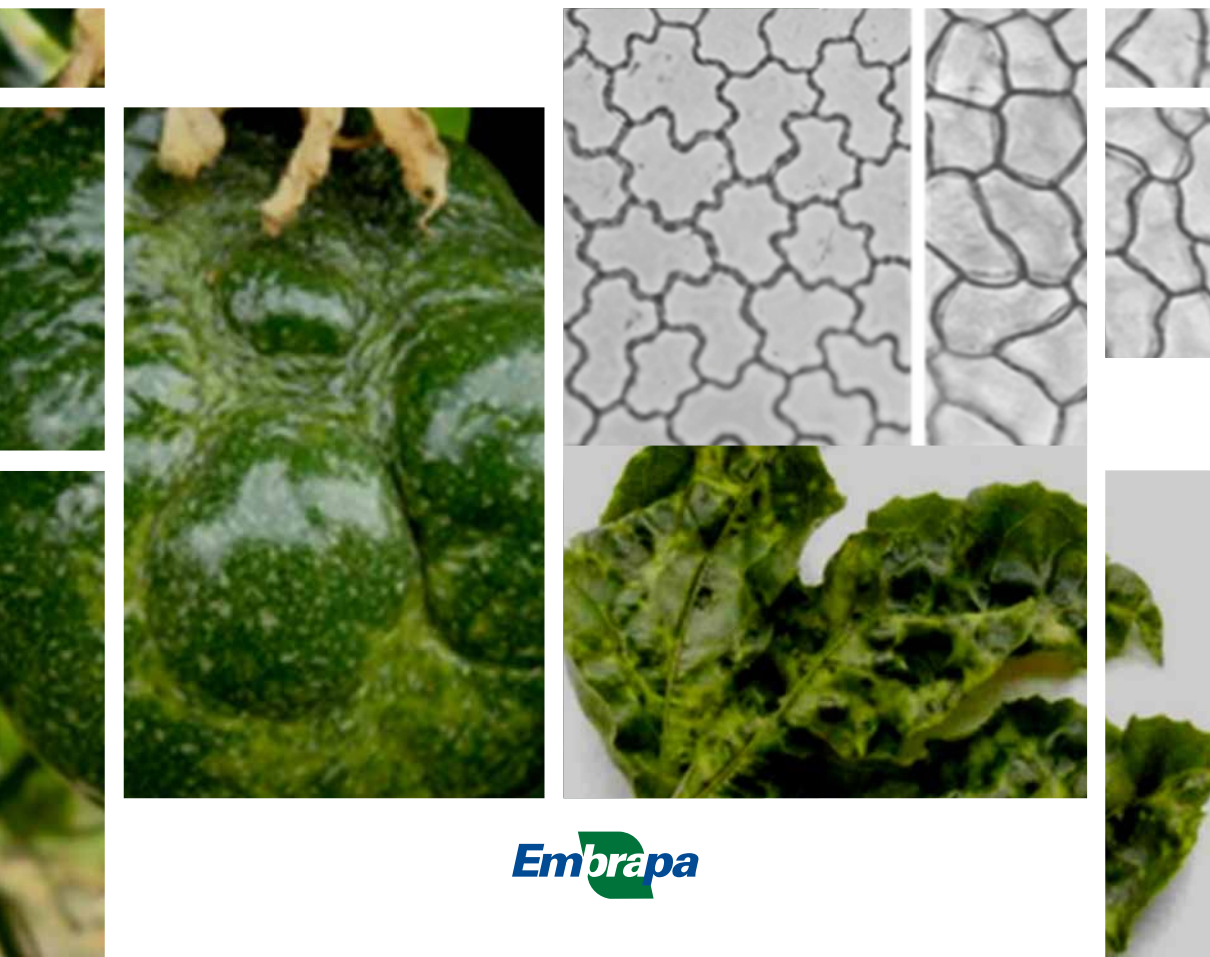


Anatomia foliar de maracujazeiro amarelo infectado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e tratado com fertilizante foliar



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
102**

**Anatomia foliar de maracujazeiro amarelo
infectado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic
virus* (CABMV) e tratado com fertilizante foliar**

*Naira Costa Soares Barbosa
Cristiane de Jesus Barbosa
Eder Jorge de Oliveira
Marcela Fonseca Souza
Kelly Regina Batista Leite
Lazaro Benedito da Silva
Alessandra Selbach Schnadelbach*

**Embrapa Mandioca e Fruticultura
Cruz das Almas, BA
2019**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Mandioca e Fruticultura
Rua Embrapa - s/n, Caixa Postal 007
44380-000, Cruz das Almas, Ba
Fone: (75) 3312-8048
Fax: (75) 3312-8097
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Presidente
Francisco Ferraz Laranjeira Barbosa

Secretário-Executivo
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Membros
Aldo Vilar Trindade, Ana Lúcia Borges, Eliseth de Souza Viana, Fabiana Fumi Cerqueira Sasaki, Harllen Sandro Alves Silva, Leandro de Souza Rocha, Marcela Silva Nascimento

Supervisão editorial
Francisco Ferraz Laranjeira

Revisão de texto
Adriana Villar Tullio Marinho

Normalização bibliográfica
Lucidalva Ribeiro Gonçalves Pinheiro

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Anapaula Rosário Lopes

Foto da capa
Naira Costa Soares Barbosa

1ª edição
On-line (2019)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Anatomia foliar de maracujazeiro amarelo infectado pelo Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) e tratado com fertilizante folia. Naira Costa Soares Barbosa.... [et. al.]. – Cruz das Almas, BA : Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2019.

25 p. il. ; 21 cm. - (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1809-5003.102).

1. Maracujá. 2. Doença de plantas. 3. Virose vegetal. I. Soares, Naira Costa Barbosa. II. Barbosa, Cristiane de Jesus. III. Oliveira, Eder Jorge de. V. Souza, Marcela Fonseca. VI. Leite, Kelly Regina Batista. VII. Silva, Lazaro Benedito da. VIII. Schnadelbach, Alessandra Selbach. IX. Título. X. Série.

CDD 634.774

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	9
Material e Métodos	11
Resultados.....	13
Discussão	20
Conclusões.....	22
Agradecimentos.....	22
Referências	23

Anatomia foliar de maracujazeiro amarelo infectado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e tratado com fertilizante foliar

Naira Costa Soares Barbosa^{1 e 2}
Cristiane de Jesus Barbosa³
Eder Jorge de Oliveira³
Marcela Fonseca Souza⁴
Kelly Regina Batista Leite²
Lazaro Benedito da Silva²
Alessandra Selbach Schnadelbach²

Resumo – O maracujazeiro amarelo, *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., é uma fruteira de grande importância para a economia nacional, sendo o Brasil o principal produtor mundial. Um dos principais problemas são as viroses, destacando-se a do endurecimento dos frutos, provocada pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV). Agricultores na Bahia vêm utilizando fertilizantes foliares na tentativa de reduzir os danos causados pelo vírus. Nesse trabalho, foram realizadas análises anatômicas de folhas de maracujazeiro amarelo infectado pelo CABMV e tratado com fertilizante foliar à base dos macronutrientes Ca, Mg e S e do micronutriente B. Para tanto, foi estabelecido um ensaio, no qual se avaliaram cinco tratamentos: T1 – Plantas sem inoculação e sem aplicação de fertilizante foliar; T2 – Plantas sem inoculação e tratadas com fertilizante foliar; T3 – Plantas inoculadas com o CABMV sem aplicação de fertilizante foliar; T4 – Plantas inoculadas com CABMV e posteriormente tratadas com fertilizante foliar; T5 – Plantas inoculadas com CABMV e tratadas, antes e depois da inoculação, com fertilizante foliar. Foram coletadas amostras foliares de plantas de todos os tratamentos para a realização de estudos histológicos de seções paradérmicas e transversais. Foram observadas diferenças significativas entre

¹ Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB)

² Laboratório de Anatomia Vegetal e Identificação de Madeiras (LAVIM), Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia

³ Pesquisadores da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA

⁴ Laboratório de Fitopatologia, Central de Laboratórios da Agropecuária, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA)

os tratamentos avaliados. Plantas infectadas pelo CABMV apresentaram grandes alterações na anatomia das folhas, como hipertrofia e hiperplasia do parênquima, e desorganização dos feixes vasculares, enquanto as tratadas com fertilizante foliar mostraram alterações menos intensas. Plantas infectadas pelo CABMV e tratadas com fertilizante foliar sofreram menores alterações nas características histológicas, principalmente quando a aplicação ocorreu antes da inoculação.

Palavras-chave: *Passiflora*, maracujá, PWV, histologia vegetal, indução de resistência.

Leaf anatomy of yellow passion fruit trees infected by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) and treated with leaf fertilizer

Abstract – The yellow passion fruit, *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg., is a fruit tree of great importance for the national economy, Brazil being the main producer in the world. Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is one of the main problems, especially fruit hardening. Farmers in Bahia have been using foliar fertilizers in an attempt to reduce the damage caused by the virus, but no study has been developed to elucidate the effects of these products on infection. In this work, anatomical analyzes of yellow passion fruit leaves infected with CABMV and treated with foliar fertilizer based on the macronutrients Ca, Mg and S and micronutrient B were performed. For this purpose, a trial was established, where five treatments were evaluated: T1 - Plants without inoculation and without application of foliar fertilizer; T2 - Plants without inoculation and treated with foliar fertilizer; T3 - Plants inoculated with the CABMV without application of foliar fertilizer; T4 - Plants inoculated with CABMV and later treated with foliar fertilizer; T5 - Plants inoculated with CABMV and treated, before and after inoculation, with foliar fertilizer. Leaf samples of plants of all treatments were collected for the accomplishment of histological studies of parasideric and transversal sections. Significant differences were observed between the evaluated treatments. Plants infected by the CABMV showed large changes in leaf anatomy, such as parenchyma hypertrophy and hyperplasia, and vascular bundle disorganization, while those treated with leaf fertilizer showed less intense alterations. Plants infected by CABMV and treated with leaf fertilizer suffered minor changes in histological characteristics, especially when the application occurred before inoculation.

Keywords: *Passiflora*, passion fruit, PWV, plant histology, induction of resistance.

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá, *Passiflora* spp., destacando-se a produção de maracujá-amarelo (maracujá-azedo), *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.*, que é cultivado em quase todo o território nacional (Nogueira-Filho, 2010; Borges et al., 2005). A produção anual é de aproximadamente 704.000 t, sendo a região Nordeste a principal produtora, com aproximadamente 490.000 t por ano (IBGE, 2016). O Estado da Bahia destaca-se, tendo sido responsável por 48% da produção em 2016 (IBGE, 2016).

O endurecimento dos frutos, causado pelo *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), é um dos mais importantes problemas fitossanitários da cultura do maracujá no Brasil (Nascimento et al., 2006; Pinto et al., 2008). A virose é caracterizada pela ocorrência de sintomas de mosaico e distorção das folhas, endurecimento e diminuição do número de frutos e redução do pericarpo. O vírus provoca danos quantitativos e qualitativos na produção (Fischer et al., 2005; Cavichioli et al., 2011). A transmissão do vírus ocorre de forma não persistente por afídeos, não se conhecendo, ainda, uma medida de controle efetiva para o vírus (Orawu et al., 2013; Fischer et al., 2005).

Alguns produtores que cultivam o maracujá amarelo no Estado da Bahia vêm utilizando o tratamento com fertilizantes foliares na tentativa de amenizar os danos provocados pelo CABMV (Junqueira et al., 2011; Sousa, 2015).

Fertilizantes foram testados em *P. edulis* como indutores de resistência à virose do endurecimento do fruto (causada pelos vírus *Passion fruit woodiness virus* - PWV ou *Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV), à murcha de *Fusarium* (causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* W.L. Gordon apud G. S. Purss) e à antracnose (causada pela bactéria *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.) (Junqueira et al., 2011). Os autores testaram diferentes fertilizantes e observaram que houve redução dos sintomas das doenças, exceto para a antracnose, além de aumento na produtividade. Para a virose do endurecimento do fruto, houve

redução da severidade dos sintomas, sobretudo quando tratada com gesso agrícola à base de sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), e, ainda, nutrientes, como fósforo, potássio e magnésio.

Outros estudos também têm demonstrado que o uso de nutrientes pode minimizar os danos acarretados pelo vírus do enrolamento das folhas (*Cotton leaf curl virus*, CLCV) em algodoeiro (Pervez et al., 2007; Irshad et al., 2012).

A resistência induzida pode ser definida como um aumento da expressão dos mecanismos de defesa das plantas contra diferentes agentes patogênicos, provocada por fatores externos e manifestada após a inoculação de uma praga (Edreva, 2004). Segundo Junqueira et al (2011), a resistência sistêmica adquirida promove uma série de alterações bioquímicas e estruturais.

Há poucos estudos sobre a utilização de fertilizantes ou indutores de resistência para o manejo de vírus na cultura do maracujazeiro (Pervez et al., 2007; Junqueira et al., 2011; Irshad et al., 2012; Sousa, 2015). Apesar disso, no Brasil, diferentes produtos já estão sendo utilizados por agricultores para o manejo de doenças viróticas em batata, tomate e, também, no maracujazeiro (Biochem, 2012; Whitworth et al., 2006; Junqueira et al., 2011).

As plantas infectadas por vírus, de uma forma geral, exibem vários sintomas macroscópicos e microscópicos resultantes de alterações anatômicas e/ou fisiológicas (Esau, 1967; Takimoto et al., 2009; Montero et al., 2017). Portanto, estudos anatômicos são ferramentas muito úteis na fitopatologia, podendo ser usados no diagnóstico de doenças e para compreender as interações entre os tecidos vegetais e os patógenos.

O trabalho visou avaliar o efeito da aplicação de fertilizante foliar contendo Ca, Mg, S e B no desenvolvimento dos sintomas histológicos em folhas de maracujazeiro amarelo infectado pelo vírus do endurecimento dos frutos.

Material e Métodos

Preparação e coleta do material

As plantas utilizadas foram provenientes de sementes de maracujá-amarelo fornecidas pela Embrapa Mandioca e Fruticultura. A semeadura foi feita em sacos de polietileno contendo substrato composto por terra de barranco e terra vegetal (1:1), ao qual, para cada metro cúbico, foi acrescentado 2 kg de superfosfato simples, 0,5 kg cloreto de potássio e 1 kg de calcário dolomítico. O estudo foi conduzido em telado no Centro Tecnológico Agropecuário do Estado da Bahia (CETAB) e consistiu de cinco tratamentos: T1 – Plantas não tratadas com fertilizante foliar e não inoculadas com o CABMV; T2 – Plantas somente tratadas com fertilizante foliar; T3 – Plantas somente inoculadas com o CABMV; T4 – Plantas inoculadas com CABMV e posteriormente tratadas com fertilizante foliar; T5 – Plantas inoculadas com CABMV e tratadas, antes e depois da inoculação, com fertilizante foliar. Cada tratamento continha uma planta em dez repetições, estabelecidos em delineamento inteiramente casualizado, das quais apenas cinco repetições foram, aleatoriamente, utilizadas para este estudo.

O tratamento com fertilizante foliar consistiu em pulverizações semanais de um produto comercial, com composição: Carbono Orgânico (CO) 5%, Cálcio (CA) 5%, Boro (B) 1%, Magnésio (Mg) 1%, Enxofre (S) 1%, com densidade de $1,25 \text{ g cm}^{-3}$, na dose de 1 mL .L^{-1} , segundo recomendação do fabricante (Biochem, 2012).

Para o tratamento T2, a primeira pulverização com o fertilizante ocorreu 90 dias após a germinação das sementes e, posteriormente, foram realizadas pulverizações semanais, durante seis semanas.

As plantas dos tratamentos T3, T4 e T5 foram inoculadas 90 dias após a germinação das sementes. As plantas foram mecanicamente inoculadas quando atingiram tamanho médio de 20 cm, a partir de extrato de folhas com sintomas de mosaico, e infectadas com um isolado de CABMV previamente identificado por RT-PCR. As inoculações foram realizadas após a preparação do extrato com 1 g de tecido por 10 mL de tampão (0,1 M de fosfato de potássio

e 0,1 M de sulfito de sódio, com pH 7,0). A inoculação foi realizada nas duas folhas mais novas de cada planta com o auxílio do abrasivo Carborundum (Fajardo; Nickel, 2015).

As plantas do tratamento T4 receberam pulverizações semanais de fertilizante foliar após a inoculação com o vírus por seis semanas, e as do tratamento T5 receberam pulverizações semanais com o fertilizante seis semanas antes e depois da inoculação.

A coleta de amostras para os estudos histológicos foi realizada seis semanas após a inoculação nos tratamentos inoculados T3, T4 e T5, quando as plantas já mostravam sintomas de mosaico e deformação foliar. Nesse momento, também se procedeu à coleta dos tratamentos controles T1 e T2. Em todos os tratamentos, coletou-se a primeira folha trilobada para fins de padronização.

Preparação das lâminas histológicas

Para a montagem das lâminas histológicas, foram realizadas seções paradérmicas da lâmina foliar, das faces adaxial e abaxial, e seções transversais, na região mediana da lâmina foliar, passando pela nervura principal à mão livre, com lâmina de barbear. As seções foram clarificadas com hipoclorito de sódio 500 g L⁻¹, lavadas com água destilada e coradas com safranina alcoólica 10 g L⁻¹ e azul de Astra e safranina (9:1), nas seções paradérmicas e transversais, respectivamente. Foram montadas lâminas semipermanentes utilizando-se glicerina 500 g L⁻¹. As lâminas foram fotomicrografadas utilizando-se microscópio Zeiss Axio Scope.A1, acoplado à câmera Canon®.

Análise Estatística

Para a análise quantitativa, mensurou-se, nas seções paradérmicas, o índice estomático (calculado pela razão entre número de estômatos e número total de células epidérmicas) e a densidade estomática (número de estômatos mm⁻²), utilizando o programa ANATI QUANTI (Aguiar et al., 2007). Mediu-se também os diâmetros polar e equatorial dos estômatos (µm),

utilizando o mesmo programa. Nas seções transversais, mediu-se espessura do limbo, parênquimas paliçádico e esponjoso de cada uma das epidermes e das cutículas. As medidas foram feitas em cada uma das cinco réplicas de cada tratamento.

Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com posterior comparação das médias através do Teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o programa SPSS Statistics 8.0.

Resultados

A infecção pelo CABMV causou grandes alterações na anatomia das folhas de maracujazeiro-amarelo, que mostraram modificações no aspecto anatômico geral, bem como nas variáveis mensuradas (Figuras 1, 2, 3 e 4). Estas alterações estruturais estão possivelmente relacionadas aos sintomas de mosaico e deformação foliar observados em todas as plantas inoculadas, já relatados por outros autores (Zanon et al., 2018). As plantas inoculadas com o CABMV e tratadas com o fertilizante foliar apresentaram menores alterações anatômicas que as não tratadas.

Superfície foliar

Nas folhas do grupo controle, T1, observou-se que as epidermes superior (Figura 1A e 1F) e inferior (Figura 2A e 2F), em vista frontal, continham células poligonais levemente sinuosas. Os estômatos, presentes apenas na epiderme inferior, eram predominantemente paracíticos, mas havia também estômatos anisocíticos (Figura 2F). Em T2, com folhas somente tratadas com fertilizante foliar, (Figura 1B e 2B), notou-se que, em ambas as epidermes, as células apresentaram sinuosidade mais acentuada que nas plantas controle. Enquanto em T3, nas folhas inoculadas com CABMV e não tratadas com o fertilizante (Figura 1C, 1G, 2C e 2G), as células apresentavam paredes mais retas. Observaram-se também nesse tratamento alguns estômatos com deformidades (Figura 2G). Para as plantas infectadas com CABMV e tratadas com fertilizante foliar, T4 e T5 (Figura 1E), em ambas as epidermes, não foram notadas diferenças em relação ao grupo controle.

Foto: Naira Costa Soares Barbosa

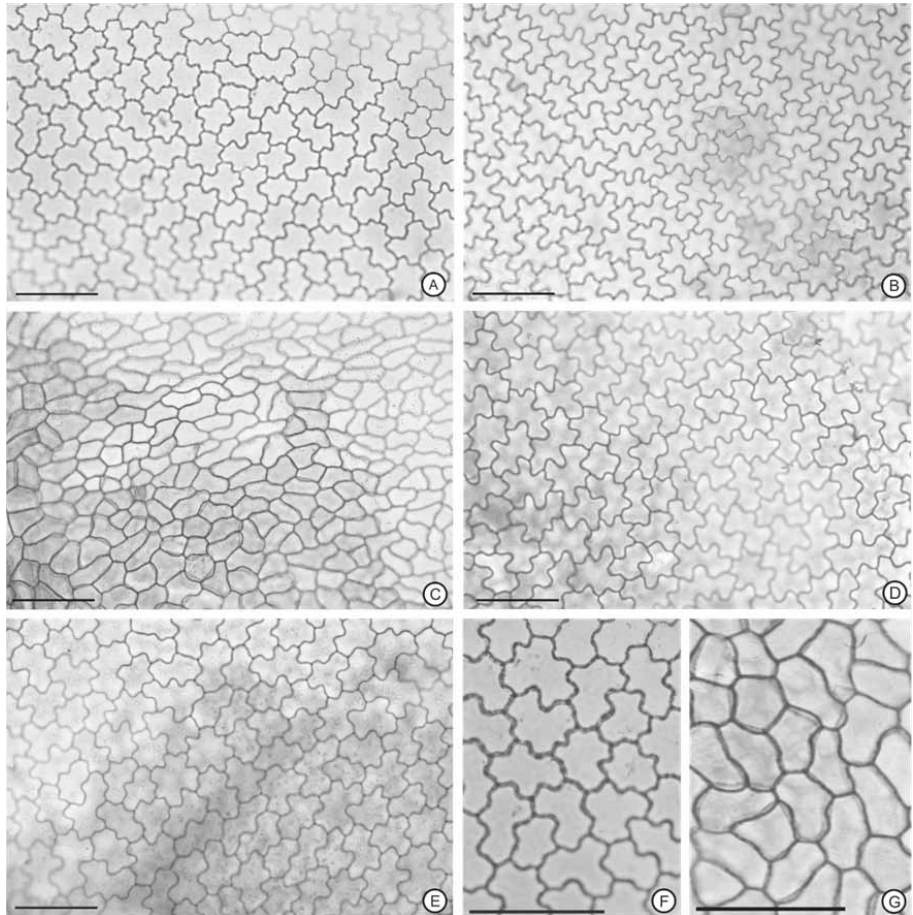


Figura 1. Seções paradérmicas da epiderme superior de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. f. *flavicarpa* Deg. fotomicrografadas em aumento de 40x. A. T1 – Controle negativo, plantas não tratadas com fertilizante foliar e não inoculadas com o CABMV. B. T2 – Plantas somente tratadas com o fertilizante foliar. C. T3 – Plantas somente inoculadas com CABMV. D. T4 – Plantas inoculadas com CABMV e posteriormente tratadas com fertilizante foliar. E. T5 – Plantas inoculadas com CABMV e tratadas, antes e depois da inoculação, com fertilizante foliar. F. Detalhe da superfície de folha do T1. G. Detalhe da superfície de folha do T3. Barra: 100µm.

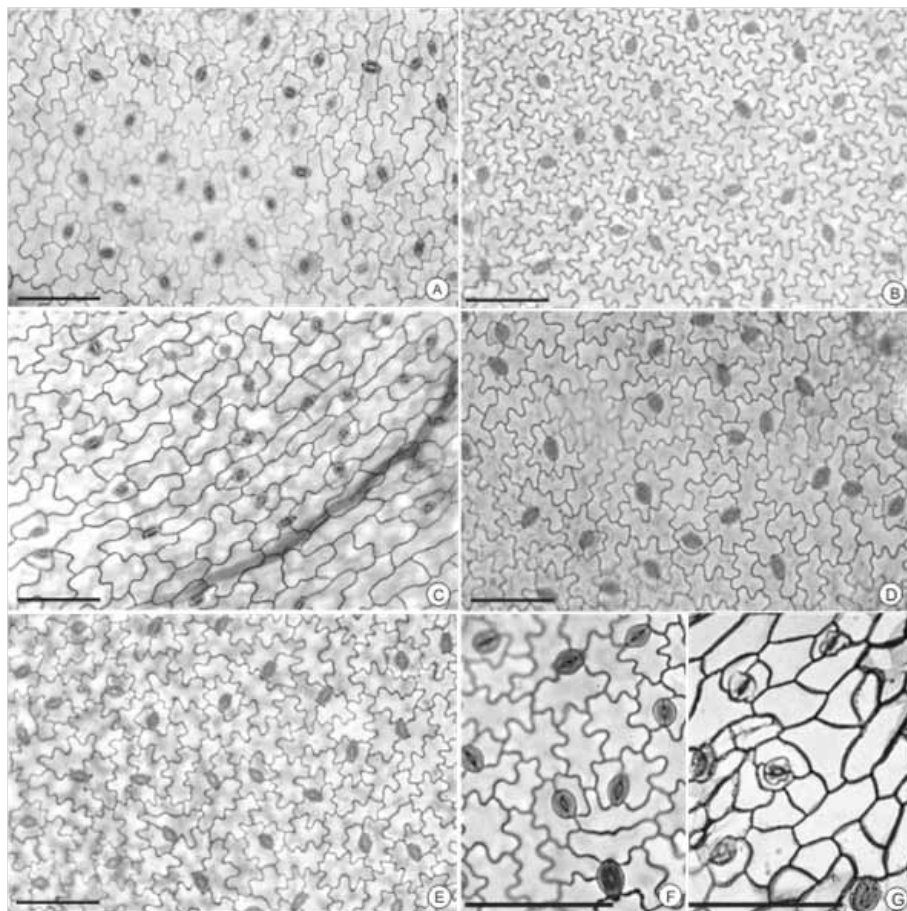


Foto: Naira Costa Soares Barbosa

Figura 2. Seções paradérmicas da epiderme inferior de *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg. f. *flavicarpa* Deg. fotomicrografadas em aumento de 40x. A. T1 – Controle negativo, plantas não tratadas com fertilizante foliar e não inoculadas com o CABMV. B. T2 – Plantas somente tratadas com o fertilizante foliar. C. T3 – Plantas somente inoculadas com CABMV. D. T4 – Plantas inoculadas com CABMV e posteriormente tratadas com fertilizante foliar. E. T5 – Plantas inoculadas com CABMV e tratadas, antes e depois da inoculação, com fertilizante foliar. F. Detalhe da superfície em T1, mostrando estômatos normais, rodeados por duas ou três células. G. Detalhe da superfície em T3, mostrando estômatos com deformações provocadas pelo vírus. Barra: 100µm.

Seções transversais

Em T1 (Figura 3A), observou-se que ambas as epidermes eram uniestratificadas, contendo células de formato retangular. Os estômatos estavam no mesmo nível das demais células epidérmicas, assim como nos demais tratamentos (Figura 3F). O mesofilo era do tipo dorsiventral; nele, o parênquima paliçádico apresentava uma camada de células alongadas longitudinalmente, seguido pelo parênquima esponjoso, que continha de quatro a seis camadas de células arredondadas, frouxamente distribuídas (Figura 3).

Os tratamentos T2 (Figura 3B) e T5 (Figura 3E) não apresentaram diferenças significativas quanto à organização dos tecidos em relação ao grupo controle. Entretanto, em T5, o parênquima esponjoso apresentou espaços intercelulares reduzidos (Figura 3E).

Em T3, observaram-se deformações, como hipertrofia das células epidérmicas e parenquimáticas, estando as células do parênquima clorofiliano mais frouxamente distribuídas e desorganizadas (Figura 3C).

A nervura principal das amostras de plantas do tratamento T1 apresentava forma biconvexa, sendo a região superior mais proeminente (Figura 4A). A epiderme era uniestratificada. O colênquima era formado por duas a três camadas de células, seguido pelo parênquima de preenchimento, composto por células arredondadas. O sistema vascular era formado por quatro feixes, aproximadamente do mesmo tamanho, dispostos em forma de círculo, estando um mais voltado para a face adaxial, e três localizados medianamente à nervura, sendo o câmbio vascular evidente (Figura 4A). Notou-se a presença de drusas dispersas pelo parênquima (Figura 4F). Em T2 (Figura 4B), não foram observadas diferenças visuais significativas quanto à organização dos tecidos em relação ao grupo controle. Em T3 (Figura 4C), observaram-se deformações na nervura principal, especialmente no arranjo das células do colênquima localizadas na região mais proeminente da face adaxial. Além disso, o sistema vascular apresentou-se desorganizado, podendo se diferenciar apenas um feixe de tamanho menor, voltado para a região superior, e um grupo de feixes não distintos, mais medianamente.

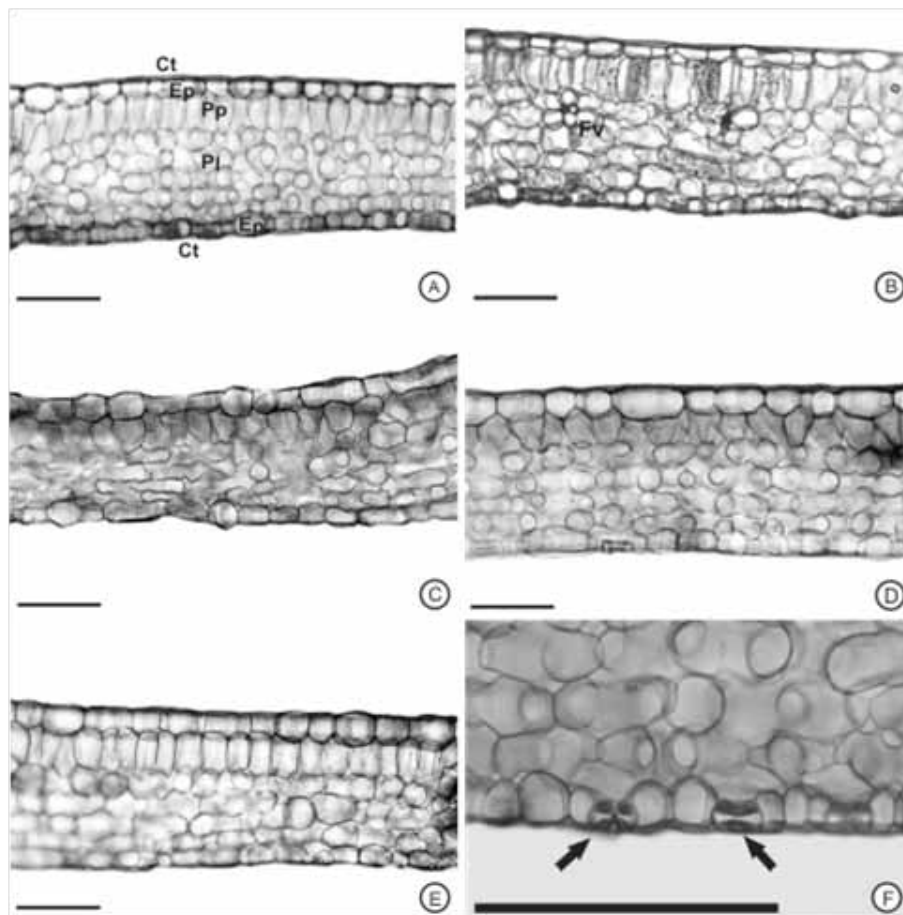


Foto: Naira Costa Soares Barbosa

Figura 3. Seções transversais da lâmina foliar de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. fotomicrografadas em aumento de 40x. A. T1 – Controle negativo, plantas não tratadas com fertilizante foliar e não inoculadas com o CABMV. B. T2 – Plantas somente tratadas com o fertilizante foliar. C. T3 – Plantas somente inoculadas com CABMV. D. T4 – Plantas inoculadas com CABMV e posteriormente tratadas com fertilizante foliar. E. T5 – Plantas inoculadas com CABMV e tratadas, antes e depois da inoculação, com fertilizante foliar. F. Detalhe do T1 mostrando estômatos na epiderme inferior. Ct = cutícula; Ep = epiderme; Pp = parênquima paliçádico; Pl = parênquima esponjoso; Fv = feixe vascular; Setas = estômatos na epiderme inferior. Escala: 100µm.

Em T4, observou-se que os feixes vasculares estavam organizados de forma semelhante ao grupo controle, porém, mais unidos (Figura 4D). Contudo, mostrou algumas seções com deformações, como em T3 (Figura 4C), enquanto em T5 (Figura 4E) observou-se um aspecto mais sadio, assemelhando-se ao controle, estando os feixes organizados como no grupo controle, e sem nenhuma alteração evidente na organização dos tecidos. Portanto, a utilização do fertilizante foliar, antes e após a inoculação com o vírus, resultou em menores alterações anatômicas nas folhas.

Foto: Naira Costa Soares Barbosa

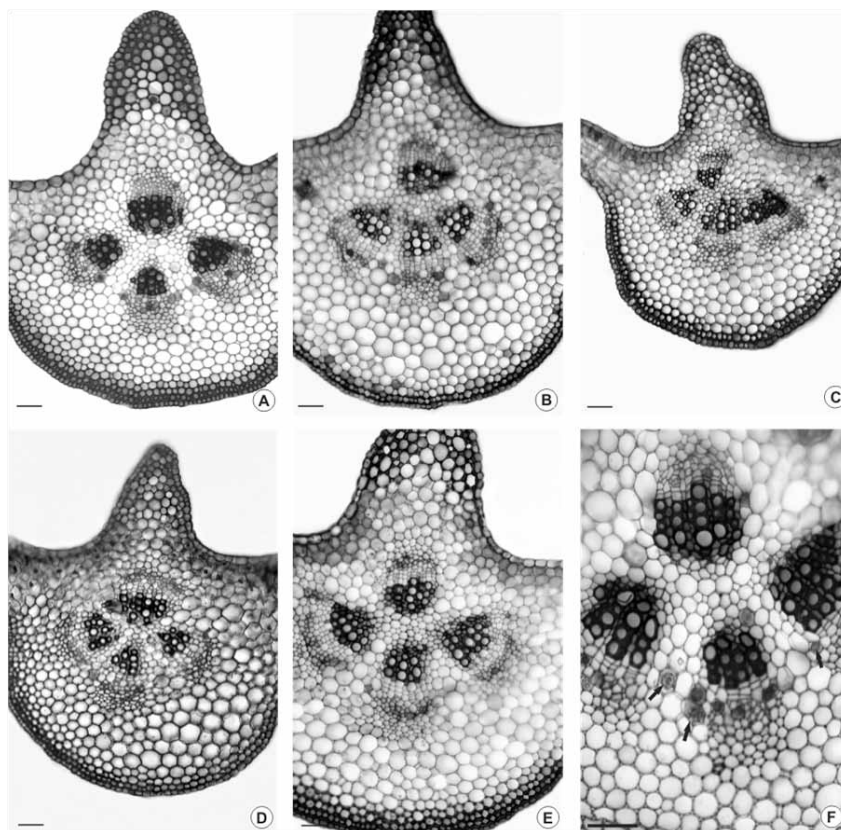


Figura 4. Seções transversais da lâmina foliar de *Passiflora edulis*, região da nervura principal, fotomicrografadas com aumento de 20x. A. T1 – Controle negativo, plantas não tratadas com fertilizante foliar e não inoculadas com o CABMV. B. T2 – Plantas somente tratadas com o fertilizante foliar. C. T3 – Plantas somente inoculadas com CABMV. D. T4 – Plantas inoculadas com CABMV e posteriormente tratadas com fertilizante foliar. E. T5 – Plantas inoculadas com CABMV e tratadas, antes e depois da inoculação, com fertilizante foliar. F. Detalhe do T1 mostrando a presença de drusas. Setas = drusas. Escala: 100µm.

Análise quantitativa

De todos os parâmetros avaliados, a densidade estomática foi o mais afetado pela infecção com o CABMV, diferente do observado nos diâmetros dos estômatos (Tabela 1), assim como nas espessuras de ambas as epidermes e cutículas, que não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

As plantas do T2, apenas tratadas com CABMV, apresentaram maior espessura média do parênquima esponjoso, e, conseqüentemente, maior espessura do limbo, visto que, nessa espécie, o parênquima esponjoso ocupa a maior parte do mesofilo (Figura 3). O parênquima esponjoso é responsável pela distribuição da luz difusa dentro da folha (Volgemann et al., 1996). Por isso, uma maior espessura deste tecido pode estar relacionada à melhor distribuição da luz nas folhas no tratamento.

As plantas do T3, inoculadas com CABMV e não tratadas com fertilizante foliar, apresentaram índice e densidade estomática significativamente menores do que de todos os outros tratamentos, além de menor espessura do limbo e do parênquima esponjoso (Tabela 1).

O T4, plantas inoculadas com CABMV e posteriormente tratadas com fertilizante foliar, foi o tratamento que apresentou maior índice de densidade estomática. Entretanto, as plantas do T2 também apresentaram uma alta densidade estomática em relação aos outros tratamentos (Tabela 1).

As plantas do T5, inoculadas com CABMV e tratadas antes e depois da inoculação com fertilizante foliar, apresentaram maior espessura média do parênquima paliçádico (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão do índice estomático (IE), densidade estomática (DE), diâmetro polar (DIP) e equatorial dos estômatos (DIE), espessura do limbo (EL), espessura da cutícula superior (CS) e da inferior (CI), espessura da epiderme superior (ES) e da inferior (EI), espessura do parênquima paliçádico (PP) e do esponjoso (PE).

	T1	T2	T3	T4	T5
IE (%)	18,47 ± 1,96*	18,14 ± 3,01*	14,15 ± 3,63*	19,41 ± 3,44*	17,82 ± 2,65*
DE (est./mm ²)	168,19 ± 41,35*	175,08 ± 40,15*	129,78 ± 39,07*	179,41 ± 54,66*	161,34 ± 34,4*

Tabela 1. Continuação.

	T1	T2	T3	T4	T5
DIP (μm)	21,84 \pm 1,78 ^{ns}	21,94 \pm 1,51 ^{ns}	21,10 \pm 1,80 ^{ns}	21,30 \pm 1,14 ^{ns}	21,67 \pm 1,61 ^{ns}
DIE (μm)	16,51 \pm 1,12 ^{ns}	16,73 \pm 1,02 ^{ns}	15,59 \pm 1,40 ^{ns}	15,28 \pm 0,83 ^{ns}	15,70 \pm 1,03 ^{ns}
EL (μm)	136,3 \pm 11,8*	165,3 \pm 34,6*	125,3 \pm 24,4*	143,1 \pm 12,9*	149,5 \pm 25,0*
CS (μm)	3,5 \pm 1,4 ^{ns}	3,8 \pm 1,6 ^{ns}	3,2 \pm 0,8 ^{ns}	3,7 \pm 0,7 ^{ns}	3,9 \pm 0,5 ^{ns}
CI (μm)	3,1 \pm 0,9 ^{ns}	3,0 \pm 1,4 ^{ns}	2,4 \pm 0,7 ^{ns}	3,2 \pm 0,7 ^{ns}	3,4 \pm 0,5 ^{ns}
ES (μm)	18,6 \pm 2,6 ^{ns}	19,3 \pm 1,9 ^{ns}	17,3 \pm 1,6 ^{ns}	18,2 \pm 1,4 ^{ns}	18,4 \pm 1,9 ^{ns}
EI (μm)	18,1 \pm 2,7 ^{ns}	19,1 \pm 1,5 ^{ns}	16,4 \pm 1,7 ^{ns}	16,4 \pm 1,5 ^{ns}	16,9 \pm 2,4 ^{ns}
PP (μm)	26,5 \pm 7,3 ^{ns}	33,1 \pm 5,8 ^{ns}	35,8 \pm 12,2 ^{ns}	35,1 \pm 9,1 ^{ns}	39,7 \pm 19,2*
PE (μm)	68,5 \pm 20,2*	95,1 \pm 26,6*	77,8 \pm 21,8*	92,4 \pm 24,1*	86,9 \pm 33,8*

ns (não significativo), * (significativo a $p < 0,05$ pelo teste de Tukey)

T1 – Controle negativo, plantas não tratadas com fertilizante foliar e não inoculadas com o CABMV. B. T2 – Plantas somente tratadas com o fertilizante foliar. C. T3 – Plantas somente inoculadas com CABMV. D. T4 – Plantas inoculadas com CABMV e posteriormente tratadas com fertilizante foliar. E. T5 – Plantas inoculadas com CABMV e tratadas, antes e depois da inoculação, com fertilizante foliar.

Discussão

Todos os nutrientes contidos no fertilizante possuem funções estruturais, além de atuarem como sinalizadores em situações de estresse biótico e abiótico. O Ca fortalece as paredes celulares, garantindo, assim, a estabilidade das paredes. Além disso, quando surgem sinais externos de estresse ambiental, infecção por patógeno ou injúria mecânica, os canais iônicos de Ca^{2+} são ativados, aumentando a concentração de Ca^{2+} no citoplasma (Kerbauy, 2004). Assim, ele estimula diversas enzimas e proteínas, entre elas as calmodulinas (moduladas pelo Ca^{2+}) e as quinases dependentes de Ca^{2+} , acionando os processos de defesa da planta.

Segundo Kerbauy (2004), o Mg atua na estabilidade das membranas e das paredes celulares. O S desempenha papel fundamental na desintoxicação por radicais livres e atua em constituintes das biomembranas. Enquanto o B possui funções relacionadas com a formação e a estabilização da parede celular, da interface da parede celular com a membrana plasmática e com a lignificação e diferenciação do xilema.

Possivelmente, a aplicação do fertilizante antes da inoculação com o vírus induz mecanismos de resistência estruturais pré-formados. Além disso, o Ca pode atuar na sinalização da infecção com o patógeno, contribuindo também para os mecanismos de resistência pós-formados.

As variações no grau de sinuosidade das células epidérmicas de acordo com o ambiente mostram que as condições ambientais como radiação solar influenciam o crescimento e o desenvolvimento dos tecidos vegetais (Passos et al., 2006).

As alterações observadas nas folhas das plantas inoculadas e não tratadas com o fertilizante foram observadas também por Moura et al. (2005) em folhas de *Cucurbita* sp. infectadas pelo *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), e, por Ferreira, et al. (2007) em folhas de *Solanum violaefolium*, infectadas pelo vírus *Solanum violaefoliumring spot virus* (SvRSV). Em folhas de mamoeiro *Carica papaya* infectadas pelos *Papaya mosaic virus* (PapMV) e *Papaya ringspot virus* (PRSV), também se observaram deformação foliar, hiperplasia das células parenquimáticas e desorganização do parênquima (García-Vieira et al., 2018). A hipertrofia de células vegetais infectadas por vírus pode estar relacionada à atividade do patógeno nas células hospedeiras (Lapierra; Signoret, 2004; Hull, 2009). Essa hipertrofia foi observada também nas células epidérmicas de plantas do T4 (Fig. 3D).

Alterações na organização dos feixes vasculares foram relatadas em folhas de outras espécies, como algodoeiro *Gossypium hirsutum* L., infectadas pelo vírus da doença azul e laranja, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, infectadas pelo *Citrus leprosis virus C* (Takimoto et al., 2009; Marques et al., 2010). Comparando-se *P. edulis* com diferentes espécies silvestres de *Passiflora* infectadas com o CABMV, esta foi a única que apresentou alterações visuais notáveis na organização dos feixes vasculares após a inoculação (Barbosa, 2016; Gonçalves et al., 2018). Tais alterações evidenciam que a espécie é suscetível à infecção pelo vírus, sendo essa característica confirmada por meio de análises moleculares e de índice de severidade da doença (Gonçalves et al., 2018).

Nayudu (2008) relatou a ocorrência de estreitamento da folha e até mesmo supressão completa da lâmina em tomate duplamente infectado por *Tobacco mosaic virus* (TMV) e *Cucumber mosaic virus* (CMV). A redução da espessura da lâmina foliar, associada à redução do tamanho da folha devido

à hipoplasia, ocorre frequentemente em folhas com sintomas de mosaico (Sumbali; Mehrota, 2009). O desenvolvimento desigual da lâmina foliar de plantas infectadas por vírus está relacionado ao enrugamento da superfície, sendo esse sintoma observado nas folhas de maracujazeiro infectadas pelo CABMV (Nayudu, 2008).

A densidade estomática em geral está positivamente relacionada com as trocas gasosas, pois o aumento da densidade está associado à maior condutância estomática, evitando que a fotossíntese seja limitada sob condições adversas (Justo et al., 2005; Lima et al., 2006).

As alterações histológicas observadas nas folhas de *Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.* mostram como o CABMV interfere estruturalmente na planta, sendo que tais modificações estruturais podem estar relacionadas a alterações funcionais. Assim, podemos considerar as análises de anatomia vegetal como uma ferramenta muito útil para a compreensão de problemas fitopatológicos, contribuindo para a resolução desses problemas.

Conclusões

- *Passiflora edulis* infectada pelo CABMV apresenta grandes alterações na forma das células epidérmicas, na espessura da lâmina foliar e dos parênquimas paliçádico e esponjoso, na organização dos feixes vasculares, na densidade e no índice estomático.
- Plantas infectadas pelo CABMV e tratadas com fertilizante foliar sofrem menores alterações nas características histológicas, especialmente quando a aplicação ocorre antes da inoculação.

Agradecimentos

À Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia, pela concessão da bolsa-estágio, à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Mandioca e Fruticultura, pelo auxílio financeiro e pela disponibilidade das plantas, ao CETAB onde foi realizada parte do experimento, ao Laboratório de Anatomia Vegetal e Identificação de Madeiras (LAVIM), do Instituto de Biologia da UFBA, onde foram realizadas as análises histológicas, e à Fapesb, pelo auxílio financeiro.

Referências

- aGUIAR, T.V.; SANT'ANNA-SANTOS, B.F.; AZEVEDO, A.A.; FERREIRA, R.S. ANATI QUANTI: software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta Daninha**, v.25, n.4, p.649-659, 2007.
- BARBOSA, N.C.S. **Anatomia foliar e diversidade genética em *Passiflora* spp. (*Passifloraceae* L.) resistentes ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)** 2016. 119 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, Salvador, 2016.
- BORGES, R.S.; SCARANARI, C.; NICOLI, A.M.; COELHO, R.R. Novas variedades: validação e transferência de tecnologia. In: Faleiro FG, Junqueira NTV, Braga MF. **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p.619-639.
- BIOCHEM. **Produtos Plantytec**, 2012. Disponível em: <http://biochem.co.mz/produtos/produtos-adheflex>, Acesso em: 28 de dezembro de 2018.
- CAVICHIOLO, J.C.; CORREA, L.S.; BOLIANI, A.C.; SANTOS, P.C. Desenvolvimento e produtividade do maracujazeiro-amarelo enxertado em três porta-enxertos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.567-574, 2011.
- EDREVA, A. A novel strategy for plant protection: Induced resistance. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v.3, p.61-69, 2004.
- ESAU, K. Anatomy of plant virus infections. **Annual Review of Phytopathology**, v.5, p.45-74, 1967.
- FAJARDO, T. V. M.; NICKEL, O. Técnicas de detecção e estudo de vírus em plantas. **Comunicado Técnico 179**, Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015.
- FARIAS, V.; ROCHA, L.D.; PREUSSLER, K.H.; MARANHO, L.T. Organização estrutural da folha de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum, Myrtaceae. **Acta Botanica Brasilica**, v.23, p.398-406, 2009.
- FERREIRA, P.T.O.; LOCALI-FABRIS, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; GOMES, R.T.; MACHADO, M.A.; KITAJIMA, E.W. Caracterização de um vírus baciliforme isolado de *Solanum violaeifolium* transmitido pelos ácaros *Brevipalpus phoenicis* e *Brevipalpus obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). **Summa phytopathologica**, v.33, p.264-269, 2007.
- FISCHER, I.H.; KIMATI, H.; REZENDE, J.A.M. Doenças do maracujazeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4 ed, v. 2, São Paulo: Ceres, 2005. p.467-474.
- GARCÍA-VIEIRA, M.A.; SÁNCHEZ-SEGURA, L.; CHAVEZ-CALVILLO, G.; JARQUÍN-ROSALES, D.; SILVA-ROSALES, L. Changes in leaf tissue of *Carica papaya* during single and mixed infections with Papaya ringspot virus and Papaya mosaic virus. **Biologia Plantarum**, v.62, n.1, p.173-180, 2018.
- GONÇALVES, Z.S.; LIMA, L.K.S.; SOARES, T.L.; ABREU, E.F.M.; BARBOSA, C.J.; CERQUEIRA-SILVA, C.B.M.; JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J. Identification of *Passiflora* spp. genotypes resistant to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* and leaf anatomical response under controlled conditions. **Scientia Horticulturae**, v.231, p.166-178, 2018.
- HULL, R. **Comparative plant virology**. 2ª Ed. San Diego:Elsevier Academic Press, 2009. 400p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados agregados. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA, 2016** : (produção agrícola municipal). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 18 de julho de 2018.

IRSHAD, M.; ABBAS, G.; ASLAM, Z.; ABBAS, Z.; ASLAM, M.; KHOKHAR, M.B.; AMER, M. Nutrient management for *Cotton Leaf Curl Virus* (CLCV), Begonovirus. **Crop & environment**, v.3, p.32-36, 2012.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; UESUGI, C.H.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BELLON, G.; SANTOS, E.C.; RAMOS, L.N. Desempenho agrônômico de maracujazeiros tratados com produtos alternativos e fertilizantes foliares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.40-47, 2011.

JUSTO, C.F.; SOARES, A.M.; GAVILANES, M.L.; CASTRO, E.M. Leaf anatomical plasticity of *Xylopiya brasiliensis* Sprengel (Annonaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.19, p.111-123, 2005.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 2004. São Paulo: Guanabara Koogan.

LAPIERRA, H.; SIGNORET, P.A. **Virus and virus diseases of poaceae (Gramineae)**. Inra editions, 2004, 857p.

LIMA, E.C.L.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M.; VIEIRA, C.V.; BARBOSA, J.P.R.A.D. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* Camb. submetidas a diferentes níveis de sombreamento, **Revista Árvore**, v.30, p.33-41, 2006.

MARQUES, J.P.R.; KITAJIMA, E.W.; FREITAS ASTUA, J.; APPEZZATO DA GLÓRIA, B. Comparative morpho-histological studies of the lesions caused by citrus leprosis virus on sweet orange. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.82, p.501-511, 2010.

MONTERO, R.; EL AOU OUAH, H.; PACIFICO, D.; MARZACHI, C.; CASTILLO, N.; GARCÍA, E.; DEL SAZ, N.F.; FLOREZ-SARASA, I.; FLEXAS, J.; BOTA, J. Effects of Grapevine leafroll-associated virus 3 on the physiology in asymptomatic plants of *Vitis vinifera*. **Annals of Applied Biology**, v.171, n.2, pp. 155-171, 2017.

MOURA, M.C.C.L.; ZERBINI, F.M.; SILVA, D.J.H.; QUEIROZ, M.A. