

# Análise Morfológica da Evolução das Lesões Lepróticas Foliares de *Citrus sinensis* (L) Osbeck ‘Pêra’

Beatriz Appezzato-da-Glória<sup>1</sup>, João Paulo Rodrigues Marques<sup>2</sup>,  
Juliana de Freitas Astúia<sup>3</sup> e Elliot Watanabe Kitajima<sup>4</sup>

## Introdução

A leprose dos citros é considerada uma das mais importantes enfermidades que afetam os *Citrus* no Brasil devido aos prejuízos econômicos por ela causados, que podem atingir cifras na ordem de US\$ 100 milhões no controle do agente vetor [1]. Como demonstrado por Kitajima et al. [2] a leprose possui etiologia viral, sendo o agente denominado *Citrus leprosis virus* (CiLV) e, apresenta um ácaro tenuipalpeado como vetor [3]. A doença caracteriza-se pela presença de lesões não sistêmicas que podem ocorrer nas folhas, frutos e caules, podendo nos casos de infecção severa, levar a planta à morte [1]. O objetivo deste trabalho foi analisar morfológicamente a evolução das lesões em folhas visando compreender a resposta da planta à virose.

## Material e métodos

Foram analisadas as lesões de dez plantas da laranjeira doce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “Pêra”, inoculadas com ácaros virulíferos, fornecidas pelo Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” Cordeirópolis (SP). Para inoculação do CiLV (*Citrus leprosis virus*) nas plantas, população do ácaro *Brevipalpus phoenicis* originária de Cordeirópolis, SP e mantida na Clínica Entomológica do Centro APTA Citros Sylvio Moreira (população 1), foi multiplicada em plantas oriundas de sementes de laranja doce. Esta população avirulífera foi então transferida com pincéis de poucos pêlos para folhas destacadas de laranjeira sintomáticas, mantidas em placas de Petri com algodão umedecido, para que adquirisse o vírus da leprose por um período de 72 h (tempo de aquisição). Após esse período, 20 ácaros virulíferos foram transferidos para cada planta-teste a fim de transmitirem o vírus. As folhas que apresentavam sintomas foram fotografadas num estereomicroscópio a cada 15 dias à medida que as lesões evoluíram. Lesões similares àquelas fotografadas foram fixadas e processadas para os estudos anatômicos comparativos. As amostras foram fixadas em solução de Karnovsky [4], desidratadas em série etílica e infiltradas com a historresina hidroxietilmetacrilato Leica, seccionadas a 5 µm de espessura, coradas com azul de toluidina [5] e montadas em resina sintética “Entellan”. Os cortes histológicos foram analisados em

microscópio óptico com sistema de captura de imagens.

## Resultados

### A. Análise Morfológica da Evolução das Lesões

As primeiras lesões surgiram aos 30 dias após a inoculação (Fig. 1A). As lesões iniciam-se como depressões isoladas na superfície do limbo foliar, em especial, na face inferior. As áreas deprimidas necróticas caracterizam-se pela cor marrom clara e são circundadas por uma área clorótica a qual só é distinta das demais regiões do limbo quando as folhas lesionadas são examinadas contra a luz. A lesão inicial possui cerca de 1,5 mm de diâmetro. Com o aumento do halo clorótico, a lesão adquire diâmetro maior, cerca de 2,0-2,5 mm, notando-se a formação de pontuações necróticas na margem da lesão as quais caracterizam o início da lesão intermediária (Fig. 1B). As lesões intermediárias (Fig. 1C) caracterizam-se pela formação do halo necrótico resultante da junção das pontuações necróticas ao redor da lesão levando ao isolamento da região lesionada em relação ao tecido sadio (Fig. 1D). Após a formação do halo necrótico que circunda a área clorótica inicial, outra área clorótica aparece por fora do referido halo expandindo a lesão no limbo foliar (Fig. 1E). Contudo um novo halo necrótico pode se formar circundando essa nova área clorótica e assim sucessivamente durante a evolução da lesão (Fig. 1F). Portanto, as lesões foliares avançadas são caracterizadas por áreas cloróticas e necróticas sendo que a distribuição dessas áreas varia entre as lesões, ou seja, algumas possuem halos necróticos concêntricos (Fig. 1F) e outras não (Fig. 1G).

### B. Análise Anatômica da Evolução das Lesões

A seção transversal do limbo foliar não lesionado (Fig. 1H) revela que a epiderme é unisseriada. Há idioblastos contendo mucilagem e cristal entre as células ordinárias da epiderme. O mesofilo dorsiventral é constituído de duas a três camadas de células paliçádicas e de dez a onze camadas de células do parênquima lacunoso. Os feixes vasculares de menor calibre são colaterais e encontram-se imersos no parênquima lacunoso (Fig. 1H). A seção transversal do limbo na lesão inicial mostra que a depressão resulta da intensa obliteração das células da epiderme e do parênquima clorofiliano (Fig. 1I) muitas

1. Professor Associado do Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Av. Pádua Dias, 11, Piracicaba, SP, CEP 13418-900. E-mail: bagloria@esalq.usp.br

2. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Av. Pádua Dias, 11, Piracicaba, SP, CEP 13418-900.

