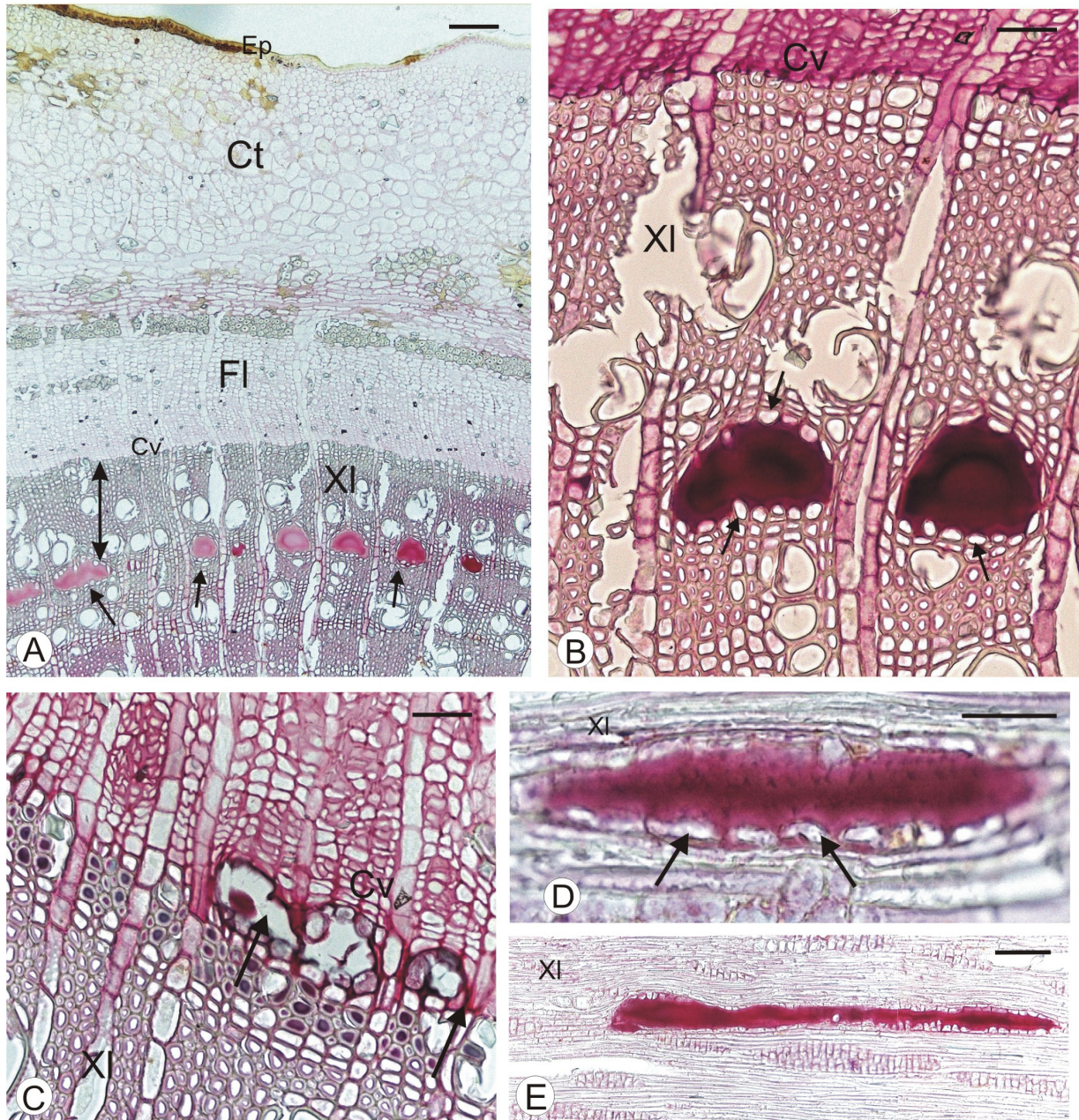


Figura 4 - Cortes transversais (A-C) e longitudinais (D-G) dos ductos traumáticos gomosos em lesões causadas pela leprose do tipo CiLV – C em ramos de *Citrus sinensis* L. Osbeck ‘Pêra’. A. Ductos situados no xilema (setas), notar a distância do câmbio vascular (chave) (Barra - 50 μ m). B. Detalhe dos ductos apresentados em A (Barra - 30 μ m). C. Ductos situados próximos ao câmbio vascular (Barra - 30 μ m). D. Epitélio (setas) do ducto em formação com conteúdo péctico (Barra - 10 μ m). E. Ducto situado no interior do xilema (Barra - 50 μ m). Ct – Córtex; Cv – Câmbio vascular; Ep – Epiderme; Fl – floema; XI – Xilema

