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

Podridão floral dos citros: histopatologia de *Colletotrichum acutatum*

João Paulo Rodrigues Marques

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

**Piracicaba
2012**

João Paulo Rodrigues Marques
Licenciado em Ciências

Podridão floral dos citros: histopatologia de *Colletotrichum acutatum*

Orientadora:
Profa. Dra. **BEATRIZ APPEZZATO DA GLÓRIA**

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

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Marques, João Paulo Rodrigues
Podridão floral dos citros: histopatologia de *Colletotrichum acutatum* / João Paulo Rodrigues Marques.- - Piracicaba, 2012.
101 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Anatomia vegetal 2. Botões florais 3. Ultra-estrutura 4. Fungos fitopatogênicos
5. Laranja 6. Doença de planta I. Título

CDD 634.31
M357p

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

*“À Sra. Leonildes Zuffato Tiveron (minha avó),
pelo exemplo de ser humano, caráter, humildade
e coragem”*

*“Aos Meus Pais, Sr. Luiz Rodrigues Marques
e à Sra. Maria Inês Tiveron Marques,
por me incentivarem a seguir meus sonhos
e me orientarem durante toda a minha vida”*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa pela concessão da bolsa de estudos de doutorado (Processo: 2009/00425-6) e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa (Projeto Temático, processo: 2008/54176-4).

À CAPES Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior pela concessão da bolsa de estudos na primeira etapa do doutorado.

À Profa. Dra. Beatriz Appezato da Glória, pela orientação, amizade, confiança, e dedicação com a minha formação científica desde o início. Agradeço também por acreditar na minha capacidade. Isto significou um grande apoio durante a sua orientação.

À Profa. Dra. Lilian Amorin por acreditar no meu trabalho, orientação e por direcionar meus esforços para o estudo de doenças fúngicas em citros.

Ao Prof. Dr. Marcel Bellato Spósito pela amizade, confiança e orientação no estudo de doenças fúngicas em citros.

À farmacêutica e técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal Marli Kassue Misake Soares, pela amizade, auxílio técnico, compreensão, companherismo e por me ajudar direta ou indiretamente inúmeras vezes.

À Dra. Maria das Graças Ongarelli, técnica do Laboratório de Anatomia Vegetal, pela amizade e pelo auxílio direto e indireto durante todo o desenvolvimento do meu projeto.

Ao biólogo Denis Marin, funcionário da FUNDECITROS, pelo apoio técnico nos experimentos de inoculação, pela amizade e dedicação.

Ao Dr. Geraldo José Silva Junior, pesquisador da FUNDECITROS, por ter autorizado o uso das instalações para os ensaios de inoculação e pelas trocas de informações.

À Profa. Dra. Neusa de Lima Nogueira e à Bióloga e Técnica do Laboratório de Histopatologia e Biologia Estrutural de Plantas do CENA, Monica Lanzzone Rossi, pela amizade, atenção e auxílio técnico durante o desenvolvimento dos experimentos de Microscopia Eletrônica.

Ao Prof. Dr. Francisco Ossamu Tanaka e ao Biólogo e Técnico do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agropecuária (NAP/MEPA) Renato Salaroli pelo auxílio técnico no preparo das amostras para microscopia eletrônica.

Ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, em especial, ao coordenador Prof. Dr. Lázaro E. Peres e a Sra. Maria Solizete Granziol Silva, secretária do Programa, pelo apoio durante toda a minha permanência junto ao Programa.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, chefe do Depto. de Ciências Biológicas, pela amizade, pelos ensinamentos e por acreditar na minha capacidade.

Ao Fundo de Defesa da Citricultura (FUNDECITRUS), pelo suporte técnico. Gostaria de mencionar os nomes da secretária Priscila Messi Barsaglini e da bióloga Flávia Helena Ambrozino, auxiliar do Laboratório de Diagnóstico de Doenças dos Citros, por me auxiliarem inúmeras vezes.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UNESP, campus de Botucatu, por ter facilitado as análises das amostras ao microscópio eletrônico de transmissão. Agradeço especialmente a Sra. Ligia Barbosa Costa e a Sra. Claudete dos Santos Tardivo pelo suporte técnico, amizade e auxílio durante a execução do meu projeto.

Ao professor de inglês Antonio Augusto Bianchi, pela amizade, compreensão e por me dar subsídios para o aprendizado da língua inglesa, o qual carregarei para sempre.

À Profa. Márcia Scudeler Cardozo, pela amizade e por me instruir no bom uso da língua portuguesa.

Ao amigo Guilherme Fernando Frare, pela amizade pelo auxílio constante durante a execução dos experimentos de inoculação e pela constante troca de informações. Ao Dr. Fabrício Packer Gonçalves por ceder mudas com flores.

À empresa Horticitrus, em especial, ao proprietário Eng. Agrônomo Vitor José Betin Cicolin e à secretária Marcela da Costa, pela atenção e por ceder as mudas de laranja sadias para a realização dos experimentos de inoculação em folhas.

Ao Dr. Márcio Mariguela, por ajudar na minha constante busca do autoconhecimento.

Aos funcionários e docentes do Depto. de Ciências Biológicas, que de modo direto ou indireto auxiliaram durante toda a execução do trabalho.

Aos funcionários, docentes e colegas do Depto. de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP.

À Dra. Adriana Hissae Hayashi e à Profa. Dra. Juliana Aparecido Fernando, pela amizade, pelo exemplo e, principalmente, por me apoiarem desde o início da minha formação acadêmica.

Aos colegas do Laboratório Anatomia Vegetal da ESALQ/USP, em especial, à Amanda Gilabel e à Bióloga Edilmara Michelly Souza da Silva, pelo auxílio técnico e amizade.

Aos amigos, Eduardo Rossiti (Jim), Guilherme Sacilloto (Sacilherme), Hermano Drummond Mariani (Manotes), Jail Alvari Filho (Pico), André Cazeto, Felipe Savassa, Ana Paula A. Amaral, Vanessa Voigt, aos amigos da Rep. Toca do Cardume: Daniel Ramiro (Tixa), Luiz Eduardo Cobra Lacorte (Pite), Patrícia da Matta e Vitor Drummond S. C. Mariani (Vitones) e aos colegas da UNESP de Botucatu (Rodrigo, Macaco, Benga, Tocera e Fuzzy).

Ao estimados amigos Willian Henrique Franzini (Switch) e Ronaldo (Ronex) (*in memoriam*) pela vivência e inúmeros momentos de descontração. Estejam em paz!

À Aricelis Biscáro Mela e família, pela amizade, amor, carinho, compreensão, dedicação, valor e por me auxiliarem inúmeras vezes, durante as diferentes etapas da minha formação pessoal e profissional.

Ao meu irmão Luiz Eduardo Rodrigues Marques, pelo apoio, incentivo e por servir de exemplo para a minha formação pessoal.

“Para que resulte o possível deve ser tentado o impossível”

Hermann Hesse

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
Referências.....	21
2 NOVO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE TECIDOS VEGETAIS INFECTADOS POR FUNGOS.....	25
Resumo.....	25
Abstract.....	25
2.1 Introdução.....	25
2.2 Desenvolvimento.....	26
2.3 Considerações Finais.....	31
Referências.....	31
3 ANATOMIA FLORAL RELACIONADA À DOENÇA PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS.....	33
Resumo.....	33
Abstract.....	33
3.1 Introdução.....	34
3.2 Desenvolvimento.....	35
3.3 Considerações Finais.....	48
Referências.....	49
4 PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS :HISTOPATOLOGIA DE <i>Colletorichum acutatum</i>	55
Resumo.....	55
Abstract.....	55
4.1 Introdução.....	56
4.2 Desenvolvimento.....	57
4.3 Considerações Finais.....	67
Referências.....	68

5 INFECCÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE CITRUS POR <i>Colletotrichum acutatum</i>	73
Resumo.....	73
Abstract.....	73
5.1 Introdução.....	73
5.2 Desenvolvimento.....	75
5.3 Considerações Finais.....	80
Referências.....	80
6 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS NA EPIDERME DE PÉTALAS DE LARANJEIRA DOCE INFECTADAS COM <i>Colletotrichum acutatum</i>	83
Resumo.....	83
Abstract.....	83
6.1 Introdução.....	84
6.2 Desenvolvimento.....	85
6.3 Considerações Finais.....	97
Referências.....	97
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101

RESUMO

Podridão floral dos citros: histopatologia de *Colletotrichum acutatum*

A podridão floral dos citros (PFC) é uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* responsável por causar grandes danos à produção de citros no Brasil. A doença surge apenas em botões florais com 8mm de comprimento ou maiores, levando a formação de lesões alaranjadas nas pétalas, lesões necróticas no estigma, promove a queda prematura dos frutos e a retenção do cálice e pedúnculo, sendo este último sintoma denominado ‘estrelinha’. Este trabalho tem por objetivo: observar o modo de penetração do fungo no hospedeiro *Citrus sinensis* ‘Valência’ e os estágios posteriores da colonização, verificar se há fatores estruturais e químicos pré-formados que expliquem o porquê do fungo não conseguir infectar botões florais com menos de 8mm, caracterizar anatomicamente o sintoma “estrelinha” e estigmas lesionados, investigar ultraestruturalmente pétalas inoculadas, analisar se há o estabelecimento de uma infecção quiescente nos tecidos foliares, analisar grãos de pólen após a inoculação *in vivo* e *in vitro* com o fungo. Botões florais sadios, pétalas e estigmas com e sem lesões, foram submetidos às técnicas convencionais de microscopia de luz e eletrônica. Folhas e grãos de pólen foram inoculados e analisados. Foi desenvolvida uma nova técnica de coloração para tecidos vegetais infectados por fungos. A resistência dos botões florais menores que 8mm pode estar associada às barreiras químicas e estruturais pré-formadas. O ápice, nesses botões, apresenta papilas entremeadas, cristais de oxalato de cálcio no mesófilo e câmara subestomática e cavidades de óleo localizadas muito próximas umas das outras. Botões com 8mm e 12mm possuem, no ápice, papilas com arranjo frouxo, ausência de cristais e maior distanciamento entre as cavidades de óleo. No ápice da pétala, verificou-se que as células papilosas são osmóforos. No sintoma “estrelinha”, nota-se sob a região de abscisão do ovário a instalação de um meristema de cicatrização. A lignificação das paredes das células da medula do receptáculo e do pedúnculo floral está associada à retenção destas estruturas na planta. Nas pétalas infectadas, o *C. acutatum* pode penetrar intra, intercelularmente e via estômato. O fungo pode crescer de modo subcuticular e intramural e coloniza todos os tecidos da pétala. A nova técnica de coloração se mostrou muito útil nas análises histopatológicas. O fungo associa-se aos tecidos vasculares. Acervulos ocorrem em ambas as faces das pétalas. A cutícula nos estágios mais avançados da lesão apresenta-se alterada, ou seja, ocorre a perda da ornamentação estriada e maior deposição de material lipofílico. A síntese de materiais lipofílicos envolve o retículo endoplasmático liso e rugoso e plastídios. Vesículas provenientes de dictiosomos e de corpos multivesiculares são observadas ao longo da parede celular e estão associadas ao depósito de material lipofílico na cutícula. No estigma lesionado há a formação de uma camada de proteção. O fungo apresenta quimiotropismo e cresce em direção aos grãos de pólen infectando-os 24 horas após a inoculação. Sugere-se que *C. acutatum* pode utilizar grãos de pólen para a sua dispersão. Após 48 horas da inoculação as folhas apresentam conídios germinados com apressórios.

Palavras-chave: Anatomia; Botões florais; *Citrus sinensis*; Cutícula; Estigma; Folhas, Grãos de pólen; Infecção fúngica, Ultraestrutura

ABSTRACT

Postbloom fruit drop: histopatology of *Colletotrichum acutatum*

The postbloom fruit drop (PFD) is a disease caused by *Colletotrichum acutatum* responsible for causing great damage to citrus crops in Brazil. The disease appears only in flower buds 8 mm in length or greater, leading to orange lesions in petals, necrotic lesions on the stigma, promoting the young fruit drop and the retention of the calyx and peduncle, which is called "buttons". In this context, this study aimed to: observe the fungus penetration mode into the host *Citrus sinensis* 'Valência' and the later stages of colonization; study the presence of preformed structural and chemical factors to explain why the fungus cannot infect floral buds with less than 8 mm in length; characterize anatomically the symptom "buttons" and injured stigmas; investigate the ultrastructural changes in tissues of inoculated petals; analyze whether there is the establishment of a quiescent infection in leaf tissues, analyze pollen grains after inoculation *in vivo* and *in vitro* with the fungus. Healthy buds, petals and stigmas with and without lesions, were processed and analyzed using conventional light and electron microscopy techniques. Leaves and pollen grains were also inoculated and analyzed with light microscopy. It was developed a new staining method for fungal-infected plant tissues. The resistance of flower buds smaller than 8mm may be associated with preformed structural and chemical barriers. These buttons display the apex with interspersed papillae, with crystals in mesophyll and substomatic chamber and oil cavities, which are located very close to each other on the abaxial surface. In 8mm and 12mm flower buds, the papilas in the apex become weakly interspaced, the crystals are not observed and there is the increase of the distance between the oil cavities. The papillose cells are osmophores. In the symptom "button", it is noted in the abscission of the ovary, an installation of wound meristem. There is also the lignification in the pith of receptacle and pedicel that can be associated with the retention of these structures in the plant. In infected petals, it was found that *C. acutatum* can penetrate intra and intercelullar or via stomata. The fungus may grow subcuticular and intramural and colonize all tissues of petal. The new staining technique developed has proved very useful for histopathological analysis. The fungus is closely associated with vascular tissues. The acervulli occur on both surfaces of petals. The cuticle in the later stages of the lesion is altered, i.e., there is loss of striated ornamentation and increased deposition of lipophilic material. The synthesis of lipophilic materials involves rough and smooth endoplasmic reticulum and plastids. Vesicles from dictyosomes and multivesicular bodies were observed throughout the cell wall and are associated with the deposit of lipophilic material in the cuticle. There is the formation of protective layer over the stigma damaged area. The fungus shows chemotropism and grows toward the pollen infecting it 24 hours after inoculation. It is suggested that *C. acutatum* can use pollen grains for dispersal. After 48 hours of inoculation, the leaves have germinated conidia with appressoria.

Keywords: Anatomy; *Citrus sinensis*; Cuticle; Floral buds; Fungal infection; Leaves; Pollen grains; Stigma; Ultrastructure

1 INTRODUÇÃO

A citricultura é uma das mais importantes culturas do país por gerar cerca de US\$ 14,6 bilhões em divisas por ano e mais de 200 mil empregos diretos e indiretos (NEVES et al., 2010). O estado de São Paulo é o maior produtor de citros do país, sendo estimada que a sua participação represente 95% ou mais na produção e exportação de produtos cítricos (NEVES et al., 2010). A produção comercial de citrus para a safra 2011/2012 está estimada em 375.743 milhões de caixas de 40,8 kg (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2011).

Nos últimos anos a cultura tem migrado das áreas tradicionais no centro do Estado para a região sudoeste paulista devido ao menor preço das terras cultiváveis e por ser uma região com baixo déficit hídrico, que dispensa o uso de irrigação. Além disso, nessa região do Estado, a incidência das principais doenças dos citros – ‘greening’ e clorose variegada – é bastante inferior à das demais regiões. Outro fator que vem causando reduções significativas no número de propriedades produtoras de citros nas áreas tradicionais de cultivo é a substituição pela cultura da cana-de-açúcar, em especial, pelos pequenos produtores de citros (CONAB, 2011). Devido ao plantio adensado, a eficiência da produção é maior na região sudoeste, comparada a outras regiões (NEVES et al., 2007). No entanto, é frequente a ocorrência da podridão floral dos citros (PFC), causada pela infecção de flores por *Colletotrichum acutatum*, que acarreta a abscisão de frutos jovens (FEICHTENBERGER et al., 2005). Sob incidência elevada, a queda de frutos pode atingir proporções alarmantes, como ocorreu no Rio Grande do Sul, na década de 70, com redução de 95% da safra (PORTO, 1993).

A doença causa lesões em botões com 8mm ou maiores (FAGAN, 1979). As pétalas após antese são mais susceptíveis (TIMMER et al., 1994). O fungo promove a formação de lesões de tonalidade alaranjada a marron nas pétalas (Figuras 1A-B) (TIMMER et al., 1994), lesões necróticas nos estigmas (Figura 1C) e estiletes (LIN et al., 2001), a queda prematura dos frutos e a retenção do cálice e do pedúnculo junto aos ramos que confere o sintoma denominado “estrelinha” (Figura 1D) (TIMMER et al., 1994).

A PFC é uma doença endêmica em muitas regiões produtoras de clima tropical úmido e subtropical das três Américas (FEICHTENBERGER et al., 2005). Dentre os fatores que podem agravar a severidade da doença estão: a distribuição e a quantidade de chuvas durante o período de florescimento (elevada umidade durante a florada) e a presença da doença em anos anteriores (SALVO FILHO, 1994; FEICHTENBERGER et al., 2005). Destaca-se que,

no pomar a PFC possui uma ocorrência generalizada devido à presença de um inóculo viável em plantas assintomáticas, plantas invasoras ou no próprio solo (AGOSTINI; TIMMER, 1992; ZULFIQAR et al., 1996). De acordo com Zulfiqar et al. (1996), o patógeno pode sobreviver nas folhas de citros na forma de conídios, apressórios ou na forma de infecção quiescente. Recentemente foi demonstrado que plantas daninhas, comumente encontradas em pomares comerciais, podem servir de hospedeiro alternativo do patógeno servindo de fonte de inóculo primária ou secundária (FRARE, 2012).

Figura 1 - Diferentes sintomas da doença podridão floral dos citros. A. Lesão inicial (seta) na pétala. B. Lesões necróticas nas pétalas. C. Lesão necrótica (seta) na superfície do estigma. D. Sintoma denominado 'estrelinha' caracterizado pela retenção do cálice e do pedúnculo na planta

Uma das primeiras hipóteses da causa da doença estava relacionada à ocorrência do desbalanço hormonal na planta, uma vez que o sintoma mais evidente é a presença de cálices e pedúnculos florais retidos após a queda dos frutos jovens. Essa sintomatologia levou à denominação da anomalia de “post-bloom fruit drop”. Por suspeitar tratar-se de anomalia fisiológica, pesquisadores passaram a avaliar a aplicação de produtos com ação hormonal, como a auxina sintética 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) no controle da doença (WEIR; PHELPS, 1968, citados por FAGAN, 1984). Embora esses produtos tenham resultado em maior retenção de frutos, em 1979, Fagan apresentou evidências de que a doença era causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. A etiologia da doença foi mantida até 1992 quando Agostini e Timmer realizaram um estudo detalhado sobre isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, no qual se verificou tratar de três estirpes com características morfológicas e patogênicas distintas: uma estirpe virulenta denominada SGO (“slow-growing orange”), que apresentava crescimento lento e características fisiológicas, patológicas e morfológicas distintas daquelas apresentadas pela estirpe denominada FGG (“fast-growing gray”) de crescimento rápido que era incapaz de causar podridão. A outra estirpe denominada KLA (“key lime anthracnose”), a qual apresentava características semelhantes à FGG e era

associada à antracnose em limão galego. De acordo com o autor, o *C. gloeosporioides* apenas infectava flores senescentes, sendo a forma FGG uma estirpe assintomática de folhas, ramos e frutos de citros produzindo infecções quiescentes que podem levar ao estabelecimento de doenças como a antracnose. Recentemente, houve uma re-classificação das estirpes SGO e KLA como linhagens distintas de *Colletotrichum acutatum*, distinguindo-as da estirpe FGG (PERES et al., 2008).

Fungos do gênero *Colletotrichum* spp. utilizam diferentes estratégias para obter acesso aos nutrientes da planta hospedeira (DIÉGUEZ-URIBEONDO et al., 2005). Tais indivíduos possuem um tipo transiente de biotrofismo também denominado hemibiotrófico. De acordo com Mendgen e Hahn (2002), os indicadores de que o fungo apresenta propriedade de ser biotrófico são: (1) elevado desenvolvimento de estruturas de infecção; (2) limitada atividade secretora (enzimas de lise); (3) a camada interfacial que separa as membranas plasmáticas da planta e do fungo ser rica em carboidratos e proteínas; (4) longo prazo de supressão das defesas do hospedeiro; (5) presença de haustório.

De acordo com Diéguez-Uribeondo et al. (2005), as etapas iniciais da infecção pelas espécies de *Colletotrichum* são bastante similares. Primeiramente, o conídio se adere à superfície do hospedeiro e germina, o tubo germinativo cresce e se desenvolve formando um micélio que forma um conídio secundário ou apressório. Este forma um ‘peg’ de penetração que invade diretamente a cutícula e a parede das células. De acordo com Bailey et al. (1992), há dois tipos de estratégias de colonização por espécies de *Colletotrichum*: intracelular hemibiotrófico e subcuticular-intramural necrotrófico. Os patógenos com estratégia intracelular hemibiotrófica invadem as células por um período curto mantendo-as, aparentemente, para a sua nutrição, e então convertem, para a fase necrotrófica matando a célula (PERFECT et al., 1999). Na estratégia subcuticular-intramural o fungo cresce sob a cutícula e na parede das células epidérmicas e subjacentes.

De acordo com Podila, Rogers e Kolattukudy (1993), os fungos fitopatogênicos utilizam de sinais químicos presentes na superfície da planta para sua germinação e diferenciação do apressório. Dentre as substâncias presentes na superfície da planta as ceras epicuticulares têm grande importância na formação de apressórios. Os autores ainda acrescentam que a constituição das ceras epicuticulares é específica para cada espécie e influenciam diretamente na formação dos apressórios. Outro fator que atua diretamente no estabelecimento da interação e sucesso no processo de infecção é a topografia das células epidérmicas (BAILEY et al., 1992).

Para que ocorra o sucesso na infecção dos tecidos há uma série de fatores físicos e químicos (topográficos) do hospedeiro que estão envolvidos na indução da formação de apressórios (ARAÚJO; MATSUOKA, 2004).

A cutícula das plantas é reconhecida como a primeira barreira física/estrutural a ser ultrapassada pelos fungos durante o processo de infecção (GEVENS; NICHOLSON, 2000; PASCHOLATI; LEITE, 1995). Essa camada é composta por ceras epicuticulares e cutina. De acordo com Gevens e Nicholson (2000), a cutícula deve ser interpretada com uma camada de material hidrofóbico que pode sofrer alterações estruturais ao longo do tempo.

Sabe-se que a indução da queda prematura dos frutos tem uma estreita relação com o desbalanço hormonal nos tecidos infectados, em especial, dos hormônios auxina, etileno e ácido jasmônico (LAHEY et al., 2004; LI et al., 2003). Dentre eles, a auxina possui um papel muito importante, uma vez que os aumentos dos níveis de AIA nas flores infectadas podem levar à síntese *de novo* desse hormônio pelo patógeno e hospedeiro (CHUNG et al., 2003). Lahey et al. (2004) acrescentam que os elevados níveis de AIA detectados (140 vezes maiores) podem contribuir com o aumento em espessura do cálice.

A utilização de inibidores do transporte de auxina como TIBA e 2,4-D promove uma maior retenção de frutos após a infecção pelo fungo quando comparados com as flores tratadas apenas com água (CHEN et al., 2006). Essa informação reforça a hipótese de que a auxina possui importante papel na queda prematura dos frutos. A aplicação de giberelinas sintéticas também favorece a maior retenção dos frutos infectados (CHEN et al., 2006).

Do ponto de vista epidemiológico é necessário que haja uma maior compreensão de como o fungo se comporta na planta cítrica, ou seja, como ocorre o processo de infecção e se há possibilidade do fungo crescer nos tecidos sem causar lesões.

De acordo com Verhoeff (1974), a presença de apressório faz com que o fungo permaneça viável na superfície do hospedeiro por algum tempo, sem que a infecção ocorra. A penetração no hospedeiro ocorre de várias formas. O autor acrescenta que a hifa de infecção pode penetrar na cutícula e na parede externa da célula epidérmica. Este pode ser o início de uma relação patogênica, porém como não há o estabelecimento da doença e a consequente infecção e colonização dos tecidos hospedeiros, este período pode ser denominado como período de latência (VERHOEFF, 1974).

A infecção quiescente, ou latência, é o período em que o fungo, após formar o apressório na superfície do hospedeiro, permanece aderido e dormente não promovendo a infecção dos tecidos. Após um período, em condições favoráveis torna-se ativo e causa a infecção (VERHOEFF, 1974; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). Fungos do

gênero *Colletotrichum* são comumente conhecidos por apresentar esse tipo de estratégia (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; MUIRHEAD; DEVERALL 1981).

Espécies de *Colletotrichum* são conhecidas por causar infecções latentes ou quiescentes, nas quais o fungo infecta o fruto imaturo no campo e passa por um período de dormência até o amadurecimento dele, após o qual promove a infecção levando ao aparecimento de sintomas da doença (BAILEY et al., 1992).

As características estruturais e ultraestruturais da interação das plantas com fungos do gênero *Colletotrichum* sp. tem sido apresentado em diversos patossistemas (DIÉGUEZ-URIBEONDO et al., 2005; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO et al., 2004; O'CONNELL et al., 1985). Porém, a interação *C.acutatum-Citrus* ainda não foi investigada.

Nos próximos cinco capítulos são apresentados aspectos anatômicos e ultraestruturais causados pela presença do *Colletotrichum acutatum* nos tecidos de pétalas, estigma e receptáculo. Os dados apresentados visam fornecer subsídios para a melhor compreensão do monociclo do fungo no hospedeiro, além de agregar informações que possam auxiliar no controle e manejo da doença.

Referências

- AGOSTINI, P.J.; TIMMER, L.W. Population dynamics and survival of *Colletotrichum gloeosporioides*, the cause of citrus postbloom fruit drop. **Phytopathology**, Lancaster, v. 82, n. 10, p. 1084, Oct. 1992.
- ARAÚJO, J.C.A.; MATSUOKA, K. Histopatologia da interação *Alternaria solani* e tomateiros resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 268-275, maio/jun. 2004.
- BAILEY, J.A.; O'CONNEL, R.J.; PRING, T.J.; NASH, C. Infection strategies in *Colletotrichum* species. In: JEGER, M.J.; BAILEY, J.A. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: CAB, 1992. chap. 5, p. 88-120.
- CHEN, H.; DEKKERS, L.; CAO, L.; BURNS, J.K.; TIMMER, L.W.; CHUNG, K. Evaluation of growth regulator inhibitors for controlling postbloom fruit drop (PFD) of *Citrus* induced by the fungus *Colletotrichum acutatum*. **HortScience**, St. Joseph, v. 41, n. 5, p. 1317-1321, 2006.
- CHUNG, K.R.; SHILTS, T; ERTURK, U.;TIMMER, L.W.; UENG, P.P. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 226, p. 23-30, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira:** safra de laranja. Segundo levantamento, agosto de 2011. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_05_16_03_20_relatorio_laranja_safra_2011_mai_2011..pdf> Acesso em: 05 dez. 2011.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J, FÖRSTER, H; SOTO-ESTRADA, A.; ADASKAVEG, J. E. Subcuticular-Intracellular Hemibiotrophic and Intercellular Necrotrophic Development of *Colletotrichum acutatum* on Almond. **Phytopatology**, St. Paul, v. 95, n. 7, p. 751-758, Sept. 2005.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annual Applied Biology**, Cambridge, v. 91, n. 1, p. 13-20, 1979.

_____. Postbloom fruit drop of citrus in Belize: II. Disease control by aerial ground spraying. **Turrialba**, San José, v. 34, n. 2, p. 179-186, 1984.

FEICHTENBERGER, E; BASSANEZI, R.B.; SPOSITO, M.B.; BELASQUE Jr., J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). **Manual de fitopatologia:** doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 239-269.

FRARE, G.F. **Sobrevivência *Colletotrichum acutatum* agente causal da podridão floral dos citros em planta daninhas.** 2012. 71p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

GEVENS, A.; NICHOLSON, R.L. Cutin composition: a subtle role for fungal cutinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, p. 43-45, 2000.

LAHEY, K.A.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; UENG, P.P; TIMMER, L.W.; CHUNG, K.R. Induction of phytohormones and differential gene expression in citrus flowers infected by the fungus *Colletotrichum acutatum*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 17, n. 12, p. 1394–1401, Dec. 2004.

LI, W.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; UENG, P.P.; TIMMER, L.W.; CHUNG, K.R. Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with fungus *Colletotrichum acutatum*, the causal agent of postbloom fruit drop. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 128, n. 4, p. 578-583, 2003.

LIN, Y.J.; STOVER, E.; SONODA, R.; ROSSKOPF, E. Stigma and style necrosis is associated with postbloom fruit drop disease in citrus following artificial inoculation. **Hortscience**, St. Joseph, v. 36, n. 6, p. 1138, 2001.

MACEDO, N.A. **Manual de técnica em histologia vegetal.** Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 1997. 96 p.

MENDGEN K.; HAHN M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 8, p. 352-356, June 2002.

MUIRHEAD, I.F.; DEVERALL, B.J. Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 19, n. 1, p. 77–84, July 1981.

NEVES, M.F.; LOPES, F.F.; TROMBIN, V.G.; AMARO, A.A.; NEVES, E.M.; JANK, M.S.. **Caminhos para a citricultura**: uma agenda para manter a liderança mundial. São Paulo: Editora Atlas, 2007. 225 p.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G.; MILAN, P.; LOPES, F.F.; PEREIRA, F.C.; KALAKI, R.B. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Editora Atlas, 2010. v. 1, 137 p.

O'CONNELL, R.J.; BAILEY, J.A.; RICHMOND, D.V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 27, n. 1, p. 75-98, July 1985.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**: princípios e conceitos. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22. p. 417-453.

PERES, N.A.R.; MACKENZIE, S.J.; PEEVER, T.L.; TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 98, n. 3, p. 345-352, Mar. 2008.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREN, J.R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, n. 2/3, p. 186-198, July/Aug. 1999.

PODILA, G.K.; ROGERS, L.M.; KOLATTUKUDY, P.E. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 267-272, 1993.

PORTO, O.M. Queda anormal de frutos jovens de citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 14, n. 1, p. 341-356, 1993

SALVO FILHO, A. Podridão floral. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 15, n. 1, p. 135-142, 1994.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 4 p. 329-334, Apr. 1994.

VERHOEFF, K. Latent infections in fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 99-110, Apr. 1974.

WHARTON, P.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Annales del Jardín Botánico de Madrid**, Madrid, v. 61, n.1, p. 3-22, 2004.

ZULFIQAR, M; BRLANSKY, R.H; TIMMER, L. W. Infection of flower and vegetative tissues by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, Lancaster, v. 88, n. 1, p. 121-128, Jan./Feb. 1996.

2 NOVO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE TECIDOS VEGETAIS INFECTADOS POR FUNGOS

Resumo

A utilização de técnicas histológicas conjugadas ao uso de corantes favorece a visualização da presença de fungos nos tecidos, revelando os pormenores da interação planta-patógeno nos mais diferentes patossistemas. A proposta deste estudo é apresentar um novo método de dupla coloração utilizando azul de algodão e safranina para identificar estruturas fúngicas nos tecidos vegetais. Com esta coloração as hifas do fungo coram-se de azul, enquanto as paredes das células vegetais coram-se de laranja. Este novo método foi testado em dois patossistemas e mostrou-se muito útil, pois permite a distinção entre as paredes dos fungos e das células vegetais. Trata-se de uma técnica que pode ser usada rotineiramente em laboratórios e permite que sejam feitas lâminas permanentes.

Palavras-chave: Azul-de-algodão; Coloração; Pinta preta; Podridão floral dos citros; Safranina

Abstract

The use of histological techniques, combined with the use of dyes, facilitates the visualisation of fungi present in tissues, allowing the details of plant-pathogen interactions in many different pathosystems to be revealed. The purpose of this study is to present a new double-staining method that uses cotton blue and safranin to identify fungal structures in plant tissues. With this staining method, fungal hyphae stain blue and plant cell walls stain orange. This new method was tested on two pathosystems. The technique distinguishes between fungal and plant cell walls, giving it great practical utility. This is a staining technique that can be used routinely in laboratories and allows for the creation of permanent slides.

Keywords: Citrus black spot; Cotton blue; Postbloom fruit drop; Safranin; Staining

2.1 Introdução

Doenças fúngicas são responsáveis por causar distúrbios estruturais e fisiológicos em um grande número de culturas, levando a diminuição da produtividade e prejuízos econômicos aos produtores. Estudos estruturais sobre o modo de penetração e colonização dos tecidos vegetais por fungos indicam, em detalhe, o envolvimento do patógeno com o tecido vegetal, revelando os pontos importantes do monociclo das doenças. O desenvolvimento de técnicas que viabilizem o entendimento do processo de infecção, visa uma melhor compreensão da interação entre os organismos e o consequente estabelecimento da doença.

Técnicas em anatomia vegetal que visam destacar estruturas fúngicas de tecidos vegetais são importantes para a observação e caracterização do comportamento do patógeno no hospedeiro. Elas são utilizadas com uma ampla gama de corantes como azul de toluidina O

(GHEMAWAT, 1977), azul de algodão em lactofenol (HEATH, 1974), algodão azul em lactofenol e azul de anilina (SHIPTON; BROWN, 1962), azul de tripan e rosa de bengala (SAHA; JACKSON; JOHNSON-CICALESE, 1988), fucsina ácida (MCBRIDE, 1936), safranina (BANDONI, 1979) e calcofluor (TRES; LOSCHKE, 1990). Também têm sido utilizadas duplas colorações com safranina e verde rápido (FLEMMER et al., 2006) e safranina com azul de astra (SREBOTNIK; MESSNER, 1994). Mas o uso desses corantes, por si só, revelam apenas a coloração das estruturas fúngicas e, ou paredes celulares das plantas, não havendo a clara distinção entre paredes das células vegetais das do fungo.

A preservação dos tecidos vegetais infectados por fungos para análise histopatológica é geralmente muito difícil devido às alterações resultantes da suscetibilidade do hospedeiro. O uso de um meio de infiltração como parafina ou resina glicol-metacrilato é importante para a manutenção da integridade dos tecidos (FLEMMER et al., 2006, FEDER; O'BRIEN, 1968; NAIR; CORBIN, 1981). Muitos estudos visam elucidar o desenvolvimento do fungo na superfície da planta, as amostras, para este fim, são clarificadas e então submetidas à coloração (BRUZZESE; HASAN, 1983; LIBERATO; BARRETO; SHIVAS, 2005; KOSKE; GEMMA, 1989).

A proposta deste estudo é apresentar um novo método de dupla coloração utilizando azul de algodão e safranina para identificar estruturas fúngicas nos tecidos vegetais em seções de material incluído em historresina.

2.2 Desenvolvimento

Material e métodos

Material vegetal

Para a análise de tecidos de pétalas infectadas pelo *Colletotrichum acutatum*, mudas laranja doce 'Valência' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] foram cultivadas em vasos e mantidas em estufas no FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura), Araraquara – SP. Elas foram induzidas a floração por meio de podas e estresse hídrico.

Frutos de laranja doce 'Valência' [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], com sintomas da doença Pinta preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), foram coletados de pomares comerciais infectados do estado de São Paulo. Foram selecionados frutos com sintoma de mancha dura, como descrito por Marques et al. (2012).

Inoculação

A inoculação foi feita com isolado de *Colletotrichum acutatum*, caracterizado molecularmente (isolado 142a). Sobre uma colônia de *Colletotrichum acutatum*, cultivada em BDA por sete dias depositaram-se 2 ml de água destilada e os esporos foram suspensos com o auxílio de uma alça de Drigalsky. A suspensão foi ajustada para a concentração final de $4,3 \times 10^5$ esporos/ml de suspensão. A inoculação de pétalas foi feita com uma micropipeta para deposição das gotas com 5 µl da suspensão do fungo em setores previamente marcados com uma caneta com tinta à prova de água. Foram inoculadas 14 pétalas e estigmas com o patógeno. Como controle as amostras foram inoculadas apenas com água destilada estéril. Foram feitas câmaras úmidas com período de 24 horas de molhamento.

Microscopia de Luz

As pétalas com sintomas de PFC e os frutos com sintomas da doença Pinta preta foram coletados, seccionados e fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada (paraformaldeído 4%; glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2; tampão fosfato 0,2 M pH 7,2) por 24 horas. Durante esta etapa as amostras foram submetidas a uma bomba de vácuo para remoção do ar dos tecidos.

As amostras foram desidratadas, utilizando dez lavagens de dez minutos em cada etapa da série etílica. Após a desidratação, os tecidos foram infiltrados em 1:1, 2:1 e 0:1 (vol/vol), solução de etanol/infiltração (50 ml de resina básica e 0,5 g de ativador - Leica Historesin® Heraeus Kulzer, Hanau, Germany) por, no mínimo, duas horas e, então, submetidas a 100% na solução de infiltração por 24 h. Amostras foram transferidas para moldes de plásticos onde foram infiltradas (mistura de 1 mL de endurecedor e 15 mL de solução de infiltração). A polimerização foi feita por 10 minutos à temperatura ambiente e 10 minutos na estufa de 60 °C.

Os blocos foram seccionados com 5µm de espessura em micrótomo rotativo (modelo RM2245, Leica). As secções foram montadas em lâminas de vidro e coradas com azul de toluidina O 0,05% (C.I. # 52040) em tampão citrato-fosfato pH 4-6 (SAKAI, 1973) e com a dupla coloração com azul de algodão 5% (C.I. #42755) em lactofenol (MACEDO, 1997) e safranina O aquosa 1% (C.I. #50240), como descrito no item abaixo. As lâminas histológicas

foram montadas em resina sintética Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany), e as imagens capturadas com câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DMLD.

Procedimento de coloração

- 1- Azul de algodão 5% em lactofenol por 20 minutos (MACEDO, 1997);
- 2- Três lavagens de um minuto em água destilada;
- 3- Safranina aquosa 1% por 10 segundos;
- 4- Três lavagens de um minuto em água destilada;
- 5- A lâmina, após a secagem, pode ser montada em resina sintética Entellan®.

Resultados

Pétalas de *Citrus sinensis* infectadas por *Colletotrichum acutatum* (Figuras 1A-F) e frutos de *C. sinensis* infectados pelo fungo *Guignardia citricarpa* (Figuras 1G-J) foram analisados anatomicamente comparando-se a dupla coloração desenvolvida com o corante azul de toluidina O.

As amostras com lesões infiltradas em resina glicol metacrilato apresentaram as paredes vegetais e as do fungo íntegras. Essa característica facilitou a observação das estruturas de infecção do fungo nos tecidos lesionados.

A coloração com azul de toluidina O não permitiu a distinção entre as estruturas fúngicas e as células vegetais (Figuras 1A,B,E,G,H). No entanto, ao empregar o azul de algodão as paredes do fungo ficaram coradas de azul, enquanto a safranina corou todas as paredes celulares da planta (Figuras 1C,D,F,I,J). Portanto, na dupla coloração foi possível verificar que nas pétalas infectadas pelo *Colletotrichum acutatum* os apressórios localizam-se entre as células epidérmicas e mostram o modo de penetração intercelular (Figuras 1A e C), ou na forma intracelular (Figuras 1B e D). Também a conexão entre os acérvulos e os tecidos vasculares por meio de hifas pode ser melhor visualizada com a dupla coloração (Figuras 1E e F).

Ao analisar as secções do fruto de laranja doce com sintoma da doença Pinta preta, coradas com azul de toluidina O, foi verificada a instalação de picnídios (Figura 1G). Porém, a distinção das paredes celulares do epicarpo das paredes do fungo só ocorre com o uso da nova coloração (Figura 1H). Com a utilização do azul de toluidina O as hifas de *Guignardia citricarpa* podem ser observadas com dificuldade no mesocarpo (Figura 1I). Com o novo

método é nítida a distinção entre as hifas do fungo das paredes das células vegetais (Figura 1J).

Discussão

O uso de historresina, como meio de infiltração, para o estudo de tecidos infectados por fungos é de grande importância, porque eles normalmente apresentam sintoma de necrose. Neste caso, pode haver o comprometimento da integridade das paredes quando os tecidos vegetais são submetidos a cortes frescos. Estudos histológicos de plantas infectadas por fungos têm sido frequentemente publicados sob muitos aspectos, mas é comum a utilização de outros métodos (SAHA; JACKSON; JOHNSON-CICALESE, 1988; FLEMMER et al., 2010; NAIR; CORBIN, 1981; HOOD; SHEW, 1966). Verificou-se com este estudo, que as amostras destinadas para este tipo de investigação, podem ser infiltradas em historresina.

As análises anatômicas de rotina dos tecidos sadios e infectadas podem ser feitas com o corante azul de toluidina O, pois, devido a sua policromasia, ele permite a distinção da composição química dos diferentes tecidos vegetais de acordo com a tonalidade da coloração (FEDER; O'BRIEN, 1968; O'BRIEN; FEDER; MC- CULLY, 1964). No entanto, as hifas são dificilmente distintas das paredes de células vegetais nos tecidos infectados corados com o azul de toluidina O.

O azul de algodão é frequentemente usado para corar hifas de fungos (MACEDO, 1997; CHESTERS, 1934). A utilização deste corante é usual em estudos de diagnóstico de doenças fúngicas em animais (LECKER, 1999) e de micorrizas (SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 2006). A reação positiva do azul de algodão com as paredes fúngicas ocorre devido à quitina presente em paredes fúngicas (LECKER, 1999). Por outro lado, a safranina possui metacromasia de tonalidade laranja e interage com todas as células de tecidos vegetais (LILLIE, 1990).

Este método mostrou-se válido para estudos histopatológicos envolvendo fungos fitopatogênicos. O método foi eficiente tanto nas pétalas infectadas pelo *Colletotrichum acutatum*, quanto nos frutos infectados pelo *Guignardia citricarpa*. Recomenda-se a utilização deste método de processamento e coloração das amostras para outros patossistemas. Além disso, a possibilidade da produção de lâminas permanentes favorece futuras análises das amostras lesionadas.

Figura 1 - Análise histopatológica dos tecidos infectados. Comparação entre a coloração com azul de toluidina O (coluna da esquerda) e a dupla coloração com azul de algodão e safranina O (coluna da direita). A-F. Fotomicrografias de pétalas de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] 'Valência' infectadas por *Colletotrichum acutatum*. G-J. Frutos de laranjeira doce 'Valência' infectados por *Guignardia citricarpa*. Com a nova dupla coloração (coluna da direita) há clara distinção entre as paredes do fungo (azul) das células vegetais (laranja). A e C- Penetração intercelular (setas); B e D - Penetração intracelular (setas); E-F. Visão geral da região onde há hifas situadas no mesofilo (setas) entre os acervulos e os feixes vasculares. G e I. Lesão com picnidio. H e J. Detalhe do mesocarpo contendo hifas do fungo (setas). AC - Acervulo; AP - Apressório; E - Epiderme; EPI - Epicarpo; FL - Floema; ME - Mesocarpo; PA - Parênquima; PC - Picnidio; XL - Xilema

2.3 Considerações Finais

Este novo método de dupla coloração fornece detalhes das estruturas fúngicas e vegetais que favorecem a análise e compreensão da interação planta-fungo. Portanto, trata-se de um método eficiente para estudos histopatológicos.