3. Pesquisador do Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”, Caixa Postal 04, Cordeirópolis, SP, CEP 13490-970.

4. Professor Titular do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Av. Pádua Dias, 11, Piracicaba, SP, CEP 13418-900.

Apoio financeiro: FAPESP e CNPq.

das quais apresentam conteúdo de aspecto granular (Fig. 1J). Nas áreas cloróticas da lesão inicial, algumas células encontram-se plasmolisadas (figura 1K). A seção transversal do limbo na área deprimida da lesão intermediária assemelha-se àquela descrita na lesão inicial, enquanto nas áreas não deprimidas, há hipertrofia de células do parênquima lacunoso e da bainha do feixe (Fig. 1L). Na seção transversal do limbo no halo necrótico mais externo da lesão avançada (Fig. 1G) observa-se a obliteração das células da epiderme, hipertrofia e hiperplasia das células do parênquima lacunoso (Fig. 1M). Observa-se também a lise de células da bainha de feixes vasculares menores levando ao colapso dos mesmos (Fig 1N). Nas lesões, cuja necrose é mais pronunciada, há dissolução do parênquima lacunoso (Fig. 1O). Assim como na lesão intermediária, nas áreas não necrosadas, as células epidérmicas, do parênquima clorofiloso e da bainha do feixe exibem núcleo volumoso e citoplasma de aspecto granular.

### Discussão

As análises morfológicas indicam que existe uma reação de hipersensibilidade da planta para limitar o avanço do vírus nas folhas, pois ocorre necrose dos tecidos infectados. Os halos cloróticos e necróticos sucessivos presentes nas folhas refletem a reação das células ao avanço gradual do vírus cuja velocidade da expansão é lenta. As análises anatômicas indicam que as principais alterações ocorrem no parênquima lacunoso. Nesse tecido ocorre hipertrofia e hiperplasia das células. Esau [6] comenta que as plantas infectadas por viroses apresentam alguns sintomas patológicos básicos que são constituídos por morte celular (necrose) ou uma intensificação (hipertrofia, hiperplasia) ou uma inibição (hipoplasia) do desenvolvimento celular. No presente estudo, embora as células da bainha do feixe possam apresentar alterações como núcleo maior, aumento de tamanho e citoplasma de aspecto granular, nenhuma alteração visível nos tecidos condutores foi detectada indicando que a doença não é sistêmica. De fato,

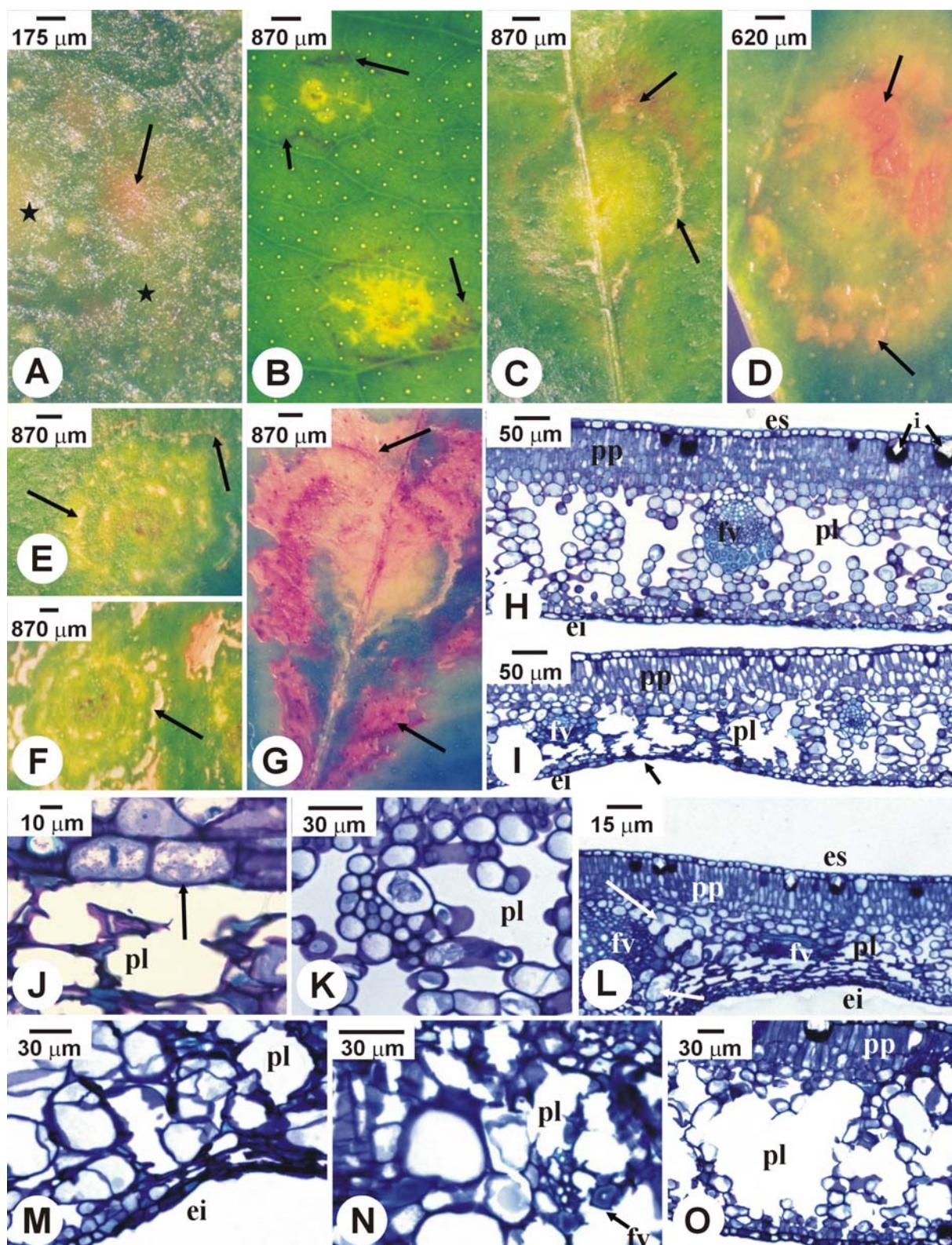
segundo Esau [7], as lesões não sistêmicas apresentam desenvolvimento que envolve reações de hipersensibilidade, sendo estas ocasionadas pela relação célula-vírus, neste caso estão associadas mudanças metabólicas nas células afetadas. Nas folhas inoculadas com vírus, a necrose inicia-se com o colapso das células epidérmicas, as células do parênquima paliçádico apresentam citoplasma granuloso denso, dissolução da parede, e plastídios agrupados os quais eventualmente perdem inteiramente a sua identidade [7]. No presente estudo, essa última característica foi observada especialmente nas lesões intermediárias e avançadas, sendo que as demais características foram observadas nas áreas de necrose em todas as fases das lesões. A necrose no parênquima lacunoso causa o colapso das nervuras menores confirmando as observações realizadas por Esau [7].

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão do auxílio financeiro e da bolsa de iniciação científica para o segundo autor.

### Referências

- [1] RODRIGUES, J. V. C.; KITAJIMA, E. W.; CHILDERS, C. C.; CHAGAS, C. M.; MACHADO, M. A. *Citrus* leprosis. *Expt. Appl. Acarology* 30: 161-179, 2003.
- [2] KITAJIMA, E. W.; MULLER, G. W.; COSTA, A. S.; YUKI, W. Shot, rod-like particles associated with *Citrus* leprosis. *Virology* 50: 254-258, 1972b.
- [3] MUSUMECI, M. R.; ROSSETTI, V. Transmissão dos sintomas da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. *Ciência e Cultura* 15(3): 228, 1963.
- [4] KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27: 137-138, 1965.
- [5] SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. *Stain Technology*, 48(5): 247-249, 1973.
- [6] ESAU, K. Some anatomical aspects of plant virus disease problems. *Botanical Review* 4: 548-579, 1938
- [7] ESAU, K. Anatomy of plant virus infections. *An. Rev. Phytopathology* 5: 45-76, 1967.



**Figura 1.** A-G. Evolução das lesões no limbo foliar da doença leprose em *Citrus sinensis* (L.) Osbeck “Pêra”. A. Lesão inicial (seta) e áreas cloróticas próximas (estrelas). B. Início da lesão intermediária com pontos necróticos (setas). C-E. Lesões intermediárias, as setas indicam os halos necróticos. F. Lesão E no estágio avançado com halos necróticos concêntricos (seta). G. Lesão C no estágio avançado com halos necróticos não concêntricos. H. Seção transversal do limbo sadio. I-K. Seções transversais da lesão inicial. Em I a seta indica a obliteração das células, em J as granulações no citoplasma das células e, em K, indica células plasmolisadas situadas na área clorótica adjacente. L. Seção transversal da lesão intermediária. As setas indicam células da bainha do feixe. M-O. Seções transversais das lesões avançadas com células hipertrofiadas, com o feixe vascular colapsado (seta em N) e lise celular (seta em O). Em O, notar a ausência de células do parênquima lacunoso. ei, face inferior da epiderme; es, face superior da epiderme; fv, feixe vascular; i, idioblasto; pl, parênquima lacunoso; pp, parênquima paliádico.