5.4 Considerações finais

- A evolução das lesões nos ramos assemelha-se à das lesões foliares quanto à presença da lesão intermediária, ou seja, a presença de uma pontoação necrótica central e um halo necrótico circundante e a presença de halos necróticos sucessivos. No entanto, nos estágios seguintes as lesões nos ramos diferem daquelas descritas para as folhas, por apresentar a superfície necrosada e ligeiramente deprimida e, posteriormente, formarem lesões corticosas.
- As análises das lesões dos ramos provenientes de campo permitiram confirmar que as alterações anatômicas são semelhantes àquelas observadas nas lesões provenientes de plantas inoculadas, comprovando que tais alterações são de fato induzidas pelo vírus da leprose e não uma interação deste com outras viroses como foi questionado inicialmente.

Referências

- APPEZZATO-DA-GLORIA, B.; MARQUES, J.P.R.; ASTUA, J.F.; KITAJIMA, E.W. Análise morfológica da evolução das lesões lepróticas foliares de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Pêra'. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 57., 2006, Gramado. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Botânica, 2006. 1 CD-ROM
- BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E.W.; MACHADO, M.A. The *Citrus* leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 211-220, 2006.
- BITANCOURT, A.A. Estudos sobre a leprose dos *Citrus*. I. Distribuição geográfica e sintomatologia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 22, p. 161-184, 1955.
- CEITA, G.O.; MACEDO, J.N.A.; SANTOS, T.B.; ALEMANNI, L.; DA SILVA GESTEIRA, A.; MICHELI, F.; MARIANO, A.C.; GRAMACHO, K.P.; DA COSTA SILVA, D.; MEINHARDT, L.W.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C.M.; Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*, **Plant Science**, Shannon, v. 173, n. 2, p. 106-117, 2007.
- CHAMBERLAIN, C.J. **Methods in plant histology**. Chicago: The University of Chicago Press, 1932. 416 p.
- CORTELAZZO, A.L. **Caracterização celular e bioquímica de sementes**. Campinas: UNICAMP, 2007. 13 p.

- FANH, A. Secretory tissues in vascular plants. Tansley review N° 14, **New Phytologist**, Lancaster, v. 108, p. 229-257, 1988.
- FISHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, Berlim, v.16, p. 92-96, 1968.
- GEDALOVICH, E.; FAHN, A. The development and ultrastructure of gum ducts in Citrus plants formed as a result of brown-rot gummosis. **Protoplasma**, New York, v. 127, p. 73-81, 1985.
- JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: W. H. Freeman, 1962. 408 p.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, p.137-138, 1965.
- KNORR, L.C.; PRICE, W.C. Leprosis. In: PRATT, R. **Citrus insects, diseases and nutritional disorders**. Gainesville: Agricultural Experiment Station, 1958. 191p.
- MARQUES, J.P.R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS-ASTUA, J.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose-dos-citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1531-1536, nov. 2007.
- MELO-DE-PINNA, G.F.A.; KRAUS, J.E.; MENEZES, N.L. de. Morphology and anatomy of leaf mine in *Richterago riparia* Roque (Asteraceae) in the campos rupestres of Serra do Cipó, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 62, n. 1, p. 179-185, 2002.
- MORAES, W.S.; CASTRO, H.A.; LIMA J.D.; LEITE, E.A.G.; SOUZA, M. Susceptibilidade de três espécies cítricas à *Dothiorella gregaria* Sacc. Em função do estado nutricional, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 7-12, 2007.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry, theoretical and applied**. 3rd ed. London: Churchill, 1968. v. 1, 998p.
- PRIMIANO, E.L.V.; GARCIA, J.F.; MACEDO, L.P.M. Leprose dos Citros uma doença que preocupa os citricultores. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v.08, n. 41, ago. 2004.
- ROBERTS, A.G.; SANTA CRUZ, S.; ROBERTS, I.M.; PRIOR, D.A.M.; TURGEON, R.; OPARKA, K.J. Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. **Plant Cell**, Watesbury, v. 9, p. 1381-1396, 1997.
- RODRIGUES, J.V.C.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C.; CHAGAS, C.M.; MACHADO, M.A. *Citrus* leprosis. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, p. 161-179, 2003.
- ROSSETTI, V. **Manual ilustrado de doenças dos citros: doenças de causas desconhecidas**. Piracicaba: FEALQ; FUNDECITRUS, 2001. 270 p.

SAKAI, W. S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, n. 5, p. 247-249, 1973.

SANIEWSKI, M.; UEDA, J.; MIYAMOTO, K.; HOSBOWING, M.; PUCHALSKI, J. Homonal Control of Gummosis in Rosaceae. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, Skierniewice, v.14, suppl. 1, p. 137-144, 2006.

6 CONSIDERAÇÃO FINAL

Com este trabalho foi possível verificar que existem diferenças anatômicas que podem auxiliar na diferenciação dos dois tipos de leprose, por exemplo, a presença de ductos traumáticos gomosos nos feixes vasculares de folhas e frutos apenas nas lesões causadas pelo CiLV-N.

Há um padrão anatômico e histoquímico nas lesões causadas pela leprose em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck independente do tipo de vírus, pois em todas as lesões foi verificada hipertrofia e hiperplasia celular, plasmólise, a redução de grãos de amido, o acúmulo de compostos lipídicos nas células da área necrosada e a presença de um halo de células que acumulam proteínas ao redor dessa área.

A presença dos halos cloróticos com células plasmolisadas, que delimitam as lesões foliares, e as alterações verificadas nas células condutoras do floema das folhas e dos caules lesionados podem explicar o porquê o vírus não é sistêmico.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.) **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. 438 p.

SILVA, J.G. **Eletroforese de proteínas**: guia teórico prático. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2001. 125 p.

ANEXOS

Soluções Estoque para a e Eletroforese Protéica

Soluções para a extração protéica

Composição da solução tampão PBS a pH - 7,2:

Cloreto de sódio	8 g
Cloreto de potássio	0,2g
Fosfato de sódio dibásico	1,44 g
Fosfato de potássio monobásico	0,24 g
Água Destilada	1 litro

Tween – 0,5%

PVP – Polivinilpirrolidona 2%

Reagente de Bradford:

Para 1 litro. A ordem a ser feita é descrita abaixo:

Comassie Blue G-250.....	100 mg
Etanol 95%.....	50 ml
Agitação.....	2 horas
Ácido Fosfórico 85%.....	100 ml
H ₂ O deionizada.....	1L.

Armazenar em frasco âmbar e refrigerado

Soluções para o Gel de Policrilamida

Para montagem de cada gel utilizou-se de 60 ml de gel de policrilamida em suas diferentes concentrações discriminadas abaixo

Gel de carregamento p/ 15 ml

Água destilada.....	10,8 ml
TRIS 1M pH 6,8	1,86 ml
Acrilamida 30%	2,01 ml
SDS.....	150 µl
APS.....	150 µl
TEMED.....	9 µl

Gel de separação para 45 ml

Água destilada.....	14,4 ml
TRIS 1,5M pH 8,8	11,25 ml
Acrilamida 30%	18,45 ml
SDS.....	450 µl
APS.....	50 µl
TEMED.....	15,75 µl

Solução carreadora

Essa solução é adicionada quantidade igual ao volume de cada amostra.

Para cada 100ml:

TRIS pH 6,8.....	3,8 g
Azul de Bromofenol.....	5 mg
Glicerol.....	50 ml
H ₂ O destilada.....	Completar para 100 ml

Tampão de Corrida (Laemmli)

Essa solução é a que vai estar em contato com o gel e com os eletrodos e permitirá a passagem de corrente elétrica.

Concentrado 10X, para cada 1 litro:

TRIS.....	30 g
Glicina.....	144 g
H ₂ O destilada.....	Completar para 1L

Fixador do Gel de Policrilamida

Para cada 1 litro.

Metanol.....	450 ml
Ácido Acético.....	100 ml
H ₂ O destilada.....	Completar para 1 L

Solução de Coloração do Gel

Coomasie brilliant blue G-250.....	50 mg
Ácido Acético 10%.....	200 ml

Descoloração do Gel de Policrilamida

Para cada 1 litro.

Metanol.....	150 ml
Ácido Acético.....	70 ml
H ₂ O destilada.....	Completar para 1 L

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)