Referências

- BANDONI, R.J. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. **Mycologia**, Lancaster, v. 11, n. 8, p. 873-874, 1979
- BRUZZESE, E.; HASAN, S. A whole leaf clearing and staining technique for host specificity studies of rust fungi. **Plant Pathology**, London, v. 32, n. 3, p. 335-338, Sept. 1983.
- CHESTERS, C.G.C. Three methods of using cotton blue as a mycological stain. **Annals of Botany**, Oxford, v. 48, n.3, p.820-822, 1934.
- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, New York, v. 55, n.1, p. 123-142, 1968.
- FLEMMER, A.C.; ANDERSON, F.E.; HANSEN, P.V.; MCLAREN, D.A. Microscopic observations of a compatible host/pathogen interaction between a potential biocontrol agent (*Uromyces penceanus*) and its target weed (*Nassella neesiana*). **Mycoscience**, Tokyo, v. 51, n. 5, p. 396–400, 2010.
- GHEMAWAT, M.S. Polychromatic staining with toluidine blue O for studying the host-parasite relationships in wheat leaves of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, n. 3 p. 151-252, Nov. 1977.
- HEATH, M.C. Light and electron microscope studies of the interactions of host and non-host plants with cowpea rust - *Uromyces phaseoli* var. *vignae*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 4, n. 4, p. 403-408, Oct. 1974.
- HOOD, M.E.; SHEW, H.D. Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. **Phytopathology**, Lancaster, v. 86, n. 7, p. 704-708, July 1996
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biol**, New York, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KOSKE, R.E.; GEMMA, J.N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 486-489, June 1989.
- LECKER A. Preparation of lactophenol cotton blue slide mounts. **Journal of Community Eye Health**, London, v. 12, n. 30, p. 24, 1999.

LIBERATO, J.R.; BARRETO, R.W.; SHIVAS, R.G. Leaf-clearing and staining techniques for the observation of conidiophores in the Phyllactinoideae (Erysiphaceae). **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 34, p. 401-404, 2005,

LILLIE, R.D. **H. J. Conn's biological stains**. 9th ed. St. Louis: Sigma Chemical Company, 1990. 692p.

MACEDO, N.A. **Manual de técnica em histologia vegetal**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 1997. 96 p.

MARQUES, J.P.R.; SPÓSITO, M.B.; MELLO, A.F.S.; AMORIM, L.; MONDIN, M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B, Histopathology of black spot symptoms in sweet oranges. **European Journal of Plant Pathology**. Dordrecht, v. 133, n. 2, p. 439-448 June 2012.

MCBRIDE, M.C. A method of demonstrating rust hyphae and haustoria in unsectioned leaf tissue. **American Journal of Botany**, New York, v. 23, p. 686-688, 1936.

NAIR, J.; CORBIN, J.P. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. *pineae*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 71, n. 8, p. 777-783, Aug. 1981,

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MC- CULLY, M.E: Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue-O. **Protoplasma**, Leipzig, v. 59, p. 367-373, July 1964.

SAHA, D.C.; JACKSON, M.A.; JOHNSON-CICALESE, J.M. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. **Phytopatology**, Baltimore, v. 78, n. 2, p. 237-239, Feb. 1988.

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.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H.; MILANEZ, A.I.; TRUFEM, S.F.B.; PIRES-ZOTTARELLI, C.L.A.; GRAND, R.P.; SANTOS, M.L.; GIUSTRA, K.C. Microscopic fungi in the Atlantic Rainforest in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 267-275, July/Sept. 2006

SHIPTON, W.A.; BROWN, J.F. A whole-leaf clearing and staining technique to demonstrate host-pathogen relationships of wheat stem rust. **Phytopathology**, Lancaster, v. 52, p. 1313-1318, 1962.

SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. A simple method that uses differential staining and light microscopy to assess the selectivity of wood delignification by white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 60, n. 4, p. 1383-1386, Apr. 1994.

TRESE, A.T.; LOSCHKE, D.C. High contrast resolution of mycelia of pathogenic fungi in corn tissue after staining with calcofluor and destaining with cellulose. **Phytopatology**, Lancaster, v. 80, n. 2, p. 196-200, Feb. 1990.

3 ANATOMIA FLORAL RELACIONADA À DOENÇA PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS

Resumo

A presença de caracteres químicos e estruturais pré-formados em botões florais e pétalas de laranjeira 'Valência' foi analisada por meio de microscopia de luz e eletrônica, a fim de verificar o porquê da podridão floral dos citros (PFC) ser menos incidente nos botões florais com menos de 8mm. Também se verificou anatomicamente um dos sintomas mais frequentes da presença da PFC no campo. Esse sintoma caracteriza-se pela retenção do cálice e pedúnculo na planta e é denominado 'estrelinha'. As análises anatômicas sugerem que a resistência dos botões florais menores que 8mm pode estar associada às barreiras químicas e estruturais pré-formadas presentes neles. O ápice, nesses botões, apresenta papilas muito entremeadas, cristais prismáticos isolados ou em agregados no mesofilo e nas câmaras subestomáticas e, cavidades de óleo, que estão localizadas muito próximas umas das outras na face abaxial. Em botões com 8mm e 12mm as papilas do ápice dos primórdios de pétalas tornam-se mais afastadas, os cristais não são mais observados e ocorre o distanciamento entre as cavidades de óleo. No ápice da pétala, as células são papilosas e os testes histoquímicos confirmaram tratar-se de osmóforos. Na região mediana, as células apresentam ornamentações cuticulares e, na base, as células epidérmicas são tabulares. No sintoma 'estrelinha' ocorre a lignificação das células da medula do receptáculo e do pedúnculo, a qual pode auxiliar a retenção destas estruturas na planta.

Palavras-chave: Cavidades de óleo; Cristais; *Citrus sinensis*; *Colletotrichum acutatum*; Osmóforos

Abstract

The presence of preformed chemical and structural characters in buds and petals of 'Valência' orange was analyzed under light and electron microscopy in order to determine why the postbloom fruit drop (PFD) aiming to reduce incidence in floral buttons smaller than 8mm. One of the most common symptoms of PFD presence in the field was also anatomically analyzed. This symptom is characterized by the retention of the receptacle and pedicel and is called 'button'. The anatomical analysis suggests that the resistance of buds smaller than 8mm can be linked to the presence of preformed structural and chemical barriers. The apex of these buds, displays papillae interspaced, prismatic crystals isolated or in clusters in the mesophyll and substomatic chamber and oil cavities, which are located very close to each other on the abaxial surface. In buds with 8mm and 12mm, the papillate cells of petals become weakly interspaced, crystals are not observed and the distance between the oil cavities increase. At the petal apex, cells are papillose and histochemical tests confirmed that they are osmophores. In the middle region, the cells have cuticular ornamentation and, at the base, the epidermal cells are tabular. In the 'buttons', lignification of cells in the peduncle and receptacle occurs, which can help the retention of these structures in the plant.

Keywords: *Citrus sinensis*; *Colletotrichum acutatum*; Crystals; Osmophores

3.1 Introdução

A podridão floral dos citros (PFC) é uma doença causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* (Simmonds) e *C. gloesporioides* e é responsável por causar sérios prejuízos econômicos aos produtores (LIMA et al., 2011). Ela é considerada um fator limitante para a produção de Citrus em países da América Central e Brasil (TIMMER; BROWN, 2000). A presença da doença no pomar pode levar à perdas que podem atingir até 93% (PORTO, 1993). Ultimamente a doença vem assumindo grande destaque no estado de São Paulo devido à migração da citricultura das regiões tradicionais de cultivo como o norte e nordeste, onde a doença era de esporádica ocorrência devido à baixa pluviosidade, para a região sudoeste, na qual há maior pluviosidade e conseqüentemente maior ocorrência do patógeno (DE GOES et al., 2008).

Os estágios de desenvolvimento do botão floral estão diretamente relacionados com o sucesso da infecção pelo *C. acutatum* e com a eficiência do controle da PFC (ROBERTO; BORGES, 2001; FAGAN, 1979). Sabe-se que, botões florais menores do que oito milímetros de comprimento são considerados resistentes à infecção e a suscetibilidade é crescente com o aumento do tamanho do botão (FAGAN, 1979). Porém, até o presente estudo, nenhum esforço tinha sido feito para se compreender os mecanismos estruturais e, ou químicos dos mesmos que possam atuar de modo a inviabilizar a infecção pelo fungo.

A PFC é responsável por causar lesões alaranjadas, que podem coalescer e comprometer toda a superfície da pétala (FEICHTENBERGER, 2005). A doença também causa lesões necróticas no estigma, queda prematura dos frutos e produz cálices persistentes, sintoma denominado ‘estrelinha’ (FEICHTENBERGER, 2005; PERES et al., 2005; LIN et al., 2001).

A persistência do cálice resulta da abscisão na base do ovário, em contraste com a abscisão natural dos frutos jovens que ocorre entre o pedúnculo e o ramo (CHEN et al., 2006). Sabe-se que a presença de *C. acutatum* na flor leva a alterações no balanço hormonal e conseqüente abscisão precoce do ovário (CHEN et al., 2006). Os cálices persistentes são induzidos por alterações hormonais, em especial, na expressão diferencial de genes relacionados com a produção e regulação de AIA (ácido indolilacético), etileno e ácido jasmônico nas plantas infectadas (LI et al., 2003).

O objetivo do presente trabalho é apresentar a estrutura anatômica dos botões florais em diferentes etapas do desenvolvimento visando identificar se há barreiras estruturais e, ou químicas pré-formadas que possam estar relacionadas à resistência de botões florais menores

que 8mm a infecção pelo *Colletotrichum acutatum*. A estrutura anatômica das flores com e sem o sintoma de ‘estrelinha’ também será analisada visando entender o processo de retenção do cálice.

3.2 Desenvolvimento

Material e métodos

Material vegetal

Plantas de laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck ‘Valência’], em vasos mantidos em estufas na FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura), situada em Araraquara - SP foram induzidas ao florescimento, mediante podas e restrição hídrica. Foram coletados botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento (2, 3, 4, 8, 12 e 15mm de comprimento) e flores sadias. Para a análise comparativa das flores com o sintoma ‘estrelinha’, das flores sadias foram removidas as pétalas, estames e a parte superior do ovário, o estilete e o estigma.

Metodologia

Análises ao microscópio de luz

As amostras de botões florais e flores com e sem sintomas de ‘estrelinha’ foram coletadas, seccionadas longitudinalmente e fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965; modificado com tampão fosfato pH 7,2). Fixaram-se também os botões florais em solução de sulfato ferroso em formalina (JOHANSEN, 1940; JENSEN, 1962) para a detecção de substâncias fenólicas. Durante a fixação as amostras foram levadas a uma bomba de vácuo para a retirada do ar. Seguiu-se a desidratação em série etílica e infiltração em resina plástica (Leica Historesin®, Heraeus Kulzer, Hanau, Germany), tempo utilizado para inclusão dos botões florais e flores foi de um mês ou mais dependendo do estágio de desenvolvimento do botão floral. Os blocos foram seccionados a 5 - 7 µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045. As secções foram montadas em lâminas de vidro. Posteriormente coradas com Azul de Toluidina (SAKAI, 1973) para as análises histológicas usuais, com Sudan black B, a fim de detectar substâncias lipofílicas (PEARSE, 1968), com Aniline blue Black e Xylidine Ponceau, objetivando identificar a presença de

compostos de natureza protéica (FISHER, 1968; CORTELAZZO; VIDAL, 1991). Também foram realizados testes com os reagentes vermelho de rutênio para a detecção de compostos de natureza péctica (CHAMBERLAIN, 1932) e o cloreto de zinco iodado para detectar amido (JENSEN, 1962). Depois de coradas, as lâminas histológicas foram montadas em resina sintética Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany).

Botões florais e pétalas não fixados foram seccionados transversalmente em micrótomo de deslize Leica MS 2000R. Para a investigação da natureza química da secreção foram conduzidos, além do teste para detectar compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), os testes histoquímicos acima descritos para proteínas, substâncias lipofílicas e mucilagem. Para confirmar a presença de osmóforos nas pétalas e botões florais também foram utilizados o corante Rhodamine B (JIN et al., 2011) para ésteres de açúcares, o vermelho neutro (0,01 % em solução aquosa pH 8,00) para detectar atividade secretora (DUDAREVA; PICHERSKY, 2000), o reagente de NADI para terpenos (DAVID; CARDE, 1964), o sulfato azul do Nilo para lipídios ácidos e neutros (CAIN, 1947).

As imagens foram capturadas com câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DMLD.

Análises ao microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Botões florais foram coletados, seccionados longitudinalmente e imediatamente fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965; modificado com tampão fosfato pH 7,2), desidratados em série etílica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), secos ao método do ponto crítico de CO₂ (HORRIDGE; TAMM, 1969), montados sobre suportes de alumínio sobre fitas de carbono dupla face e cobertos com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações e as eletromicrografias foram feitas ao microscópio eletrônico de varredura modelo LEO VP 435, operado a 20 kV, com as escalas das eletromicrografias diretamente impressas nas mesmas.

Resultados

Botões Florais

Nos botões florais com 2mm de comprimento os ápices dos primórdios de sépalas se sobrepõem (Figuras 1B-B), protegendo os demais verticilos florais (Figura 1C). Nos botões

com 3 e 4mm ocorre a separação dos primórdios de sépalas e a exposição dos primórdios de pétalas (Figura 1E). Após a fixação com sulfato ferroso em formalina verificou-se que os primórdios de sépalas possuem cavidades de óleo, as quais acumulam compostos fenólicos (Figuras 1B e 2A). Internamente, nota-se que na região apical da corola ocorre a sobreposição dos ápices dos primórdios de pétalas e, como nessa região há presença de células papilosas, elas tendem a se entremear. O que difere os botões florais de tamanhos distintos é o arranjo entremeadado das células papilosas e a espessura da região de sobreposição. Nos estágios de 2, 3 e 4mm, as pétalas estão mais sobrepostas e as papilas mais entremeadas (Figuras 1C e F-G) em relação aos estágios de 8-12mm de comprimento (Figuras 1K-L).

Sob luz polarizada, os botões com menos de 8mm apresentam no mesofilo cristais de oxalato de cálcio dispersos (Figura 1D) ou agrupados (Figura 1G). Esse agrupamento ocorre próximo aos ápices dos primórdios de pétala. Os cristais também são observados junto às câmaras subestomáticas (Figura 1H).

Nos botões com 8mm (Figuras 1I-J) ou maiores (Figuras 1M-N) nota-se a exposição dos primórdios de pétalas. Botões com até 8mm apresentam distribuição uniforme das cavidades de óleo (Figura 1J). O padrão de entremeamento dos ápices de primórdios de pétalas tende a ficar mais frouxo (Figura 1K-L) e não se observam mais os cristais de oxalato de cálcio (Figura 1K).

Na medida em que ocorre o desenvolvimento dos botões florais as cavidades de óleo tendem a se distanciar e se distribuir de maneira não uniforme na superfície do botão floral (Figura 1M-O). Esse padrão se mantém nos estágios subsequentes do desenvolvimento (Figura 1P). Os botões florais expõem apenas a face abaxial onde estão presentes as cavidades de óleo. Após a antese, há exposição da face adaxial onde não se observam as cavidades (Figura 1Q).

O conteúdo das cavidades de óleo reage positivamente para substâncias fenólicas (Figura 2A) e lipofílicas (Figura 2B). Em botões florais com 4mm as cavidades estão muito próximas (Figura 2C), já nos com 8mm é perceptível o distanciamento entre elas (Figura 2D) sendo este ampliado nos botões com 12mm de comprimento (Figura 2E). O padrão de distribuição das cavidades nos botões com 12mm não é uniforme, ou seja, a maior quantidade delas é observada junto ao ápice dos primórdios de pétala, sendo que na base há poucas cavidades (Figura 2E).

Figura 1 - Eletromicrografias (A, C, E, I), fotomicrografias sob luz não polarizada (F, L) e polarizada (D, G, H, K) e fotografias (B, M-Q) de botões florais de *Citrus sinensis* 'Valência'. A-D. Botões florais com 2mm de comprimento. A. Notar a pequena exposição dos primórdios de pétalas (seta). B. Cavidades de óleo na superfície do primórdio de sépala (setas). C. O ápice dos primórdios de pétalas apresenta padrão compacto de entremeado (setas). D. Visão geral do botão sob luz polarizada. Notar cristais distribuídos nos primórdios. E-H. Botão floral com 4mm. E. Notar a maior exposição da corola. F. Teste com vermelho de Rutênio indicando o arranjo entremeado das papilas nos ápices dos primórdios de pétalas (setas). G. Cristais agrupados nos ápices dos primórdios de pétala. H. Cristais nas câmaras subestomáticas. I-K. Botão floral com 8mm de comprimento. I-J. Notar a exposição da corola. K. Ausência de cristais no mesofilo das pétalas. L-M. Botão floral com 12mm. L. Detalhe do ápice do botão floral onde nota-se o arranjo frouxo das papilas (setas). M-Q. Fixação com sulfato ferroso em formalina. N. Botão floral com 15mm. O. Botão floral após antese. P. Face abaxial da pétala. Notar a menor quantidade de cavidades junto à base da pétala (retângulo amarelo) quando comparada com o ápice (retângulo laranja). Q. Notar ausência de cavidades de óleo na face adaxial da pétala. EP – Epiderme; ES – Estames; ME – Mesofilo; PI – Pistilo; PP – Primórdio de pétala; PS – Primórdio de sépala

Figura 2 – Secções transversais das cavidades de óleo nos primórdios de pétalas de *Citrus sinensis* 'Valência'. A. Células da cavidade de óleo reagindo positivamente para o sulfato ferroso em formalina. B. Cavidade de óleo com células coradas pelo Sudan Black B. C-E. Distribuição das cavidades de óleo em botões florais com 4mm, 8mm (setas) e 12 mm (setas). CA – Cavidade de óleo

Nas secções transversais dos ápices dos botões florais verifica-se que a região da corola exposta nos botões com 2-4mm é aquela composta por células papilosas (Figuras 3A-B e F). Nos botões florais com 2mm de comprimento há o acúmulo de amido nas células do mesofilo e das papilas (Figura 3C). Nos demais estágios analisados 3, 4, 8 e 12mm as células papilosas reagem positivamente para o corante vermelho neutro (Figuras 3D e G), com sulfato azul do Nilo (Figura 3E) e com cloreto férrico (Figura 3H). Essas papilas também apresentam reação positiva com o reagente de NADI indicando a presença de terpenos (dados não ilustrados).

Figura 3 – Eletromicrografias (A,B,F) e fotomicrografias (C-E, G,H) dos osmóforos nos diferentes estágios de desenvolvimento dos botões florais de *Citrus sinensis* 'Valência'. A-C. Botões florais com 3mm. Notar que a região exposta é composta por células papilosas entre as quais ocorrem estômatos (seta em B). C. Notar o acúmulo de amido nas células papilosas. D-E. Botões com 8mm. Células papilosas coram com vermelho neutro (D) e com o sulfato azul do Nilo (E). F-H. Botões com 12mm. F. Células papilosas (setas) que reagem positivamente com vermelho neutro (G) e cloreto férrico (H). EAB – Epiderme abaxial; EAD – Epiderme adaxial; ME – Mesofilo; PP – Primórdio de pétala; PS – Primórdio de sépala

A pétala possui características epidérmicas distintas no ápice, meio e base. No ápice as células são papilosas entre as quais ocorrem alguns tricomas unisseriados (Figuras 4A-B). A confirmação de que o ápice da pétala constitui um osmóforo foi possível com os testes histoquímicos. As células epidérmicas coram com vermelho neutro (Figura 4C), apresentam ésteres de açúcar (Figura 4D), reagem positivamente com o reagente de NADI, indicando a presença de terpenos (Figura 4E) e podem apresentar gotas lipídicas (Figura 4F). Algumas células reagem positivamente ao cloreto férrico indicando a presença de compostos de natureza fenólica (Figura 4G). A superfície da região mediana apresenta depressões e saliências e a papilosidade das células é menos proeminente que no ápice (Figura 4H). Na

base da pétala as células epidérmicas são tabulares (Figura 4I). Os estômatos ocorrem em ambas as faces.

O mesofilo é homogêneo constituído de células parenquimáticas braciformes (Figura 4I). Nele estão presentes cavidades de óleo, voltadas apenas para a superfície abaxial (Figuras 2C-E). Os feixes vasculares são colaterais (Figura 4I).

Descrição anatômica da flor sem o sintoma 'estrelinha'

Em secção longitudinal verifica-se a presença de sépalas, do nectário, do ovário e do receptáculo (Figura 5A). Na região do receptáculo ocorre a distribuição dos traços vasculares para os diferentes verticilos. O parênquima da medula do receptáculo e do pedúnculo apresenta numerosas divisões celulares (Figura 5B). Sob luz polarizada observa-se o acúmulo de cristais no nectário e distribuídos esparsamente na medula do receptáculo (Figura 5C). Testes histoquímicos com cloreto de zinco iodado revelaram a ausência de amido nas células da medula do receptáculo (Figura 5D).

Figura 4 – Eletromicrografias (A, B, H) e fotomicrografias (C-G, I) da pétala sadia de *Citrus sinensis* ‘Valência’. A. Visão geral da pétala com o ápice delimitado pelo círculo. B. Detalhe das células papilosas da região delimitada em A. C. Papilas e tricoma com conteúdo corado pelo vermelho neutro (*). D. Ésteres de açúcares (setas) evidenciados pelo Rhodamine B. E. Reação positiva para reagente de NADI na extremidade do tricoma (seta). F. Gota lipídica corada pelo Sudan IV. G. Conteúdo fenólico evidenciado pelo cloreto férrico. H. Visão geral da região mediana da pétala onde se observam depressões (setas) e saliências. I. Seção transversal na região da base da pétala. EAB – Epiderme da face abaxial; EAD – Epiderme da face adaxial; FV – Feixe vascular; ME – Mesofilo; PA – Papila; TR – Tricoma

Figura 5 - Secções longitudinais do receptáculo floral e pedúnculo floral sadio de *C. sinensis* 'Valência'. A. Visão geral do pedúnculo, sépalas, nectário e base do ovário que estão aderidos ao receptáculo. As setas indicam as ramificações dos feixes vasculares no receptáculo. B. Detalhe da medula do receptáculo onde são perceptíveis células em divisão (setas). C. Análise sob luz polarizada. Notar a presença de cristais junto ao nectário e dispersos no receptáculo. D. Reação negativa para cloreto de zinco iodado nas células da medula do receptáculo. ME – Medula; NE – Nectário; OV – Ovário; PE – Pedúnculo floral; SE – Sépalas

Descrição anatômica da flor com o sintoma 'estrelinha'

Os receptáculos apresentando sintomas de 'estrelinha' são maiores que os receptáculos sem sintomas. As principais características dessa estrutura são: a maior rigidez do receptáculo e a presença de um meristema de cicatrização que se instala com a queda prematura dos ovários (Figuras 6A e H). Em secção longitudinal nota-se a instalação de meristema de cicatrização sob a área de abscisão do ovário (Figura 6B). Ele resulta de divisões periclinais do parênquima (Figura 6B). Nas camadas mais externas, as células acumulam compostos de natureza lipídica (Figura 6C). Essas características são observadas em toda a extensão do

receptáculo, onde antes estava instalado o ovário. A região meristemática apresenta células com conteúdo protéico (Figura 6D). Testes para presença de amido revelaram que este se acumula mais próximo ao meristema de cicatrização (Figura 6E). Há clara delimitação entre as camadas de células em processo de lignificação e as camadas de células que acumulam amido (Figura 6F).

Ao analisar a região meristemática sob luz polarizada verifica-se a presença de uma camada de células em processo de lignificação (Figura 6G), a qual ocorre abaixo daquela que acumula compostos de natureza lipídica (Figura 6C). Numerosos cristais de oxalato de cálcio são observados nos espaços intercelulares das células do meristema de cicatrização (Figura 6G).

As células do receptáculo, localizadas abaixo do meristema de cicatrização, apresentam-se em intensa divisão. Nota-se o espessamento (Figura 6I) e lignificação da parede das células da medula (Figura 6J). Nessa região observa-se ainda o aumento na quantidade de cristais (Figura 6J). O espessamento e a lignificação das paredes celulares também ocorrem na medula do pedúnculo floral (Figura 6K).

Não ocorrem alterações estruturais no disco nectarífero ou nas sépalas. Ambos também não apresentaram variações na quantidade de cristais. Ressalta-se que em todos os tecidos analisados não se observam hifas do *C. acutatum*.

Figura 6 - Secções longitudinais do receptáculo de *C. sinensis* 'Valência' apresentando sintomas da doença estrelinha. A. Visão geral do receptáculo lesionado. Notar o meristema de cicatrização subjacente à área onde antes estava instalado o ovário (setas). B. Detalhe do meristema de cicatrização (setas). C. Compostos lipídicos evidenciados pelo Sudan black B nas camadas mais externas do meristema (setas). D. Teste com Xylidine Ponceau indicando acúmulo de compostos protéicos (setas) nas células do meristema. E-F. Reação positiva para o cloreto de zinco iodado indicando que o amido acumula em toda a extensão do meristema de cicatrização (setas). G-H e J. Análise das secções sob luz polarizada. G. Processo de lignificação das células do meristema (setas pretas) e deposição de cristais entre as células (setas vermelhas). H. Células lignificadas do meristema de cicatrização (setas menores) e da medula (setas maiores). I. Detalhe da medula cujas células possuem paredes espessas e lignificadas (setas). J. Notar a presença de cristais (setas). K. Células da medula do pedúnculo com paredes espessas (setas). NE – Nectário; MD – Medula; ME – Meristema de cicatrização; XI – Xilema

Discussão

As análises anatômicas dos botões menores que 8mm apontam características estruturais que podem explicar a menor incidência de infecção em botões com 2, 3 e 4 mm de comprimento relatada por Fagan em 1979.

O arranjo compacto das papilas nos primórdios de pétala pode ser considerado como uma barreira estrutural à infecção do fungo. Já os botões com 8 ou 12 mm possuem arranjo frouxo, oferecendo assim menor resistência à infecção pelo fungo.

Observa-se que os osmóforos de *C. sinensis* ocorrem apenas nos ápices das pétalas e são constituídos tanto por células papilosas quanto por tricomas glandulares. A ocorrência desses tipos celulares já foi observada em osmóforos de outras famílias de plantas, como por exemplo, Orchidaceae e Araceae (CURRY, 1991; KOLOSOVA et al., 2001; EFFEMERT et al., 2006).

Nos botões com 2mm de comprimento observou-se que as células do mesofilo dos primórdios de pétalas acumulam amido. O acúmulo de amido ocorre nos estágios iniciais do desenvolvimento dos osmóforos e está relacionado com o suprimento de carbono para os compostos voláteis nos estágios posteriores de desenvolvimento do osmóforo (PRIDGEON; STERN, 1983; STERN et al., 1987; EFFEMERT et al., 2006).

Os principais componentes voláteis liberados pelos osmóforos são: hidrocarbonetos, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas e terpenos (SILVA et al., 1990). Dentre esses se destacam os mono e sesquiterpenos (DUDAREVA; PICHERSKY, 2000). Tais compostos são eliminados na medida em que são produzidos e dependem de temperatura para a sua volatilização (SILVA et al., 1990; DUDAREVA; PICHERSKY, 2000). Esse fato pode explicar o baixo acúmulo de terpenos nas papilas e tricomas, quando essas células foram submetidas ao reagente de NADI.

Odor e néctar são frequentemente associados à manutenção do relacionamento planta-polinizador. O odor floral está relacionado com a atração à longa distância, enquanto que o néctar constitui a principal fonte de recompensa aos polinizadores (PROCTOR et al., 1996). Sabe-se que nas flores cítricas não há necessidade de atrair artificialmente os agentes polinizadores, essas visitas ocorrem naturalmente (MALERBO, 1991). Sugere-se que a ocorrência de osmóforos nos ápices das pétalas relaciona-se com a atratividade natural que ocorre na interação flores de *Citrus sinensis* – *Apis mellifera*.

São observados cristais de oxalato de cálcio apenas nos primórdios de pétalas dos botões menores que 8mm. De acordo com Franceschi e Nakata (2005), os cristais de oxalato

de cálcio possuem grande ocorrência nas famílias de plantas superiores. Usualmente, relaciona-se o papel dos cristais de oxalato de cálcio na defesa dos vegetais contra o ataque de herbívoros (NAKATA, 2003). Porém, segundo Ceita et al. (2007), os cristais possuem um papel importante na morte celular programada, atuando de modo efetivo no controle de patógenos. Os cristais de oxalato de cálcio observados nos primórdios de pétala dos botões florais com até 4mm poderiam ser considerados como um mecanismo de defesa da planta ao patógeno, pois a infecção pelo fungo somente ocorre em botões com 8mm ou maiores nos quais não se observa a presença dos cristais.

Nos botões menores que 8mm as cavidades de óleo essencial distribuem-se mais próximas umas das outras. Os óleos essenciais de *Citrus sinensis* são conhecidos por representarem uma barreira química pré-formada, que interferem grandemente nas relações plantas-patógenos (CACCIONI et al., 1998). Alguns terpenos presentes nas cavidades de óleos essenciais de *Citrus sinensis* já possuem eficácia comprovada como agentes antibacterianos (DABBAH et al., 1970) ou antifúngicos (MOLEYAR; NARASIMHAM, 1986; CACCIONI et al., 1998; SHARMA; TRIPATHI, 2008; VIUDA-MARTOS et al., 2008). Dentre os compostos fenólicos encontrados nos extratos de óleos essenciais em casca de laranja destacam-se as polimetoxiflavonas, moléculas pertencentes ao grupo dos flavonóides (GATTUSO et al., 2007). Estudos com polimetoxiflavonas, extraídas do fruto de *Citrus aurantifolia* revelam que tais compostos possuem atividade antifúngica, incluindo fungos do gênero *Colletotrichum* (JOHAN et al., 2007). Tendo em vista a atividade antifúngica de terpenos e fenóis das cavidades de óleo, sugere-se que o não desenvolvimento ou a baixa incidência de lesões nos botões florais com menos de 8mm deva-se ao fato dessas cavidades estarem próximas umas das outras, fornecendo assim resistência ao ataque do patógeno.

Timmer et al. (1994) comentam que as pétalas após a abertura da flor são mais susceptíveis a infecção. Este fato está relacionado com as características estruturais da pétala após abertura da flor. Após a antese há exposição da face adaxial da pétala. Esta face não apresenta cavidades de óleo voltadas para a superfície e sua superfície é composta por depressões e saliências, as quais facilitam a deposição dos conídios. Tais características favorecem o desenvolvimento do fungo e consequente sucesso na infecção, favorecendo assim o surgimento de lesões.

Ao se investigar o receptáculo floral com sintoma de ‘estrelinha’ pode-se verificar a instalação de um meristema de cicatrização. Essa formação é um fenômeno observado em

áreas lesionadas em resposta a agentes bióticos ou abióticos (THOMSON et al., 1995; MARQUES et al., 2007; MELO-DE-PINNA et al., 2002), e tem função de isolar as regiões lesionadas dos demais tecidos da planta. Na camada mais externa do meristema há deposição de compostos de natureza lipídica, sendo que a suberização é um fenômeno frequente dos tecidos vegetais frente à injúria mecânica ou quando os tecidos internos são expostos (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Outra característica é a intensa lignificação das células da medula do pedúnculo e do receptáculo. A lignificação das paredes das células é um processo de defesa do hospedeiro à infecção de patógenos (VANCE et al., 1980; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; BHUIYAN et al., 2009). No caso da PFC a lignificação das células pode estar relacionada à queda do ovário e não necessariamente ao *C. acutatum*, devido a não presença de hifas do fungo nos tecidos analisados. De fato, Shneider (1968), descreve que o espessamento e a lignificação da parede das células da região da medula do receptáculo e do pedúnculo ocorrem naturalmente com o desenvolvimento do fruto. Na PFC, após a queda prematura do ovário, ocorre a lignificação das paredes celulares, causando o enrijecimento do receptáculo e do pedúnculo, favorecendo a sua retenção na planta.

3.3 Considerações Finais

Botões florais de *Citrus sinensis* menores que 8mm apresentam caracteres estruturais e bioquímicos pré-formados que podem dificultar a penetração e colonização dos tecidos pelo fungo *Colletotrichum acutatum*. São eles: arranjo das papilas nos ápices dos primórdios de pétalas, presença de cristais de oxalato de cálcio isolados ou agrupados e distribuição das cavidades de óleo. Na medida em que o botão floral desenvolve-se e após a antese as características presentes nos botões menores que 8 mm modificam-se. Esses fatores podem levar a perda da resiliência dos tecidos vegetais, facilitando deste modo a atuação do fungo. Além disso, verificou-se que as papilas e tricomas dos ápices dos botões florais e pétalas podem ser considerados osmóforos. A análise anatômica do sintoma estrellinha mostrou que com a queda do ovário há instalação de um meristema de cicatrização. Também se verificou a lignificação e acúmulo de cristais de oxalato de cálcio nas células do pedúnculo e receptáculo. Tais características favorecem a retenção destas estruturas na planta.

Referências

- BHUIYAN, N.H.; SELVARAJ, G.; WEI, Y.; KING, J. Role of lignification in plant defense. **Plant Signaling & Behavior**, Rio Grande, v. 4, n. 2, p. 158-159, Feb. 2009.
- CACCIONI, D.R.L.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D.M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus fruit, essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 1/2, p. 73–79, 1998.
- CAIN, A.J. The use of Nile Blue in the examination of lipids. **Quarter Journal Microscopical Science**, London, v. 88, p. 383-392, 1947.
- CEITA G.O.; MACEDO, J.N.A.; SANTOS, T.B.; ALEMANNIO, L.; GESTERIA A.; MICHELI, F.; MARIANO, A.C.; GRAMACHO, K.P.; SILVA, D.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 173, n. 2, p. 106-117, 2007.
- CHAMBERLAIN, C.J. **Methods in plant histology**. Chicago: The University of Chicago Press, 1932. 416 p.
- CHEN, H.; DEKKERS, L.; CAO, L.; BURNS, J.K.; TIMMER, L.W.; CHUNG, K. Evaluation of growth regulator inhibitors for controlling postbloom fruit drop (PFD) of *Citrus* induced by the fungus *Colletotrichum acutatum*. **HortScience**, St. Joseph, v. 41, n. 5, p. 1317-1321, 2006.
- CORTELAZZO, A.L.; VIDAL, B.C. Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. **Revista Brasileira de Botanica**, São Paulo, v. 14, p. 27-33, 1991.
- CURRY, K.J. Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 78, n. 5, p. 610-623, 1991.
- DABBAH, R.; EDWARDS, V.M.; MOATS, W.A. Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 19, n. 1, p. 27-31, Jan. 1970.
- DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 258, p. 1338-1340, 1964.
- DE GOES, A.; GARRIDO, R.B.O.; REIS, R.F.; BALDASSARI, R.B.; SOARES, M.A. Evaluation of fungicide applications to sweet orange at different flowering stages for control of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, n. 1, p. 71-76, 2008.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 3, p. 627–633, Mar. 2000.

EFFEMERT, U.; BUSS, D.; ROHRBECK, D.; PIECHULLA, B. Localization of the synthesis and emission of scent compounds within the flower. In: DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. (Ed.). **Biology of floral scent**. Boca Raton: CRC Press, 2006. chap. 6, p. 105–124.

FAGAN, H.J. Postbloom fruit drop of citrus, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 91, n. 1, p. 13–20, 1979.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. 312 p.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPOSITO, M.B.; BELASQUE Jr., J. Doenças dos Citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 239–269.

FISHER, D.B. Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 92–96, 1968.

FRANCESCHI, V.R.; NAKATA, P.A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 41–71, Apr. 2005.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; CARISTI, C.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U. Distribution of flavonoids and furocoumarins in juices from cultivars of *Citrus bergamia* Risso. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 24, p. 9921–9927, 2007.

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.

JIN, S.; KANAGARAJ, A.; VERMA, D.; LANGE, T.; DANIELL, H. Release of hormones from conjugates: chloroplast expression of β -glucosidase results in elevated phytohormone levels associated with significant increase in biomass and protection from aphids or whiteflies conferred by sucrose esters. **Plant Physiology**, Rockville, v. 155, n. 1, p. 222–35, Nov. 2011.

JOHAN, S.; SMÂNIA-Jr, A.; PIZZOLATTI, M. G.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; BRANCO, A. Complete ¹H and ¹³C NMR assignments and antifungal activity of two 8-hydroxy flavonoids in mixture. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 2, p. 215–222, 2007.

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.

KOLOSOVA, N.; SHERMAN, D.; KARLSON, D.; DUDAREVA, N. Cellular and subcellular localization of *s*-adenosyl-l-methionine:benzoic acid carboxylmethyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methylbenzoate in snapdragon flowers. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 956–964, 2001.

LI, W.; YUAN, R.; BURNS, J.K.; UENG, P.P.; TIMMER, L.W.; CHUNG, K.R. Genes for hormone biosynthesis and regulation are highly expressed in citrus flowers infected with fungus *Colletotrichum acutatum*, the causal agent of postbloom fruit drop. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v. 128, n. 4, p. 578-583, July 2003.

LIMA, W.G.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F. P.; DE FILHO, P.A.M. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 1, p. 157–165, 2011.

LIN, Y.J.; STOVER, E.; SONODA, R.; ROSSKOPF, E. Stigma and style necrosis is associated with postbloom fruit drop disease in citrus following artificial inoculation. **Hortscience**, St. Joseph, v. 36, n. 6, p. 1138, 2001.

MALERBO, D.T.S. **Polinização entomófila em 3 variedades de laranja *Citrus sinensis* L.** 1991. 66 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1991.

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, p. 1531-1536, nov. 2007.

MELO-DE-PINNA, G.F.A.; KRAUS, J.E.; MENEZES, N.L. 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, feb. 2002.

MOLEYAR, V.; NARASIMHAM, P. Antifungal activity of some essential oil components. **Food Microbiology**, London, v. 3, p. 331-336, 1986.

NAKATA, P.A. Advances in our understanding of calcium oxylate crystals formed in plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, n. 6, p. 901–909, June 2003.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 369-389, Apr. 1992.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22. p. 417-453.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry, theoretical and applied**. 3rd ed. London: Churchill, 1968. v. 1, 998 p.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 8, p. 784-796, Aug. 2005.

PORTO, O.M. Queda anormal de frutos jovens de citros. **Laranja**, Corderirópolis, v. 14, n. 1, p. 341-356, 1993.

PRIDGEON, A.M. STERN, W.L. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 70, n. 8, p. 1233-1243, 1983.

PROCTOR, M.; YEO, P.; LACK, A. **The natural history of pollination**. London: Harper Collins, 1996. 479 p.

ROBERTO, S.R.; BORGES, A.V. Efeito do estágio do desenvolvimento das flores e aplicação de fungicidas no controle da podridão floral dos citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 23, n. 2, p. 306-309, 2001.

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

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 16, n. 3, p. 337-344, 2008.

SHNEIDER, H. The anatomy of citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. **The citrus industry: anatomy, physiology, genetics and reproduction**. Berkeley: University of Califórnia, 1968. v. 2, p. 1- 85.

SILVA, A.G. Osmóforos: retrospectiva dos últimos 20 anos de pesquisa. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 7-20, 1990.

STERN, W.L.; CURRY, K.J.; PRIDGEON, A.M. Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, New York, v. 74, n. 9, p. 1323-1331, 1987.

TIMMER, L.W.; BROWN, G.E. Biology and control of anthracnose diseases of citrus. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M.B. (Ed.). **Colletotrichum: host specificity, patholog, and host-pathogen interaction**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 2000. p. 300-316.

TIMMER, L.W.; AGOSTINI, J.P.; ZITKO, S.E.; ZULFIQAR, M. Postbloom fruit drop, an increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. **Plant Disease**, St. Paul, v. 78, n. 4 p. 329-334, Apr. 1994.

THOMSON, N.; EVERT, R.F.; KELMAM, A. Wound healing in whole potato tubers: a cytochemical, fluorescence and ultrastructural analysis of cut and bruise wounds. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 73, p. 1436-1450, 1995.

VANCE, C.P.; KIRK T.K.; SHERWOOD R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 18, p. 259-288. Apr. 1980.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 12, p. 1130-1138, Nov. 2008.

4 PODRIDÃO FLORAL DOS CITROS: HISTOPATOLOGIA DE *Colletotrichum acutatum*

Resumo

A podridão floral dos citros, causada pelos fungos *Colletotrichum acutatum* e *C. gloeosporioides*, causa danos quando o florescimento coincide com períodos chuvosos. Além da podridão em pétalas e estigmas, a doença provoca a queda prematura de frutos, reduzindo a produção. O patógeno sobrevive entre as floradas em folhas de citros e de plantas daninhas. Os mecanismos de infecção e sobrevivência são pouco conhecidos. A histopatologia da podridão floral dos citros, causada por *C. acutatum*, foi investigada em pétalas, estigmas e folhas de laranja doce, utilizando microscopia eletrônica e de luz. Nas pétalas, a penetração do patógeno ocorreu diretamente (intra e intercelularmente) ou via estômatos. A penetração intercelular foi mais frequente e a colonização ocorreu em diferentes tecidos da pétala, inclusive nos tecidos vasculares, especialmente, no xilema. Acérvulos foram observados em ambas as superfícies das pétalas. Embora não tenha havido a penetração do fungo nas células epidérmicas do estigma, na presença do fungo as células epidérmicas acumulam fenóis e, posteriormente necrosam. Sob a área necrosada há a instalação de uma camada de proteção cujas células acumulam compostos lipofílicos e fenólicos. Observa-se também a presença de cristais de oxalato de cálcio nas áreas onde o fungo está presente. Nas folhas inoculadas, os conídios germinaram e formaram apressórios 48 horas após a inoculação, porém não houve formação do peg de penetração sob o apressório.

Palavras-chave: Acérvulo; Apressório; Podridão floral do citrus

Abstract

The postbloom fruit drop of citrus, caused by the fungus *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*, causes damage when flowering coincides with the rainy season. In addition to lesions in petals and stigmas, the disease causes premature fruit drop, reducing yield. The pathogen survives on citrus leaves and weeds between flowering seasons. The mechanisms of infection and survival are poorly understood. In this study, we investigated the histopathology of the postbloom fruit drop caused by *C. acutatum* in petals, stigmas and leaves of sweet orange, using light and electron microscopy. In petals, the pathogen penetration occurred directly (both intra and intercellular) or via stomata. The intercellular penetration was more frequent and colonization occurred in different tissues of the petal, including vascular tissue, especially in xylem. Acervulli were observed on both surfaces of petals. Although there was no penetration of the fungus into the stigma epidermal cells, in the presence of epidermal cells fungus phenols accumulate and subsequently undergo necrosis. The installation of a protective layer whose cells accumulate lipophilic and phenolic compounds occurs under the necrotic area. Crystals of calcium oxalate in the areas where the fungus is present are also observed. In inoculated leaves, conidia germinated and formed appressoria 48 h after inoculation, but there was no formation of the penetration peg beneath the appressorium.

Keywords: Acervulli; Appressorium; Postbloom fruit drop

4.1 Introdução

A Podridão Floral dos Citros (PFC) é uma das mais importantes doenças fúngicas que afetam os pomares de laranjeira doce [*Citrus sinensis*(L) Osbeck] (FEICHTENBERGER et al., 2005). Ela pode ser causada pelos fungos *Colletotrichum acutatum* e *C. gloesporioides* (TIMMER, 1993, LIMA et al., 2011; McGOVERN et al., 2012). Em condições favoráveis, como elevada umidade na época da floração, a PFC pode causar redução acima de 80% na produção (DE GOES; KUPPER, 2002).

Essa doença caracteriza-se pela formação de lesões alaranjadas em pétalas, lesões necróticas em estigmas e queda prematura de frutos, com retenção de cálices (FEICHTENBERGER, 2005).

Nas etapas iniciais da infecção por espécies de *Colletotrichum* o conídio adere à superfície do hospedeiro e germina. O tubo germinativo cresce e se desenvolve formando um micélio que forma um conídio secundário ou apressório. O apressório forma um ‘peg’ de penetração que invade diretamente a cutícula e parede das células. Há dois tipos de estratégias de colonização por espécies de *Colletotrichum*: intracelular hemibiotrófico e subcuticular-intramural necrotrófico (BAILEY et al., 1992). Os patógenos com estratégia intracelular hemibiotrófica invadem as células por um período curto mantendo-as, aparentemente, para a sua nutrição, e então se convertem, para a fase necrotrófica, matando a célula (PERFECT et al., 1999). Na estratégia subcuticular-intramural, o fungo cresce sob a cutícula e na parede das células epidérmicas e subjacentes (PERES et al., 2005).

Na fase biotrófica, após a penetração do fungo, há formação de uma vesícula de infecção intracelular ou uma hifa primária (MENDGEN; HAHN, 2002; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO; 2004). Nesse primeiro estágio não ocorre o rompimento da membrana plasmática da célula hospedeira e formação de uma matriz que separa a parede da célula do fungo da membrana. Essa matriz é extracelular e composta por glicoproteínas como a C1H1, que está presente apenas na fase de biotrófica. (RODRÍGUEZ-LOPEZ et al., 2008). Nesse estágio não há surgimento de lesões.

As lesões surgem com o desenvolvimento das hifas secundárias e consequente colonização dos tecidos adjacentes. Nessa fase o fungo libera enzimas que degradam parede das células hospedeiras como a endo-poligalacturonase, a pectina liase, a pectato liase e a pectina metil esterase, caracterizando a fase necrotrófica da doença (CENTIS et al., 1997; YAKOBY et al., 2000).

A infecção quiescente ou latência caracteriza-se pelo período em que o fungo, após formar o apressório, permanece aderido e dormente não promovendo a infecção dos tecidos. Após um período, em condições favoráveis torna-se ativo e causa a infecção (VERHOEFF, 1974; WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004; MUIRHEAD; DEVERALL, 1981). Nos tecidos vegetativos de laranjeira doce o *C. acutatum* pode sobreviver nas folhas de citros na forma de apressórios como infecção quiescente, sem que haja o aparecimento de lesões (ZULFIQAR et al., 1996). Essa característica também foi observada em plantas daninhas, fornecendo indícios de que estas participam no patossistema da PFC como fonte de inóculos (FRARE, 2012).

O objetivo deste trabalho foi analisar a interação do *Colletotrichum acutatum* com os tecidos da pétala, estigma e folhas de *Citrus sinensis* dando ênfase ao modo de penetração, colonização e análise microscópica da presença da infecção quiescente.

4.2 Desenvolvimento

Material e métodos

Material botânico

Para os experimentos de inoculação, bem como para a retirada de amostras de material sadio foram cultivadas plantas de laranjeira doce ‘Valência’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] em vasos mantidos em casa de vegetação. As plantas foram induzidas ao florescimento, mediante podas e restrição hídrica. Foram utilizadas flores após a antese e folhas maduras completamente expandidas.

Inoculação

A inoculação foi feita com isolado de *Colletotrichum acutatum*, caracterizado molecularmente (isolado 142a). Sobre uma colônia de *Colletotrichum acutatum*, cultivada em BDA por sete dias depositaram-se 2 ml de água destilada e os esporos foram suspensos com o auxílio de uma alça de Drigalsky. A suspensão foi ajustada para a concentração final de $4,3 \times 10^5$ esporos/ml de suspensão.

A inoculação de pétalas, estigmas e folhas foi feita com uma micropipeta para deposição das gotas com 5 µl da suspensão do fungo em setores previamente marcados com

uma caneta com tinta à prova de água. Foram inoculadas 14 pétalas e estigmas com o patógeno. Como controle as amostras foram inoculadas apenas com água destilada estéril. Foram feitas câmaras úmidas com período de 24 horas de molhamento.

Análises histológicas

Cinco amostras de pétalas e de estigmas foram coletadas no 3º, 4º e 5º dias após a inoculação. Também foram utilizadas cinco amostras de pétalas e estigmas de plantas sadias.

Todas as amostras foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965; modificado com tampão fostato pH 7,2). Durante a fixação elas foram colocadas numa bomba de vácuo para a retirada do ar. Estas foram desidratadas em série etílica e infiltradas em resina plástica (Leica Historesin®, Heraeus Kulzer, Hanau, Germany). Os blocos foram seccionados a 5 - 7 µm de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045. As seções foram coradas com o Azul de Toluidina (SAKAI, 1973) para as análises histológicas usuais, com o Sudan black B (PEARSE, 1968) para substâncias lipofílicas, com Vermelho de Rutênio para a detecção de compostos de natureza péctica (CHAMBERLAIN, 1932) e com Xylidine Ponceau para a detecção de compostos protéicos (CORTELAZZO; VIDAL, 1991). Também foi utilizado o reagente cloreto de zinco iodado para a detecção de amido (JENSEN, 1962). As lâminas permanentes foram montadas resina sintética Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany). Para confirmar a natureza química dos cristais presentes nos estigmas, utilizou-se análise através da solubilidade em ácido sulfúrico a 1% (JOHANSEN, 1940).

Para as análises das folhas inoculadas, utilizou-se a técnica de impressão da superfície com auxílio de uma película de esmalte que, depois de removida da folha, foi colocada sobre uma lâmina de vidro com água. Removido o excesso de água, a película foi corada com azul de algodão 5% em lactofenol por cerca de três minutos, lavada em água destilada e montada em gelatina glicerínada. As folhas também foram seccionadas transversalmente em micrótomo de deslize. As seções foram coradas com Azul de Algodão 5% em lactofenol por cerca de 10 segundos, lavadas em água destilada e montadas em gelatina glicerínada (KAISER, 1880).

As imagens foram capturadas com câmera de vídeo Leica DC 300F acoplada ao microscópio Leica DMLD.

Análise de superfície (MEV)

Dez amostras de pétalas e de estigmas inoculados foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965; modificado com tampão fosfato pH 7,2), desidratadas em série etílica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), secas ao método do ponto crítico de CO₂ (HORRIDGE; TAMM, 1969), montadas em suportes de alumínio sobre fitas de carbono dupla face e cobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações e as eletromicrografias foram feitas ao microscópio eletrônico de varredura modelo LEO VP 435, operado a 20 kV, com as escalas das eletromicrografias diretamente impressas nas mesmas.

Análises ultraestruturais (MET)

Dez amostras de pétalas foram coletadas e imediatamente fixadas em glutaraldeído 3% e tampão cacodilato de sódio 0,2M pH 7,25. Retirou-se o ar das amostras por 5 minutos e então foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. As amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e infiltradas em resina Spurr. Os blocos foram seccionados no ultramicrotomo Leica UC6 e as seções contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 2% por trinta minutos em cada etapa (REYNOLDS, 1963). As observações e as eletromicrografias foram feitas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100, operado a 80 kV, com as escalas das eletromicrografias diretamente impressas nas mesmas.

Resultados

Pétalas inoculadas

Nas amostras inoculadas observou-se que os conídios em sua maioria depositam-se junto às paredes anticlinais das células epidérmicas. Também foram verificadas as etapas de germinação do conídio, desenvolvimento do tubo germinativo e formação do apressório, o qual se desenvolveu junto às paredes anticlinais (Figuras 1A e D) e periclinais na epiderme (Figuras 1B e E). Em algumas amostras observou-se a penetração do patógeno através do ostíolo do estômato (Figura 1C) e o crescimento subcuticular e intramural das hifas (Figura 1F). Houve maior incidência de penetração intercelular (Figuras 1D e G) quando comparada à penetração direta na célula epidérmica (Figura 1E), em razão da alta frequência de apressórios

formados juntos às paredes anticlinais das células epidérmicas. Durante a penetração intercelular verificou-se a dissolução da lamela média e o crescimento de hifas (Figura 1G). Em células totalmente necrosadas e ocupadas pelo fungo foi observada a liberação de vesículas em direção à parede celular justamente nos setores da parede com arranjo alterado (frouxo) das microfibrilas de celulose (Figura 1H).

A formação do acérvulo iniciou-se com o desenvolvimento do estroma nas células epidérmicas e subepidérmicas. Neste estágio verificou-se a expansão da cutícula para acomodar o crescimento do acérvulo (Figura 1I). Houve lise na parede periclinal externa da célula epidérmica (Figura 1J e K) e rompimento cuticular com emergência dos conidióforos e conídios (Figura 1L). Cristais de oxalato de cálcio formaram-se na base dos conidióforos (Figura 1M). Houve lignificação das células do estroma (Figura 2A) e os acérvulos foram formados em ambas as faces da pétala (Figura 2B). As hifas apresentaram diâmetro maior quando associadas aos tecidos vasculares. Houve hipertrofia da célula do parênquima vascular tanto no floema quanto no xilema (Figuras 2C, D) ocasionando o afastamento dos elementos de vaso (Figura 2C).

Hifas do fungo foram observadas no interior dos elementos de vaso (Fig 2E) e associadas às suas pontuações (Figura 2F). As hifas foram também observadas no interior de elementos de tubo crivado (Figura 2G e H). Nas regiões com acérvulos, todos os feixes vasculares foram colonizados inter- e intracelularmente. Células de tecidos adjacentes às regiões com hifas e acérvulos apresentaram alterações, como, por exemplo, granulações citoplasmáticas e plasmólise celular (dados não ilustrados).

Figura 1 – Pétalas de laranjeira [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] ‘Valência’ infectadas pelo fungo *Colletotrichum acutatum* Simmonds. Eletromicrografias de varredura (A-C e J-M) e de transmissão (F-I) e fotomicrografias (D-E). A e D. Penetração intercelular. B e E. Penetração intracelular. C. Penetração via estômato. F. Crescimento intra-mural da hifa. G. Crescimento subcuticular e intercelular da hifa. H. Em células necrosadas colonizadas pelo fungo observa-se a liberação de vesículas (setas) opostas às áreas de parede celular com arranjo frouxo das microfibrilas de celulose (*). I. Acérvulo em desenvolvimento. O crescimento do estroma promove a hipertrofia celular e a expansão da cutícula. J. Hipertrofia da célula epidérmica. A seta indica início da emergência da hifa. K. Lise da parede periclinal externa (seta). L. Projeção dos conidióforos os quais produzem conídios. M. Cristais de oxalato de cálcio na base dos acérvulos. AC – acérvulo; AP – apressório; CG – Célula guarda do estômato; CF – Conidióforos; CO – Conídios; CT – cutícula; E – Epiderme; ES – Estroma; H – Hifa; ME – Mesófilo; PC – Paredes celulares; TU – Tubo germinativo

Figura 2- Pétalas de laranjeira [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] 'Valência' infectadas pelo fungo *Colletotrichum acutatum* Simmonds. Fotomicrografias (A-C) e eletromicrografias de transmissão (D-H). A. Acérvulo visualizado sob luz polarizada. Notar a lignificação da base dos estromas (setas). B. A distribuição dos acérvulos (pontas de seta) pode ocorrer em ambas as superfícies da pétala. Os conídios podem ficar depositados preferencialmente sobre a superfície abaxial (setas). C Hipertrofia das células do parênquima xilemático envolvendo grupos de elementos de vaso (setas) causam o afastamento dos mesmos. D. Célula do parênquima do xilema hipertrofiada apresentando hifa do fungo. E. Hifas no lume dos elementos de vaso. F. Hifa próxima a uma pontoação do xilema (seta). G-H. Hifas são observadas no interior de elementos de tubo crivado. H. Plasmodesmos (setas). AC – Acérvulo; CT – Cutícula; E – Epiderme; EV – Elementos de vaso; ES – Estroma; ETC – Elemento de tubo crivado; H – Hifa; PA – Parênquima xilemático; PAF – Parênquima floemático; PLC – Placa crivada

Estigma inoculado

Os estigmas coletados apresentaram lesões em sua superfície (Figura 3A-C). As lesões iniciaram-se como pontuações alaranjadas (Figura 3A) e assumiram aspecto necrótico a partir do quinto dia (Figura 3B). Na superfície do estigma lesionado foram observadas numerosas hifas (Figura 3C e G-I). Embora não tenha havido a penetração do fungo nas células epidérmicas do estigma, na presença do fungo tais células acumularam fenóis e, posteriormente necrosaram. Sob a área necrosada houve a instalação de uma camada de

proteção cujas células acumulavam compostos lipofílicos (Figura 3E) e fenólicos (Figura 3F). Também foi verificada a liberação de compostos protéicos das papilas, quando em contato com hifas do patógeno (Figura 3I). As hifas em contato com os compostos protéicos apresentaram alterações parietais (Figura 3G). Observou-se também a presença de cristais de oxalato de cálcio (Figura 3J-K) nas áreas onde o fungo estava presente. As respostas estruturais foram semelhantes em todos os períodos amostrados.

Folha Inoculada

O patógeno apresentou tubo germinativo desenvolvido na superfície adaxial das folhas 24 horas após a inoculação (Figura 4A). Após 48 horas, foram formados apressórios melanizados (Figura 4B) e após 96 e 120 horas houve aumento no comprimento dos tubos germinativos (Figuras 4C-D). As seções transversais das folhas com até cinco dias após a inoculação não revelaram a presença de estruturas do fungo no interior dos tecidos (Figura 4E). Foram observados apressórios junto às paredes anticlinais das células epidérmicas (Figura 4F).

Figura 3 – Estigmas de laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] ‘Valência’ infectados pelo fungo *Colletotrichum acutatum* Simmonds. Fotografias (A e B), eletromicrografias de varredura (C e J) e fotomicrografias (D-I, K). A-B. Lesões na superfície do estigma (setas) ao 3º e 5º dias após a inoculação, respectivamente. C. Hifas na superfície estigmática (seta). D. Seção transversal da lesão do estigma. Notar a necrose das papilas, a depressão na superfície (seta maior) e a camada de proteção (setas menores). E-F. A camada de proteção cora positivamente com Sudan black B (E) e reage com cloreto férrico (F). G-H. Hifas alteradas em contato com as papilas (setas). Observar a secreção corada com o Azul de Toluidina (pontas de seta em H) a qual reage positivamente com Xylidine Ponceau (setas em I). J-K. Presença de cristais de oxalato de cálcio sobre as células papilosas (setas) K. Análise sob luz polarizada. ES – Estigma; ET – Estilete; H – Hifas; OV – Ovário; PA – Papilas; TP – Tecido parenquimático

Figura 4 - Folhas de laranjeira [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] 'Valência' inoculadas com o fungo *Colletotrichum acutatum* Simmonds. A-D. Vista frontal. E-F. Seções transversais após 96 horas da inoculação. A. Conídio após 24 horas da inoculação iniciando a formação do tubo germinativo. B. Conídios germinados desenvolveram-se em apressórios melanizados após 48 horas. C-D. Observa-se um grande número de apressórios formados após 96 e 120 horas da inoculação, respectivamente. E. Conídio germinado com crescimento do tubo germinativo junto à cutícula. Notar a presença de idioblastos com cristais de oxalato de cálcio. F. Apressório latente formado entre as paredes anticlinais das células epidérmicas. AP – Apressórios; CO – Conídio; E – Epiderme; I – Idioblasto cristalífero; PP – Parênquima paliçádico; TG – Tubo germinativo

Discussão

A deposição dos conídios de *C. acutatum* nas pétalas foi observada com elevada frequência nas paredes anticlinais das células epidérmicas. É provável que esse padrão de deposição esteja relacionado à força gravitacional (BAILEY et al., 1992). A formação de apressórios esteve também frequentemente associada às paredes anticlinais, sugerindo tigmotropismo do tubo germinativo ou o favorecimento do local de deposição do apressório (STAPLES et al., 1985; READ et al., 1992). A penetração de *C. acutatum* ocorreu, na maioria das vezes, após formação de apressórios, embora já tenha sido observada a infecção do patógeno sem a formação dessas estruturas (ZULFIQAR et al., 1996). A penetração de

Colletotrichum spp. após a formação de apressórios nas paredes periclinais ou anticlinais das células epidérmicas foi também observada em antracnose dos citros, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (BROWN, 1975) e antracnose de morangueiro, causada por *C. acutatum* e *C. fragariae* (CURRY et al., 2002).

Após a penetração, *Colletotrichum acutatum* pode crescer de modo subcuticular nas paredes periclinais e anticlinais sem que ocorra a penetração da célula hospedeira, como observado por Bailey et al. (1992) em outras espécies de *Colletotrichum*. Segundo os autores, a dissolução da parede se dá com a degradação de pectina, pois as microfibrilas de celulose permanecem intactas.

A presença de hifas em todos os tecidos da pétala, bem como a necrose do tecido parenquimático é verificada em outros patossistemas, por exemplo, na antracnose do feijoeiro causada por *Colletotrichum lidemunthianum* (O'CONNELL et al., 1985; MERCER; WOOD; GREENWOOD, 1975) e na antracnose do morangueiro, causada por *C. fragariae* (MILHOLLAND, 1982). É provável que as vesículas produzidas nas células necrosadas colonizadas por *C. acutatum* estejam relacionadas com a alteração na parede celular. É interessante observar que o fungo *Colletotrichum lidemunthianum* na fase necrotrófica produz enzimas específicas que degradam as paredes celulares (CENTIS et al., 1997).

O processo de formação de acérvulos de *Colletotrichum acutatum* na epiderme das pétalas de laranjeira doce é similar ao descrito no patossistema envolvendo a infecção de *C. fragariae* em pecíolos e estolões de morangueiro (MILHOLLAND, 1982; CURRY et al., 2002).

Em relação aos tecidos vasculares, a presença de *C. acutatum* no tecido floemático também é observada em caules de *Pinus radiata* infectados com *C. acutatum* f. sp. pinea. (NAIR; COBIM, 1981). Em relação ao xilema, foram observadas hifas do fungo associadas aos elementos de vaso como descrito no patossistema *Colletotrichum fragariae* - pecíolos de morangueiro (MILHOLLAND, 1982).

No estabelecimento da fase biotrófica, em fungos hemibiotróficos, como na ferrugem causada por *Uromyces fabae*, é observada a presença de transportadores de hexoses na parede dos haustórios, os quais estariam realizando a absorção de açúcar para o fungo (VOEGEL et al., 2006). Os autores ainda sugerem que a infecção pelo patógeno possa funcionar com um novo dreno, capaz de competir nas relações fonte-dreno do hospedeiro. A observação de hifas do *C. acutatum* junto às pontoações dos elementos de vaso e no interior dos mesmos sugere que o fungo possa nutrir-se da seiva e atue como um dreno adicional para a planta.

As células papilosas da superfície estigmática infectada pelo *C. acutatum* produzem proteínas que podem estar relacionadas à resistência do tecido frente à presença do patógeno por alterar a parede celular das hifas. Segundo Van Loon; Rep; Pieterse 2006, proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-RP), liberadas tanto intra quanto extracelularmente, têm ação fungicida direta sobre as hifas invasoras, promovendo a hidrólise enzimática da parede fúngica.

A instalação da camada de suberização verificada na região lesionada do estigma no presente estudo é comumente observada em lesões causadas por fatores bióticos ou abióticos (PASCHOLATI et al., 1995). Também a presença de compostos fenólicos na referida camada pode estar diretamente associada à resistência a penetração do fungo como descrito em outros patossistemas (PASCHOLATI et al., 2008).

A presença de apressórios do fungo aderidos às paredes anticlinais entre duas células epidérmicas nas folhas e nas pétalas, também foi descrita em outros patossistemas envolvendo o fungo *Colletotrichum*, ou seja, em *C. musae* em frutos de banana (MUIRHEAD; DEVERAL, 1981) e em *C. gloesporioides* em frutos de laranja doce ‘Valência’ (BROWN, 1975). A ausência de penetração do fungo na folha pode estar relacionada à presença de cristais de oxalato de cálcio junto às células epidérmicas, tendo em vista que já foi descrita para cristais dessa natureza atividade antimicrobiana (CEITA et al., 2007).

Durante o período de ausência de flores, a sobrevivência do *Colletotrichum acutatum* em plantas de laranja ocorre na forma de apressórios presentes nas folhas, ramos ou cálices persistentes (PERES et al., 2005). De acordo com os autores, o fungo pode sobreviver na superfície daquelas estruturas vegetais por mais de um ano. Denhan; Waller (1981), ao investigar a interação de *Colletotrichum gloesporioides* com folhas de *Citrus sinensis* comentam que a capacidade de esporulação do fungo nas folhas indica que essa seja a fonte primária de conídios na planta. Embora essa fonte de inóculo, segundo os autores, seja menos patogênica do que as oriundas de flores infectadas. Os dados aqui apresentados corroboram as observações de Zulfiqar (1996) de que a sobrevivência de conídios de *Colletotrichum acutatum* pode ocorrer na forma de apressórios nas folhas de *Citrus sinensis*.

4.3 Considerações Finais

O *Colletotrichum acutatum* penetra nas pétalas principalmente entre as células epidérmicas, mas também pode haver penetração intracelular e via estômato. Além disso, o fungo pode crescer subcuticularmente e de modo intramural na epiderme. Após a penetração,

o *C. acutatum* coloniza todos os tecidos e associa-se intimamente com os tecidos vasculares. Embora o fungo cresça na superfície do estigma e da folha não se verifica a penetração do mesmo nessas estruturas. No estigma, há necrose das papilas na presença do fungo e ocorre a formação de uma camada de proteção que acumula compostos fenólicos e lipofílicos oposta ao setor necrosado.

Referências

- BAILEY, J.A.; O'CONNEL, R.J.; PRING, T.J.; NASH, C. Infection strategies in *Colletotrichum* species. In: JEGER, M.J.; BAILEY, J.A. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB, 1992. chap. 5, p. 88-120.
- BROWN, G.E. Factors affecting postharvest development of *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits. **Phytopathology**, Lancaster, v. 65, n. 4, p. 404-409, Apr. 1975.
- CEITA, G.O.; MACEDO, J.N.A.; SANTOS, T.B.; ALEMANN, L.; GESTERIA, A.; MICHELI, F.; MARIANO, A.C.; GRAMACHO, K.P.; SILVA, D.; MEINHARDT, L.; MAZZAFERA, P.; PEREIRA, G.A.G.; CASCARDO, J.C. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 173, n. 2, p. 106-117, 2007.
- CENTIS, S.; GUILLAS, I.; SÉJALON, N.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.; DUMAS, B. Endopolygalacturonase Genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: Cloning of CLPG2 and comparison of its expression to that of CLPG1 during saprophytic and parasitic growth of the Fungus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 10, p. 769-775, Aug. 1997.
- CHAMBERLAIN, C.J. **Methods in plant histology**. Chicago: The University of Chicago Press, 1932. 416 p.
- CORTELAZZO, A.L.; VIDAL, B.C. Soybean seed proteins: detection in situ and mobilization during germination. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 14, p. 27-33, 1991.
- CURRY, K.J.; ABRIL, M.; AVANT, J.B.; SMITH, B.J. Strawberry anthracnose: histopathology of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae*. **Phytopathology**, St Paul, v. 92, n. 10, p. 1055-1063, Oct. 2002.
- DE GOES, A.; KUPPER, K.C. Controle das doenças causadas por fungos e bactérias na cultura dos citros. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais - doenças e pragas**. Viçosa: Suprema Gráfica e Editora, 2002. p. 353-412.
- DIÉGUEZ-URIBEONDO, J.; FÖRSTER, H.; SOTO-ESTRADA, A.; ADASKAVEG, J.E. Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. **Phytopathology**, St. Paul, v. 95, n. 7, p. 751-758, July 2005.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPOSITO, M.B.; BELASQUE Jr., J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 239-269.

FRARE, G.F. **Sobrevivência *Colletotrichum acutatum* agente causal da podridão floral dos citros em planta daninhas**. 2012. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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, 1940. 523 p.

KAISER, E. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. **Botanisch Zentralb**, Stuttgart, v. 180, p. 25-26, 1880.

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.

LAPP, M.S.; SKOROPAD, W.P. Location of appressoria of *Colletotrichum graminicola* on natural and artificial barley leaf surfaces. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 70, n. 2, p. 225–228, Apr. 1978.

LIMA, W.G.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; DE FILHO, P.A.M. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.131, p. 157–165, 2011.

MCGOVERN, R.J.; SEIJO, T.E.; HENDRICKS, K.; ROBERTS, P.D. New report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing postbloom fruit drop on citrus in Bermuda. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, 2012. In press.

MENDGEN, K.; HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 8, p. 352-356, June 2002.

MERCER, P.C.; WOOD, R.K.S.; GREENWOOD, A.D. Ultrastructure of the parasitism of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 5, n.3, p. 203-314, Mar. 1975.

MILHOLLAND, R.D. Histopathology of strawberry infected with *Colletotrichum fragariae*, **Phytopathology**, Lancaster, v. 72, n. 11, p. 1434-1439, Nov. 1982.

MUIRHEAD, I.F.; DEVERALL, B.J. Role of appressoria in latent infection of banana fruits by *Colletotrichum musae*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 19, n.1, p. 77–84, July 1981.

NAIR, J.; CORBIN, J.P. Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. *pineae*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 71, n. 8, p. 777-783, Aug. 1981.

O'CONNELL, R.J.; BAILEY, J.A.; RICHMOND, D.V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, London, v. 27, n. 1, p. 75-98, July 1985.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-453.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQueiroz, 2008. 627 p.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry, theoretical and applied**. 3rd ed. London: Churchill, 1968. v. 1, 998 p.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 784-796, Aug. 2005.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREN, J.R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, n. 2-3, p. 186-198, July/Aug. 1999.

READ, N.D.; KELLOCK, L.J.; KNIGHT, H.; TREWAVAS, A.J. Contact sensism during infection by fungal pathogens. In: GALLOW, J.A.; GREEN, J.R. **Perspective in plant cell recognition**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. p. 137-172.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208-212, Apr. 1963.

RODRÍGUEZ-LÓPEZ, E.S.; GONZÁLEZ-PRIETO, J.M.; MAYEK-PÉREZ, N. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): aspectos bioquímicos y genéticos. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Chapingo, v. 7, n. 1, p. 53-63, 2008.

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

STAPLES, R.C.; HOCH, H.C.; EPSTEIN, L.; LACCETTI, L.; HASSOUNA, S. Recognition of host morphology by rust: responses and mechanisms. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 7, p. 314-322, 1985.

TIMMER, L.W. Postbloom fruit drop of citrus – symptom disease cycle and control. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, v. 106, p. 102-105, 1993.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo alto, v. 44, p.135–162, Apr. 2006.

VERHOEFF, K. Latent infections in fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 99-110, Apr. 1974.

VOEGEL, R.T.; STRUCK, C.; HAHN, M.; MENDGEN, K. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 8133-8138, 2006

WHARTON, P.; DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Annales del Jardín Botánico de Madrid**, Madrid, v. 61, n.1, p. 3-22, 2004.

YAKOBY, N.; FREEMAN, S.; DINOOR, A. KEEN, N. T.; PRUSKY, C.D. Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* promotes pathogenicity. **Molecular Plant -Microbe Interactions**, St Paul, v. 13, n. 8, p. 887–891, 2000.

YOSHIDA, S.; TSUKIBOSHV, T. Shoot blight and leaf spot of blueberry anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum*. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v.68, n.3, p. 246-248, 2002.

ZULFIQAR, M.; BRLANSKY, R.H.; TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, Lancaster, v. 88, n. 1, p. 121-128, Jan/Feb. 1996.

5 INFECÇÃO DE GRÃOS DE PÓLEN DE CITROS POR *Colletotrichum acutatum*

Resumo

A podridão floral dos citros (PFC), causada por *Colletotrichum acutatum*, é uma importante doença que afeta a produção de laranja em pomares de citros no Brasil. Os sintomas de PFC são caracterizados por lesões necróticas nas pétalas e em estigmas de flores de citros e consequente queda prematura do fruto jovem. O objetivo deste estudo foi verificar sob microscopia de luz e eletrônica se os grãos de pólen de *Citrus sinensis* podem ser colonizados pelo *Colletotrichum acutatum*. Verificou-se que os fungos podem penetrar e colonizar os grãos de pólen de citros 24h após a inoculação do patógeno. O tubo germinativo penetra na esporoderme do grão de pólen diretamente ou através das aberturas polínicas. Uma mesma hifa pode colonizar mais do que um grão de pólen. Na superfície do estigma pode ser observada a formação de conídios. Este estudo mostra que os grãos de pólen de *Citrus sinensis* podem, de fato, desempenhar um papel na dispersão de *C. acutatum* em pomares de citros.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*; Grãos de pólen; Podridão floral dos citros

Abstract

Postbloom fruit drop (PFD), an important disease caused by *Colletotrichum* spp., affects citrus yields in Brazil. PFD is characterised by the presence of necrotic lesions on the petals and stigmas of citrus flowers and by the subsequent fall of young fruit. PFD epidemics present high disease progress rates, which is unusual for a pathogen that produces acervulus and is dispersed by rain. It is possible that other dispersal agents, such as insects and pollen grains, are involved in the spread of this disease. The objective of this work was to test whether citrus pollen grains can be colonised by *Colletotrichum acutatum*. Studies using light and electron microscopy showed that the pollen grains of *Citrus sinensis* can be infected by *C. acutatum*. This pathogen can penetrate and colonise citrus pollen grains 24 h after inoculation with the pathogen. The germ tube of spores either penetrates the pollen sporodermis directly or passes through pollen germ pores. A single hypha can colonise more than one pollen grain. On the surface of the stigma, conidium formation can be observed. This study shows that *Citrus sinensis* pollen grains may, in fact, play a role in the spread of *C. acutatum* in citrus orchards.

Keywords: *Citrus sinensis*; Pollen grains; Postbloom fruit drop

5.1 Introdução

A Podridão Floral dos Citros (PFD) causa sérios prejuízos econômicos quando os períodos chuvosos coincidem com o período de floração dos citros (FEICHTENBERGER, 2005). No Brasil, esta doença é causada pelos fungos *Colletotrichum acutatum* (JH Simmonds) e *C. gloeosporioides* (LIMA et al., 2011). Porém, a incidência de *C. gloeosporioides* ainda está restrita a 10-15% das flores sintomáticas. Os sintomas podem ocorrer em pétalas de flores e no estigma. Lesões de tonalidade laranja-avermelhada para o

marrom alaranjado formam-se nas pétalas de flores infectadas onde o fungo produz conídios a partir de acérvulos (TIMMER, 1999). No estigma da flor e no estilete, o fungo produz necrose progressiva e o estigma inteiro e a zona distal do estilete torna-se castanho escuro (LIN et al., 2001). Posteriormente, os frutos em desenvolvimento caem e os cálices permanecem retidos na planta (TIMMER, 1999).

A PFC possui taxa de disseminação elevada entre as árvores quando a chuva, com prolongado período de molhamento, ocorre durante o florescimento (DENHAM; WALLER, 1981). No entanto, o padrão espacial das árvores sintomáticas nem sempre mostra um claro foco primário de doença com gradiente de alta inclinação (AGOSTINI et al., 1993). Ao invés disso, algumas vezes focos secundários formam-se no início da epidemia, indicando que o patógeno pode ser disperso a longas distâncias (AGOSTINI et al., 1993). Não se sabe ainda se a chuva associada a ventos fortes, ou agentes de dispersão, tais como insetos, também são responsáveis pela disseminação do *Colletotrichum acutatum* a longas distâncias (AGOSTINI et al., 1993).

A transmissão de vírus de uma planta para outra por meio de grãos de pólen é bem conhecida (AGRIOS, 2008; CARD et al., 2007). No entanto, apenas alguns estudos relatam a interação de estruturas fúngicas e grãos de pólen, por exemplo, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium albo-atrum* podem ser observados no interior de grãos de pólen de alfafa (*Medicago sativa* L.) e de canola (*Brassica napus* L.) (HUANG; KOKKO, 1985; HUANG et al., 1997, 1998), *Verticillium dahliae* em grãos de pólen de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (MA et al., 2000) e *Coniothyrium minitans* e *Gliocladium catenulatum* em grãos de pólen de alfafa (HUANG-CHANG et al., 2003). Exsudatos provenientes dos grãos de pólen podem estimular a germinação de esporos e, ou o crescimento de hifas de fungos (OLIVIER, 1978). Os grãos de pólen são ricos em aminoácidos essenciais, açúcares, proteínas e lipídios que podem ser considerados uma fonte importante de nutrientes para os fungos (KNOX; HESLOP-HARRISON, 1970; YAMAKAWA, 1984).

Visto que os grãos de pólen são transportados por agentes polinizadores, a infecção dos grãos de pólen por fungos sugere que tais estruturas podem servir como fonte de inóculo para a doença (STELFOX, 1978; HUANG et al., 1997). Este trabalho investigou a interação direta entre o *Colletotrichum acutatum* e grãos de pólen de *Citrus sinensis* após a inoculação do estigma e de grãos de pólen.

5.2 Desenvolvimento

Material e métodos

Preparo do inóculo

O isolado de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, 142a, caracterizado como patogênico para flores de citros, foi utilizado em todos os experimentos. O isolado foi cultivado em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) por 14 - 21 dias a 25 °C e período de 14h de luz seguido por 10h de escuro.

Inoculação de estigmas

Plantas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. 'Valência' com quatro anos de idade, cultivadas em vasos, foram mantidas em casa de vegetação. As plantas foram submetidas a estresse hídrico e poda, para promover o florescimento. A inoculação foi realizada durante a antese, depositando 20µl de suspensão de conídios ($4,7 \times 10^5$ conídios por ml de água) em cada estigma. Catorze estigmas foram inoculados com o patógeno. Como controle, seis estigmas de diferentes plantas foram inoculados com água destilada estéril. A câmara úmida foi construída cobrindo-se as plantas com sacos plásticos (15 x 20 mm) por um período de 24 horas.

Inoculação de grãos de pólen

Dois experimentos foram realizados para a inoculação *in vitro* dos grãos de pólen. No primeiro experimento, anteras foram coletadas e colocadas em um tubo de Eppendorf com água destilada. Após agitação manual, 2 ml da suspensão de grãos de pólen foi coletada e colocada em quatro lâminas de vidro escavadas. Nas mesmas lâminas, foi adicionada uma suspensão de conídios *C. acutatum* ($2,3 \times 10^5$ conídios ml⁻¹). O crescimento dos fungos foi observado a 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a inoculação. No segundo experimento, as anteras foram coletadas e colocadas em um tubo de Eppendorf com 1,5 ml de água destilada e, após quatro horas, os grãos de pólen germinados foram coletados e inoculados seguindo os mesmos procedimentos do primeiro experimento.

Como controle, pólen e conídios foram adicionados separadamente a seis lâminas de vidro escavadas para a visualização da germinação e desenvolvimento dos mesmos.

Microscopia de Luz

Estigmas com e sem lesões foram coletados e seccionados longitudinalmente. Em seguida, foram fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965; modificado com tampão fosfato pH 7,2), durante 24 h. As amostras foram submetidas a uma bomba de vácuo. Após a fixação, as amostras foram desidratadas em série etílica e embebidas em Leica Histoiresin[®] (Heraeus Kulzer, Hanau, Alemanha). Secções seriadas de 5 μ m de espessura foram feitas em micrótomo rotativo (modelo RM2245, Leica), coradas com azul de toluidina O (SAKAI, 1973), e montadas em resina sintética Entellan[®] (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os grãos de amido foram detectados usando cloreto de zinco iodado (STRASBURGER, 1913).

As imagens foram digitalmente capturadas com microscópio DMLB Leica (LeicaTM - Wetzlar, Alemanha) com câmera de vídeo acoplada a um computador e utilizando o software IM50 (LeicaTM - Wetzlar, Alemanha).

Microscopia Eletrônica de Varredura

Estigmas lesionados foram coletados, seccionados transversalmente e fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) modificada (acima descrita) durante 24 h. Posteriormente, os estigmas foram desidratados em série etílica e submetidos ao ponto crítico de CO₂ (HORRIDGE; TAMM, 1969). As amostras foram aderidas a suportes de alumínio e recobertas com ouro (30-40 nm). As observações e as eletromicrografias foram feitas ao microscópio eletrônico de varredura VP435 LEO (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) operado a 20 kV, com as escalas impressas diretamente nas mesmas.

Resultados

Nos estigmas inoculados, as lesões iniciaram-se como pontuações laranja que tenderam a exibir aspecto necrótico com quatro dias ou mais. A mudança estrutural observada e descrita foi semelhante, independentemente da aparência das lesões.

Os grãos de pólen foram infectados por hifas do patógeno (Figuras 1A-M). As hifas penetraram tanto diretamente na esporoderme (Figuras 1B-C) quanto através das aberturas

polínicas (Figuras 1D-E). Os grãos de pólen infectados não apresentaram amido (Figura 1E). A formação de apressórios não foi observada. Após a penetração do *C. acutatum*, verificou-se crescimento da hifa junto à esporoderme (Figura 1F). A formação de conídios também foi observada sobre os grãos de pólen (Figura 1G).

Em meio aquoso, os conídios germinam em 10 horas. O crescimento dos tubos germinativos foi lento e restrito aos conídios. Não houve desenvolvimento de apressórios. A adição de grãos de pólen à suspensão de conídios de *Colletotrichum acutatum* estimulou a germinação dos esporos, o crescimento dos tubos germinativos e a infecção do pólen.

O fungo germinaram seis horas após a inoculação sobre os grãos de pólen. Após 12 horas, um grande número de tubos geminativos cresceu em direção aos grãos de pólen (Figura 1H). Após 24 horas, os grãos de pólen já estavam infectados (Figuras 1I-K). Em alguns casos, o inchaço no ápice das hifas ocorreu nas áreas de contato com os grãos de pólen; no entanto, a formação de apressórios melanizados não foi verificada (Figura 1J). Os grãos de pólen puderam ser infectados por mais de um tubo germinativo (Figura 1K). Após colonizar um grão de pólen, os fungos puderam crescer em meio aquoso e promover a infecção de outros grãos de pólen (Figura 1L).

Não houve a infecção dos tubos polínicos quando a inoculação foi feita em grãos de pólen germinados (Figura 1M).

Figura 1 - Eletromicrografias (A,B,D,G) e fotomicrografias (C,E,F,H-M) dos grãos de pólen de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 'Valência' infectados com *Colletotrichum acutatum*. H-M. Inoculação *in vitro* dos grãos de pólen. A. Hifas estão infectando grãos de pólen na superfície do estigma três dias após a inoculação (setas). B-C. Penetração direta da hifa através da esporoderme (seta). B. A hifa penetra através do apocolpo (seta) D-E. Penetração através das aberturas polínicas. D. A extremidade da hifa está em contato com as aberturas polínicas (seta). E. Reação negativa do cloreto de zinco iodado indicando ausência de amido no interior do grão de pólen infectado. F. Pólen colonizado. O fungo entra através (seta) e cresce junto da esporoderme (ponta de seta). G. Formação dos conídios (*) sobre os grãos de pólen. H-K. 24 h após a inoculação. H. Verificar o tropismo positivo dos tubos germinativos em direção aos grãos de pólen. I-J. Grãos de pólen infectados. Verificar em J que a extremidade dos tubos germinativos está expandida (seta). K. O grão de pólen pode ser infectado por mais de um conídio. L. A hifa após 72 horas da inoculação pode infectar dois ou mais grãos de pólen. M. A hifa não penetra os tubos polínicos dos grãos de pólen germinados. AP – Aberturas polínicas; CO – Conídio; ES – Esporoderme; H – Hifa; PO – Grãos de pólen; TG – Tubo germinativo; TP – Tubo polínico

Discussão

O presente estudo mostra que grãos de pólen *Citrus sinensis* é um hábitat adequado para o *Colletotrichum acutatum*, visto que pode ser facilmente colonizado por este patógeno. Além disso, a infecção dos grãos de pólen por *C. acutatum* possui importância epidemiológica no patossistema PFC. A presença de fungos nos grãos de pólen pode favorecer a dispersão da doença (HUANG; KOKKO, 1985). O papel de grãos de pólen na propagação de fungos pode aumentar a patogenicidade e severidade de doenças de plantas como apresentado anteriormente por Chou e Preece (1968).

Colletotrichum acutatum pode penetrar tanto diretamente quanto através das aberturas polínicas. Fato semelhante foi observado em outros patossistemas envolvendo *Sclerotinia sclerotiorum* e *Verticillium albo-atrum* em grãos de pólen de alfafa (*Medicago sativa* L.) (HUANG; KOKKO, 1985). Os autores sugerem que a degradação da esporoderme possa estar relacionada com a liberação de enzimas pelos fungos na região da penetração. No entanto, não é descartado o uso de forças mecânicas durante o processo de infecção dos grãos de pólen.

O crescimento dos tubos germinativos de *C. acutatum* em direção aos grãos de pólen de *C. sinensis* indica um possível tropismo. Os grãos de pólen são nutricionalmente ricos e representam uma importante fonte de alimento para fungos (KNOX; HESLOP-HARRISON, 1970; SUTTON; DEVERALL, 1983; YAMAKAWA, 1984). O desenvolvimento de tubos germinativos em direção aos grãos de pólen pode estar relacionado ao crescimento em direção a uma fonte de alimento. De acordo com Olivier (1978), os nutrientes podem ser lixiviados para fora dos grãos de pólen quando eles são submetidos ao molhamento. Substâncias liberadas pelos grãos de pólen parecem atrair fungos, agindo como sinal quimiotrópico. Este fenômeno já foi observado em outros patossistemas (HUANG et al., 1998). O quimiotropismo já foi observado em algumas espécies de *Colletotrichum* sp, incluindo *C. acutatum* (PODILA; ROGERS; KOLATTUKUDY, 1993; PARBERRY; BLACKMAN, 1978). O crescimento de *C. acutatum* em direção aos grãos de pólen deve ser interpretado como um comportamento quimiotrópico.

Todos os grãos de pólen infectados com *C. acutatum* eram desprovidos de amido. Sabe-se que os fungos do gênero *Colletotrichum* sp. podem produzir enzimas que degradam o amido, tais como α -amilase e glucoamilase (KRAUSE et al., 1991). Sugere-se que o *C. acutatum* possa produzir estas enzimas dentro dos grãos de pólen, promovendo a degradação do amido e subsequente liberação de açúcares para o fungo.

Colletotrichum acutatum é disperso através de gotas de chuva de pétalas infectadas para outras partes da planta (PERES et al., 2005). Peña e Duncan (1989) sugerem que os artrópodes podem desempenhar um papel na dispersão PFC. Os autores observaram que o fungo *Colletotrichum gloesporioides* pode ser transportado por abelhas (*Apis mellifera* L.).

Vários insetos polinizadores, incluindo *Megachile rotundata* Fabricius (HUANG et al., 1986) e abelhas (STELFOX et al., 1978), podem espalhar agentes patogênicos através dos grãos de pólen infectados, promovendo a dispersão da doença. As duas principais espécies de abelhas que visitam as flores de laranjeira são *Apis mellifera* e *Trigona spinipes* (MALERBO et al., 2004). Considera-se que ambas as espécies desempenham função importante na dispersão de fungos (SHAW, 1999).

O presente estudo sugere que grãos de pólen de *Citrus sinensis* são suscetíveis à infecção por *Colletotrichum acutatum*. Este fato leva a formação de dois questionamentos: primeiro, se as estruturas do *C. acutatum* podem inocular os grãos de pólen de *C. sinensis* e assim promover a disseminação do patógeno; e segunda, se os insetos polinizadores poderiam dispersar o fungo entre as plantas e pomares transportando grãos de pólen infectados. Estudos epidemiológicos da propagação da doença PFC por meio de grãos de pólen poderão fornecer novas idéias sobre a disseminação da doença entre diferentes pomares de *Citrus* sp..

5.3 Considerações Finais

O fungo *Colletotrichum acutatum* infecta grãos de pólen de *Citrus sinensis*, penetrando através da esporoderme ou pelas aberturas polínicas. Há indícios de que o fungo possa produzir enzimas que degradam grãos de amido no interior dos grãos de pólen. A infecção dos grãos de pólen pelo *C. acutatum* indica que esta estrutura serve de fonte de inóculo e pode ter um papel importante na disseminação da doença.

Referências

- AGOSTINI, J.P.; GOTTWALD, T.R.; TIMMER, L.W. Temporal and spatial dynamics of postbloom fruit drop of citrus in Florida, Lancaster, **Phytopathology**, Lancaster, v. 83, n. 5, p. 485-490, May 1993.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. San Diego: Academic Press. 2008. 922 p.
- CARD, S.D.; PEARSON, M.N.; CLOVER, G.R.G. Plant pathogens transmitted by pollen. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 36, p. 455-461, June 2007.

CHOU, C.M.; PREECE, T.F. The effect of pollen grains on infections caused by *Botrytis cinerea* Fr. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 62, n.1, p. 11-22, Aug. 1968.

DENHAM, T.G.; WALLER, J.M. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 98, n.1, p. 65-77, 1981.

FEICHTENBERGER, E.; BASSANEZI, R.B.; SPOSITO, M.B.; BELASQUE Jr., J. Doenças dos citros (*Citrus* spp.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 239-269.

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

HUANG, H.C.; KOKKO, E.G. Infection of alfafa pollen by *Verticillium albo-atrum*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 75, n. 7, p. 859-865, July 1985.

HUANG, H.C.; KOKKO, E.G.; ERICKSON, R.S. Infection of alfalfa pollen by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 25, n. 1, p. 17-24, Mar.1997.

HUANG, H.C.; RICHARDS, K.W.; KOKKO, E.G. Role of leafcutter bee in dissemination of *Verticillium albo-atrum* in alfafa. **Phytopathology**, Lancaster, v. 76, n. 1, p. 75-79, Jan. 1986.

HUANG, H.C.; KOKKO, E.G.; ERICKSON, R.S.; HYNES, R.K. Infection of canola pollen by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology Bulletin**, Washington, v. 7, p. 71-77, 1998

HUANG-CHANG, H.C; KOKKO, E.G.; WHEN, H.J. Infection of alfafa (*Medicago sativa* L.) pollen by mycioarasitic fungi *Coniothyrium minitana* Campell and *Gliocladium catenulatum* Gilmn and Abbott. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, Chapingo, v. 21, n. 2, p. 117-122, 2003.

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.

KNOX, R.B.; HESLOP-HARRISON, J. Pollen-wall proteins: Localization and enzymic activity. **Journal of Cell Science**, London, v. 6, p. 1-27, 1970.

KRAUSE, D.R.; WOOD, C.J.; MACLEAN, D.J. Glucoamylase (exo-1,4- α -glucanoglucohydrolase, EC 3.2.1.3) is the major starch-degrading enzyme secreted by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 137, p. 2463-2468, 1991

LIN, Y.J., STOVER, E., SONODA, R.; ROSSKOPF, E. Stigma and style necrosis is associated with postbloom fruit drop disease in citrus following artificial inoculation. **Hortscience**, St. Joseph, v. 36, p. 1138, 2001

LIMA, W.G.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; DE FILHO, P.A.M. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, p. 157-165, 2011.

- MA, P.; HUANG, H.C.; KOKKO, E.G.; TANG, W.H. Infection of cotton pollen by *Verticillium dahlia*. **Plant Pathology Bulletin**, Washington, v. 9, p. 93-98, 2000.
- MALERBO, D.T.S.; NOGUEIRA-COUTO, R.H.; COUTO, L.A. Honey bee attractants and pollination in sweet orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, var. PERA-RIO. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 20, p. 144-153, 2004.
- OLIVIER, R.L. *Retiarius* gen. nov.: phyllosphere fungi which capture wind-borne pollen grains. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 71, p. 93-201, 1978.
- PARBERRY D.G.; BLAKEMAN, J.P. Effect of substances associated with leaf surfaces on appressorium formation by *Colletotrichum acutatum*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 70, n. 1, p. 7-19, Jan. 1978.
- PEÑA, J.E.; DUNCAN, R. Role of arthropods in the transmission of post bloom fruit drop. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, v. 102, p. 249-251, 1989.
- PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, p. 784-796, Aug. 2005.
- PODILA, G.K.; ROGERS, L.M.; KOLATTUKUDY, P.E. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 267-272, 1993.
- SAKAI, W.S. Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue O. **Stain Technology**, Baltimore, v. 48, p. 247-249, 1973.
- SHAW, D.E. Bees and fungi with special reference to certain plant pathogens. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 28, p. 269-282, 1999.
- STELFOX, D.; WILLIAMS, J.R.; SOEHNGEN, U.; TOPPING, R.C. Transport of *Sclerotinia sclerotiorum* ascospores in rapeseed pollen in Alberta. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 62, p. 576-579, 1978.
- STRASBURGER, E. **Handbook of practical botany**. London: George Allen, 1913. 118 p.
- SUTTON, D.C., AND DEVERALL, B.J. Studies on infection of bean (*Phaseolus vulgaris*) and soybean (*Glycine max*) by ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Pathology**, London, v. 32, n.3, p. 251-261, Sept. 1983.
- TIMMER, L.W. Diseases of fruit foliage. In: TIMMER, L.W.; DUNCAN, L.W. (Ed.). **Citrus health management**. St. Paul: APS Press, 1999. chap 10, p. 107-115.
- YAMAKAWA, T. The effect of pollen on the infection of fruit vegetables with conidia of *Botrytis cinerea*. **Proceedings of Kansas Plant Protection Society**, Kansas, v. 26, p. 1-8, 1984.

6 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS NA EPIDERME DE PÉTALAS DE LARANJEIRA DOCE INFECTADAS PELO *Colletotrichum acutatum*

Resumo

Podridão floral dos citros, importante doença causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum*, caracteriza-se pela formação de lesões necróticas nas pétalas e nos estigmas de flores de citros, bem como pela abscisão prematura dos frutos. O objetivo deste trabalho foi comparar a ultraestrutura da epiderme de pétalas inoculadas e não inoculadas com o fungo visando compreender as alterações decorrentes da infecção causada pelo *C. acutatum*. A pétala sadia apresenta cutícula com estrias paralelas recobrimdo a epiderme uniestratificada. Esta é provida de células vacuoladas cujo citoplasma parietal apresenta mitocôndrias, plastídios com sistema de endomembranas pouco desenvolvido e estroma pouco denso, retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido, polissomos, poucas gotas lipídicas e núcleo posicionado próximo à parede periclinal interna. A cutícula das células epidérmicas infectadas é bastante alterada nos estágios mais avançados da infecção, ou seja, não são mais observadas as cristas devido à deposição de novas camadas cuticulares em placas. A parede periclinal externa pode espessar. Diferentemente das regiões sadias, nas regiões lesionadas algumas células apresentam citoplasma denso com retículo endoplasmático liso e rugoso muito desenvolvido, os dictiossomos são abundantes e hiperativos, há numerosas mitocôndrias e muitas gotas lipídicas. Os plastídios apresentam estroma elétron-denso, grãos de amido e uma grande quantidade de gotas lipídicas elétron-densas, as quais podem ser liberadas nos vacúolos ou em direção ao retículo endoplasmático. As vesículas provenientes do Golgi podem ser liberadas para o espaço periplasmático via membrana plasmática ou podem se agrupar e formar corpos multivesiculares. Esses últimos podem ser observados no interior do vacúolo, no citoplasma e também se fundindo à membrana plasmática para liberar as vesículas. Corpos de mielina também são observados no vacúolo ou espaço periplasmático. As vesículas migram através da parede celular e estão relacionadas com a deposição de material cuticular. Os resultados observados neste trabalho indicam que as células epidérmicas da pétala respondem à presença do patógeno, promovendo alterações parietais e cuticulares, as quais podem restringir novas infecções.

Palavras-chave: *Citrus sinensis*; Cutícula; Corpos multivesiculares; Plastídios; Podridão floral dos citros; Retículo endoplasmático.

Abstract

Postbloom fruit drop, an important disease caused by *Colletotrichum acutatum*, is characterised by the presence of necrotic lesions on the petals and stigmas of citrus flowers and by the subsequent fall of young fruit. The objective of this study was to compare the ultrastructure of the epidermis of petals inoculated or not with the fungus in order to understand the changes caused by the *C. acutatum* infection. The cuticle of healthy petal shows parallel striae covering the unestratified epidermis. This is provided with vacuolated cells whose parietal cytoplasm shows mitochondria, plastids, poorly developed rough endoplasmic reticulum, polysomes, few lipid droplets and nuclei positioned near the inner periclinal wall. The cuticle on the epidermal cells is significantly altered in the later stages of infection, or the ornamentation is no longer observed due to the deposition of new layers of cuticular plates. The outer periclinal walls can become thickened. Unlike the healthy regions, some cells of the infected region have dense cytoplasm with rough and smooth endoplasmic

reticulum highly developed, the dictyosomes are hyperactive and there are many mitochondria and many lipid droplets. The plastids exhibit electron-dense stroma, starch grains and a large amount of electron-dense lipid droplets, which can be released into vacuoles or toward the endoplasmic reticulum. Golgi-derived vesicles can be released into the periplasmic space through the plasma membrane or can be grouped to form multivesicular bodies. The multivesicular bodies can be observed into the vacuole, in the cytoplasm and fusing with the plasma membrane to release the vesicles. The vesicles migrate through the periclinal cell wall and are related to the deposition of material in the cuticle. The results of this study indicate that epidermal cells of the petals respond to the presence of the pathogen, by promoting parietal and cuticular changes, which may restrict new infections.

Keywords: *Citrus sinensis*; Cuticle; Endoplasmic reticulum; Multivesicular bodies; Plastids; Postboom fruit drop

6.1 Introdução

A podridão floral dos citros é uma das mais importantes doenças que afetam os pomares cítricos no estado de São Paulo. Essa enfermidade é causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* (PERES et al., 2005) e pelo fungo *C. gloesporioides* (LIMA et al., 2011). A doença causa lesões alaranjadas nas pétalas, lesões necróticas nos estigmas e promove a queda prematura dos frutos (LIN et al., 2001; PERES et al., 2005).

Tem sido demonstrado há muito tempo que a cutícula das plantas é reconhecida como a primeira barreira física/estrutural a ser ultrapassada pelos fungos durante o processo de infecção (GEVENS; NICHOLSON, 2000; PASCHOLATI; LEITE, 1995). A cutícula é constituída por ceras complexas, por uma camada cuticularizada de cutina incrustada com pectina e hemicelulose e de uma camada cutinizada formada por uma camada mais ou menos pura de cutina (MARTIN; JUNIPER, 1970). A cutícula também pode apresentar compostos de baixo peso molecular como fenilpropanóides e flavonóides (GEVENS; NICHOLSON, 2000).

A cutícula não deve ser considerada como simples barreira estrutural, mas sim como uma camada capaz de alterar química e estruturalmente durante o tempo, influenciando positiva ou negativamente o processo de infecção (GEVENS; NICHOLSON, 2000; CHASSOT; NAWRATH; MÉTRAUX, 2008). Durante este processo, a cutícula pode atuar inviabilizando as etapas de adesão e penetração por meio de alterações estruturais, como o aumento de espessura, ou da composição química, a qual pode conter substâncias tóxicas aos fungos (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Além disso, a cutícula é composta por material hidrofóbico, o qual previne o acúmulo de água na superfície do órgão. Essa característica leva à diminuição da umidade e dos

nutrientes disponíveis ao patógeno, o que pode alterar o curso da infecção durante a interação hospedeiro-patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1995; RIEDER, 2006).

Fungos do gênero *Colletotrichum* podem penetrar através de aberturas naturais, ferimentos e diretamente na cutícula com a formação de um apressório. Há três mecanismos de penetração do fungo envolvendo a formação de apressórios: processo químico, no qual há liberação de enzimas que degradam a cutina; processo físico, baseado na força mecânica (pressão de turgor) ou a combinação dos dois processos (BAILEY et al., 1992).

A indução de apressórios está relacionada ao reconhecimento de sinais topográficos e sinais não topográficos (READ et al., 1992). A topografia da superfície é constituída por elevações e por sulcos (READ et al., 1992). A indução de apressórios com sinais de contato não topográficos é relacionada à percepção de dureza e hidrofobicidade da cutícula. Estas características cuticulares refletem no processo de adesão (READ et al., 1992). A composição da cutícula, em especial, das ceras epicuticulares, é específica para cada espécie e influencia diretamente a germinação dos conídios e diferenciação de apressórios (PODILA; ROGERS, KOLATTUKUDY, 1993).

Este trabalho tem por objetivo comparar a ultraestrutura da epiderme de pétalas de *Citrus sinensis* ‘Valência’ inoculadas e não inoculadas com o fungo *Colletotrichum acutatum* visando compreender as alterações decorrentes da infecção.

6.2 Desenvolvimento

Material e método

Material vegetal

Plantas de laranjeira doce ‘Valência’ [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cultivadas em vasos mantidos em estufas no FUNDECITRUS (Fundo de Defesa da Citricultura), situado em Araraquara - SP, Brasil, foram induzidas ao florescimento, mediante podas e restrição hídrica. As pétalas de flores foram coletadas logo após antese.

Inoculação

Os isolados do *Colletotrichum acutatum* 142a, disponível no FUNDECITRUS foram crescidos em meio BDA (Batata, Dextrose e Agar) por 12 a 21 dias a 25°C num regime de 14h de luz e 10h de escuro. A suspensão dos conídios usada na inoculação foi preparada por

diluição da colônia com água estéril deionizada e raspando a superfície de Agar com auxílio de uma alça de Drigalski para a remoção dos conídios. A suspensão foi diluída com água destilada até atingir a concentração de 5×10^5 conídios por ml.

A inoculação foi realizada com auxílio de uma micropipeta, adicionando gotas às regiões das pétalas previamente demarcadas com caneta à prova de água. Foram inoculadas 30 pétalas de flores provenientes de dez plantas mantidas em casa de vegetação. Como controle, foram inoculadas 10 pétalas com água destilada seguindo o mesmo procedimento descrito acima. Foram feitas câmaras úmidas com período de 24 horas de molhamento. As coletas das amostras foram feitas com 3-5 dias após a inoculação.

Análises ao microscópio de luz

As amostras de pétalas inoculadas com água (controle) e com o fungo foram fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965; modificado com tampão fosfato pH 7,2). Durante a fixação as amostras foram colocadas numa bomba de vácuo para a retirada do ar. Seguiu-se a desidratação em série etílica e a infiltração em resina plástica (Leica Historesin®, Heraeus Kulzer, Hanau, Germany). Os blocos foram seccionados a 5 - 7 μ m de espessura em micrótomo rotatório Leica RM 2045. Para a identificação dos compostos pécnicos e lipofílicos foram empregados o reagente vermelho de rutênio (CHAMBERLAIN, 1932) e o corante Sudan IV (PEARSE, 1968). As lâminas foram montadas em água destilada e, em seguida, analisadas ao microscópio Leica DMLD.

Análises ao microscópio eletrônico de varredura (MEV)

Pétalas com e sem lesões foram coletadas, seccionadas longitudinalmente e em seguida fixadas em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965; modificado com tampão fosfato pH 7,2), desidratadas em série etílica (10, 30, 50, 70, 90 e 100%), secas ao método do ponto crítico de CO₂ (HORRIDGE; TAMM, 1969), montadas em suportes de alumínio sobre fitas de carbono dupla face e recobertas com uma camada de ouro de 30 a 40 nm. As observações e as eletromicrografias foram feitas ao microscópio eletrônico de varredura modelo LEO VP 435, operado a 20 kV. As escalas das eletromicrografias foram diretamente impressas nas mesmas.

Análises ao microscópio eletrônico de transmissão (MET)

As amostras de pétalas com e sem lesões foram coletadas e imediatamente fixadas em glutaraldeído 3% e tampão cacodilato de sódio 0,2M pH 7,25. Retirou-se o ar das amostras por 5 minutos. Foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. As amostras foram desidratadas em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e então infiltradas em resina Spurr. Os blocos foram seccionados no ultramicrotomo Leica UC6 e as seções contrastadas com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo a 2% por trinta minutos em cada etapa (REYNOLDS, 1963). As análises foram realizadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips CM100, operado a 80 kV. As escalas das eletromicrografias foram diretamente impressas nas mesmas.

Resultados

Pétala sadia

A pétala sadia possui epiderme uniestratificada recoberta pela cutícula estriada (Figura 1A-B). Na área da estria é possível verificar a projeção da parede celular e a presença de fibrilas polissacarídicas (Figura 1C). A topografia é bastante irregular, pois as células epidérmicas apresentam alturas distintas (Figura 1D), algumas delas possuem papilossidade discreta e outras não. As células são vacuoladas e o citoplasma parietal (Figura 1D) apresenta mitocôndrias, polissomos (Figura 1E), retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvido (Figura 1E) e núcleo posicionado próximo à parede periclinal interna. Os plastídios possuem formatos variados, sistema de endomembranas pouco desenvolvido e ausência de inclusões osmiofílicas e de grãos de amido no estroma (Figura 1F).

Pétala Lesionada

Nas áreas lesionadas e nas suas adjacências há alterações na cutícula (Figuras 2A-C). Observa-se que o padrão estriado de ornamentação (Figura 2A) é substituído pela deposição de placas (Figuras 2C).

No início da lesão as células epidérmicas apresentam maior quantidade de gotas de óleo (Figura 2D). Compostos de natureza lipofílica, com a mesma elétrondensidade das gotas de óleo, são observados entre as estrias da cutícula (Figura 2E). A parede periclinal externa

torna-se mais espessa e apresenta aspecto lamelar (Figura 2E). O retículo endoplasmático liso e rugoso torna-se bastante desenvolvido (Figuras 2F-G e 3A) nas proximidades da parede celular onde também são observados microtúbulos (Figura 3A). Gotas lipídicas de baixa elétrondensidade são produzidas pelo retículo endoplasmático rugoso (Figura 2G).

Nos plastídios das células epidérmicas da região lesionada o estroma é mais elétrondenso (Figura 3B), há acúmulo de grãos de amido (Figura 3B) e de gotas de óleo elétrondensas (Figuras 3B-C). Há uma estreita relação entre o retículo endoplasmático e os plastídios (Figuras 3B-D). As gotas formam-se em regiões específicas dos plastídios separadas daquelas com grãos de amido (Figura 3B) e são liberadas no citoplasma nas proximidades do vacúolo (Figura 3E) ou da membrana plasmática (Figura 3G). Ressalta-se que as gotas associadas aos plastídios possuem maior elétrondensidade (Figuras 3B-G) quando comparadas com aquelas provenientes do retículo endoplasmático (Figuras 2F-G e 3C). Gotas elétrondensas são observadas no interior do vacúolo (Figura 3F) e no espaço periplasmático (Figura 3G).

As células epidérmicas nos estágios mais avançados da lesão apresentam citoplasma denso com vacúolos pequenos (Figuras 4A e 5D), núcleo central, retículo endoplasmático liso e rugoso muito desenvolvidos (Figura 4B), dictiossomos hiperativos (Figura 4C) e numerosas mitocôndrias (Figura 4B). As vesículas provenientes dos dictiossomos podem ser liberadas diretamente no vacúolo (Figura 4D) onde podem se agrupar e formar corpos multivesiculares (Figuras 4E-F) ou serem liberadas no espaço periplasmático via membrana plasmática (Figura 5A). Corpos multivesiculares são também observados no citoplasma ou se fundindo à membrana plasmática para liberar as vesículas (Figuras 4G e 5B). Os vacúolos podem conter corpos de mielina (Figura 4H). Estas estruturas também foram observadas junto ao espaço periplasmático (Figura 4H). As vesículas contendo material lipofílico migram através da parede celular e estão relacionadas com a maior deposição de material cuticular (Figuras 5B-E) a qual pode ocorrer na forma de placas (Figuras 5F). O espessamento das paredes periclinais externas das células epidérmicas torna-se mais pronunciado (Figuras 5E-F) em relação à lesão inicial devido à deposição de compostos pécticos que foi comprovada pelo teste com vermelho de rutênio.

Figura 1 – Eletromicrografias de transmissão de pétalas saudáveis de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] ‘Valência’. A. Eletromicrografia de varredura da superfície da célula epidérmica apresentando cutícula estriada (setas). B-F. Eletromicrografias de transmissão das células epidérmicas. B. Visão geral das estrias cuticulares (setas). C. Detalhe da estria no qual é possível verificar a projeção da parede celular (*) e a presença de fibrilas polissacarídicas (setas). D. Visão geral da topografia da epiderme. E. Detalhe do citoplasma parietal voltado à parede periclinal externa. Notar a presença de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e polissomos (setas). F. Plastídios com sistema de endomembranas pouco desenvolvido e ausência de inclusões osmofílicas e de grãos de amido. CT – cutícula; EP – célula epidérmica; MI – mitocôndria; MP – membrana plasmática; PC – parede celular; PL – Plastídio; RE – retículo endoplasmático; VA – vacúolo

Figura 2 - Eletromicrografias de varredura (A-C) e de transmissão (D-G) de pétalas de laranjeira doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] 'Valência' após infecção pelo fungo *Colletotrichum acutatum*. A-C. O padrão de ornamentação estriado (seta em A) é gradativamente alterado (B) e substituído pela deposição de placas (setas em C). D. Visão geral da célula epidérmica no início da lesão. Notar a presença de numerosas gotas de óleo no interior do vacúolo (setas) e que os plastídios localizam-se junto à parede periclinal interna. E. Detalhe da cutícula. Os espaços entre as estrias apresentam material de mesma elétrondensidade das gotas de óleo (setas). Notar que a parede celular apresenta lamelas. F. Detalhe do citoplasma parietal junto à parede periclinal externa com retículo endoplasmático bem desenvolvido e presença de gotas de óleo (*). G. Gota de óleo (*) produzida pelo retículo endoplasmático. DI – dictiossomo; MI – mitocôndria; MP – membrana plasmática; NU – núcleo; PC – parede celular; PL – plastídios; RE – retículo endoplasmático; VA – vacúolo

Discussão

A cutícula deve ser considerada como uma camada de material hidrofóbico que apresentará mudanças em sua estrutura morfológica e composição química ao longo do tempo, não devendo ser interpretada apenas como uma barreira física à penetração dos fungos (GEVENS; NICHOLSON, 2000). Por meio de análises ultraestruturais verificou-se que as células epidérmicas da pétala de *Citrus sinensis* respondem à presença do *Colletotrichum acutatum* aumentando a síntese de material lipídico e deposição de ceras e de compostos de parede celular. As ceras podem causar alterações na superfície, influenciando a adesão e germinação dos esporos, mantendo a superfície seca e prevenindo a germinação dos conídios (LICHSTON; GODOY, 2006).

A superfície epidérmica influencia o desenvolvimento do patógeno por fornecer um microambiente favorável para que ocorra a penetração (STAPLES et al., 1985). Fungos do gênero *Colletotrichum* podem penetrar pela parede periclinal externa e por entre as paredes anticlinais das células epidérmicas e também via estômato (BAILEY et al., 1992). O modo de penetração de *C. acutatum* mais frequente é o intercelular, assim sendo, as alterações cuticulares observadas na epiderme das pétalas de *Citrus sinensis* infectadas pelo *C. acutatum* poderiam restringir a formação de novos apressórios junto às paredes anticlinais, uma vez que a topografia da superfície da pétala é alterada.

A cutícula das plantas é composta principalmente por ceras (lipídios de cadeia alifática muito longa), mas também pode conter triterpenos e uma baixa quantidade de metabolitos secundários como esteróis e flavonoides (KUNST; SAMUELS, 2003). A biossíntese de cera se inicia com a síntese de ácidos graxos de cadeia longa no estroma plastidial e, posteriormente, é transferida para o retículo endoplasmático, onde ocorrerá o processo de alongamento da molécula (KUNST; JETTER; SAMUELS 2006). No presente estudo observou-se uma estreita relação entre os plastídios e o retículo endoplasmático. Além disso, apenas os plastídios das células epidérmicas de pétalas infectadas pelo *C. acutatum* apresentaram estroma elétron-denso o que pode estar relacionado com a formação de uma matriz lipídica (BOSABALIDIS; TSEKOS, 1982a). Também o acúmulo de grãos de amido verificado apenas nesses plastídios pode estar relacionado ao suprimento energético requerido por células com elevadas taxas metabólicas (MONTEIRO et al., 1999).

Figura 3 – Eletromicrografias de transmissão de pétalas de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] ‘Valência’ após inoculação infecção pelo fungo *Colletotrichum acutatum*. A. O retículo endoplasmático e microtúbulos estão situado junto à parede celular (setas). B. Os plastídeos acumulam grãos de amido e gotículas de óleo (pontas de seta) e estão envolvidos pelo o retículo endoplasmático (setas). C. O retículo endoplasmático envolve o plastídeo no setor onde há gotículas de óleo (pontas de seta). Notar a gota de óleo no citoplasma (*). D. Plastídeos contendo grãos de amido. As setas indicam a liberação das gotículas na periferia do plastídeo. E. Plastídeos liberando as gotas diretamente no vacúolo (setas). F. Gota de óleo elétron-densa no interior do vacúolo (*). G. Observar no espaço periplasmático gotas (*) de mesma elétron-densidade que àquelas que estão sendo liberadas pelo plastídeo (setas). MI - Mitocôndria; MP - Membrana plasmática; PC - Parede celular; PL - Plastídeo; RE - Retículo endoplasmático. VA - Vacúolo

Figura 4 – Eletromicrografias de transmissão de pétalas de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] ‘Valência’ após infecção pelo fungo *Colletotrichum acutatum*. A. Célula epidérmica com citoplasma denso, vacúolos pequenos e núcleo conspícuo. B. Detalhe do citoplasma junto à parede periclinal externa. Observar o retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, dictiossomos produzindo numerosas vesículas (setas) e gota de óleo (*). C. Detalhe dos dictiossomos. D. As vesículas oriundas dos dictiossomos podem ser direcionadas ao vacúolo. E. Corpo multivesicular no interior do vacúolo. F. Corpo multivesicular com gota de óleo. G. A membrana dos corpos multivesiculares se funde à membrana plasmática liberando as vesículas no espaço periplasmático. H. Corpos de mielina no interior do vacúolo e no espaço periplasmático (seta). CM – Corpos de mielina; CMV – Corpo multivesicular; CT – Cutícula; DI – Dictiossomo; MI – Mitocôndria; MP – Membrana plasmática; PC – Parede celular; RE – Retículo endoplasmático. VA – Vacúolo

Figura 5 – Eletromicrografias de transmissão de pétalas de laranja doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] ‘Valência’ após infecção pelo fungo *Colletotrichum acutatum*. A. Vesículas provenientes dos dictiossomos (setas) são liberadas diretamente na membrana plasmática (setas). B. As vesículas oriundas do corpo multivesicular são liberadas no espaço periplasmático para a parede celular (setas). C. Migração das vesículas com material lipofílico da parede celular para cutícula (setas). D. A célula epidérmica libera vesículas tanto pelas paredes anticlinais (pontas de seta) quanto pelas paredes periclinais (setas). O conteúdo destas vesículas é depositado junto à cutícula. E. Pode haver deposição de material de parede celular favorecendo a formação de projeções (*). F. As estrias da cutícula crescem entre as projeções das células (setas), ou uma sobre as outras (ponta de seta), favorecendo a formação de placas. As paredes das células epidérmicas apresentam espessamento (*). CT – Cutícula; DI – Dictiossomo; H – Hifa; MI – Mitocôndria; MP – Membrana plasmática; PC – Parede celular; RE – Retículo endoplasmático. VA – Vacúolo

Os plastídios são considerados como importantes organelas presentes em muitos sistemas secretores, os quais podem ser associados à síntese e estoque de diferentes substâncias, como proteínas, polissacarídeos, lipídios e terpenos (BOSABALIDIS; TSEKOS, 1982a; ASCENSÃO; PAIS, 1998; SILVA; MACHADO, 1999). A aparência dos plastídios varia do padrão típico a altamente modificado, dependendo do tipo de composto sintetizado e do estágio de desenvolvimento (BOSABALIDIS; TSEKOS, 1982a; FAHN, 1979). Os plastídios das células epidérmicas sadias apresentavam características de leucoplastos presentes em células secretoras de terpenos e resinas (DELL; McCOMB, 1978).

O deslocamento de gotas lipofílicas do interior do plastídio para a periferia verificado nos plastídios de células epidérmicas de pétalas infectadas está relacionado com o aumento da permeabilidade no envelope plastidial (BOSABALIDIS; TSEKOS, 1982a). A estreita relação entre os plastídios e o retículo endoplasmático verificada nas células de pétalas infectadas é comumente relatada para muitas estruturas secretoras (BOSABALIDIS; TSEKOS, 1982a; MACHADO; GREGÓRIO; GUIMARAES, 2006; ASCENSÃO; MARQUES; PAIS, 1997) e está relacionada com o movimento direto do produto de secreção dos plastídios para o retículo endoplasmático. É provável que, os lipídios produzidos nos plastídios das células epidérmicas sejam encaminhados ao retículo, onde passam pelo processo de alongamento da molécula, para posterior liberação.

Também se observou a liberação de gotas de óleo elétron-densas dos plastídios diretamente nos vacúolos e destes para a membrana plasmática, onde podem ser liberadas para o espaço periplasmático. Há relatos na literatura de que o produto sintetizado pelos plastídios é transportado para o retículo endoplasmático e deste para o apoplasto (BOSABALIDIS; TSEKOS, 1982b; MACHADO; GREGÓRIO; GUIMARÃES, 2006), ou as gotas lipídicas dos plastídios podem ser liberadas diretamente no citoplasma, promovendo um efeito tóxico que culmina com a lise celular (HEINRICH, 1970 apud BOSABALIDIS; TSEKOS, 1982b). A compartimentalização das gotas, oriundas dos plastídios, no interior dos vacúolos, verificada no presente estudo talvez favoreça o deslocamento e a liberação das gotas para o apoplasto.

Na pétala infectada, foi observado que há o deslocamento de grande quantidade de material lipídico através da parede celular. Esse material é produzido pelas células epidérmicas e é deslocado até a superfície da pétala alterando a morfologia da cutícula. Há duas hipóteses sobre o transporte intracelular de cera: transferência direta dos lipídios do retículo endoplasmático para a membrana plasmática e por exocitose mediada pelo complexo

de Golgi. A participação dos dictiossomos tem por finalidade facilitar a fusão das vesículas com lipídios na membrana plasmática e consequente liberação destas para a parede celular (KUNST; SAMUELS, 2003). As análises nos setores lesionados das pétalas confirmam o envolvimento das vesículas derivadas dos dictiossomos e do retículo endoplasmático no processo de liberação de material lipídico. Atualmente admite-se que o fenômeno de migração das ceras para a cutícula está relacionado com o envolvimento de proteínas de transferência de lipídios (do inglês, lipid transfer proteins – LTP), capazes de transportar as ceras através das paredes celulares e camada péctica para a superfície. O transporte de material lipídico também pode ocorrer diretamente na matriz da parede celular, pois devido a sua relativa hidrofobicidade, as ceras podem ser deslocadas em conjunto com outros materiais hidrofóbicos para a superfície da célula (KUNST; SAMUELS, 2003). A presença de corpos de mielina pode estar relacionada com o movimento apoplástico de substâncias secretadas (BOSABALIDIS; TSEKOS, 1982a). Segundo os autores, os corpos de mielina podem carregar enzimas líticas para a dissolução da matriz não celulósica, resultando na formação de um sistema de capilaridade entre as microfibrilas de celulose. Nas células epidérmicas de *Citrus sinensis* infectadas com o patógeno verificou-se a presença dos corpos de mielina no interior dos vacúolos e nos espaços periplasmáticos.

O complexo de Golgi é comumente relacionado à produção de compostos não celulósicos da parede celular como pectinas e hemiceluloses (HARHOLT; SUTTANGKAKUL; SCHELLER, 2010). Segundo os autores, as vesículas deixam o Golgi e migram para a membrana plasmática, onde ocorre a sua fusão e descarregamento do conteúdo no meio extracelular. A presença de dictiossomos hiperativos nas células da epiderme nas áreas infectadas pode estar relacionado ao depósito adicional de material péctico e, consequente espessamento parietal das mesmas.

O espessamento da parede também pode estar relacionado com a presença dos corpos multivesiculares. Tais corpos são relatados na literatura por conterem polissacarídeos de parede, dentre os quais se destacam as β -1,3 glucanas (XU; MENDGEN, 1994; SILVA; MACHADO, 1999), e são observados durante o processo de resposta de hipersensibilidade em alguns patossistemas, por exemplo, em folhas de cevada atacadas por oídio (AN et al., 2006). Devido à sua composição, eles podem estar associados à formação de papilas, as quais funcionam como um reforço das paredes celulares em resposta ao ataque de patógenos (HOFMANN, 2010). Os corpos multivesiculares são comumente observados em células secretoras e estão relacionados com a manutenção da constância da superfície da membrana

plasmática, a qual aumenta durante a secreção granulócrica (BOSABALIDIS; TSEKOS, 1982b).

6.3 Considerações Finais

A pétala de *Citrus sinensis* possui epiderme com topografia irregular e é composta cutícula estriada. As células epidérmicas apresentam citoplasma parietal, com vacúolo amplo. A presença do *Colletotrichum acutatum* na pétala altera a sua superfície. As células epidérmicas passam a produzir numerosas gotas lipídicas por meio dos plastídios e dos retículos endoplasmático liso e rugoso. Numerosos dictiosomos estão relacionados com o processo de liberação de vesículas para a parede celular. Corpos multivesiculares e de mielina são frequentemente associados ao processo de secreção. As vesículas, contendo material lipofílico, são liberadas diretamente na parede celular e migram através desta para a cutícula favorecendo a alteração na superfície epidérmica. Compostos pécticos também são produzidos e depositados nas paredes periclinais externas. As alterações cuticulares e parietais na pétala podem restringir a ocorrência de novas infecções.

Referências

- AN, Q.; HÜCKELHOVEN, R.; KOGEL, K.H.; VAN BEL, A.J.E. Multivesicular bodies participate in a cell wall associated defense response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. **Cell Microbiology**, Washington, v. 8, p. 1009–1019, 2006.
- ASCENSÃO, L.; PAIS, M.S. The leaf capitate trichomes of *Leonotis leonurus*: histochemistry, ultrastructure and secretion. **Annals of Botany**, Oxford, v. 81, p. 263-271, 1998.
- ASCENSÃO, L.; MARQUES, N.; PAIS, M.S. Peltate glandular trichomes of *Leonotis leonorus* leaves: ultrastructure and histochemical characterization of secretions. **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 158, p. 249–258, 1997.
- BAILEY, J.A.; O'CONNEL, R.J.; PRING, T.J.; NASH, C. Infection strategies in *Colletotrichum* species. In: JEGER, M.J.; BAILEY, J.A. **Colletotrichum**: biology, pathology and control. Wallingford: CAB. 1992. chap. 5, p. 88-120.
- BOSABALIDIS, A.; TSEKOS, I. Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* ten. I. Early stages of the gland cells differentiation. **Protoplasma**, Leipzig, v. 112, n. 1-2, p. 55-62, 1982a.

_____. Ultrastructural studies on the secretory cavities of *Citrus deliciosa* ten. II. Development of the essential oil-accumulating central space of the gland and process of active secretion. **Protoplasma**, Leipzig, v. 112, n. 1/2, p. 63-70, 1982b.

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

CHASSOT, C.; NAWRATH, C.; MÉTRAUX, J.P. The cuticle: not only a barrier for plant defence. **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v. 3, n. 2, p. 142-144, 2008.

DELL, B.; MCCOMB, J.A. Plant resins - their formation, secretion and possible functions. **Advances in Botanical Research**, London, v. 6, p. 276-316, 1978.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. 302 p.

GEVENS, A.; NICHOLSON, R.L. Cutin composition: a subtle role for fungal cutinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, p. 43-45, 2000.

HARHOLT, J.; SUTTANGKAKUL, A.; SCHELLER, H. V. Biosynthesis of pectin. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, p. 384-395, June. 2010

HOFMANN, N.R. Linking multivesicular bodies to resistance against fungal invasion. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 22, n. 11, p. 3505, 2010.

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.

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.

KUNST, L.; SAMUELS, A.L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 51-80, Jan. 2003.

KUNST; JETTER; SAMUEL, S. Biosynthesis and transport of plant cuticular waxes In: RIEDER, M.; MULLER, C. (Ed.). **Biology of plant cuticle**. Oxford: Blackweel, 2006. chap. 5, p.182-215. (Annual Plant Reviews, 23).

LICHSTON, J.E.; GODOY, S.A.P. Morfologia e teor de cera de folhas de café após aplicação de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 6, p. 919-926, jun. 2006.

LIMA, W.G.; SPÓSITO, M.B.; AMORIM, L.; GONÇALVES, F.P.; FILHO, P.A.M. *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 1, p. 157-165, 2011.

LIN, Y.J.; STOVER, E.; SONODA, R.; ROSSKOPF, E. Stigma and style necrosis is associated with postbloom fruit drop disease in citrus following artificial inoculation. **Hortscience**, St. Joseph, v. 36, n.6, p. 1138, 2001.

MACHADO, S.R.; GREGÓRIO, E. A.; GUIMARÃES, E. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): developmental ultrastructure and secretion in relation to function. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, p. 357–369, 2006.

MARTIN, J.T.; JUNIPER, B.E. **The cuticle of plants**. London: Edwards Arnold, 1970. 347 p.

MONTEIRO, W.R.; FAHN, A.; CALDEIRA, W.; CASTRO, M.M. Ultrastructural observations on the foliar secretory cavities of *Porophyllum lanceolatum* DC. (Asteraceae). **Flora**, Berlin, v. 15 n. 1, p. 69-76, Mar. 1999.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 22, p. 417-453.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry, theoretical and applied**. London: Churchill, 1968. v. 1, 998 p.

PERES, N.A.; TIMMER, L.W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 89, n. 8, p. 784-796, Aug. 2005.

PODILA, G.K.; ROGERS, L.M.; KOLATTUKUDY, P.E. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 267-272, 1993.

READ, N.D.; KELLOCK, L.J.; KNIGHT, H.; TREWAVAS, A.J. Contact sensing during infection by fungal pathogens. In: GALL, J.A.; GREEN, J.R. **Perspective in plant cell recognition**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. p. 137-172.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 17, p. 208-212, Apr. 1963.

RIEDER, M. Introduction: biology of plant cuticle. In: RIEDER, M.; MULLER, C. (Ed.). **Biology of plant cuticle**. Oxford: Blackweel, 2006. chap. 1, p. 1-10. (Annual Plant Reviews, 23).

SILVA, E.M.J.; MACHADO, S.R. Ultrastructure and cytochemistry of the pearl gland in *Piper regnellii* (Piperaceae). **Nordic Journal of Botany**, Lund, v. 19, n. 5, p. 623–634, 1999.

STAPLES, R.C.; HOCH, H.C.; EPSTEIN, L.; LACCETTI, L.; HASSOUNA, S. Recognition of host morphology by rust: responses and mechanisms. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 7, p. 314-322, 1985.

XU, H.; MENDGEN, K. Endocytosis of β -1,3~glucans by broad bean cells at the penetration site of the cowpea rust fungus (haploid stage). **Planta**, Berlin, v. 195, p. 282-290, 1994.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diferença de resposta à infecção pelo fungo *Colletotrichum acutatum* em botões florais de *Citrus sinensis* ‘Valência’ em diferentes fases de desenvolvimento pode estar associada às barreiras químicas e estruturais pré-formadas presentes em botões menores que 8mm. O fungo pode penetrar na pétala diretamente com a formação de apressórios e também através da via estomática. Pode apresentar crescimento subcuticular, intramural e, principalmente, entre as paredes anticlinais das células epidérmicas. Foi observada a presença de hifas do fungo entre os acérvulos e os feixes vasculares o que evidencia a interação do patógeno com os tecidos condutores da planta. As alterações cuticulares e nas paredes periclinais externas da epiderme podem restringir a penetração do *Colletotrichum acutatum*, pois há o aumento do espessamento parietal e dos estratos cuticulares. Sabe-se que a cera ajuda a prevenir a germinação de agentes patogênicos e causa o espalhamento de gotas de água e poeira assim como de esporos o que dificulta a infecção por fungos.

O fungo se encontra na forma quiescente nas folhas. Essa informação possibilita uma maior compreensão de como o fungo sobrevive na planta no período vegetativo. Além disso, a observação de que o fungo pode infectar grãos de pólen, tanto *in vitro* quanto naturalmente, acrescenta ao patossistema mais uma importante característica do ponto de vista epidemiológico. Os conídios após germinarem apresentam quimiotropismo em direção aos grãos de pólen. Sugere-se que os grãos de pólen de *Citrus sinensis* sejam uma provável fonte de inóculo do *Colletotrichum acutatum*, e que por meio de agentes polinizadores ocorra a disseminação da doença entre plantas e até mesmo entre talhões.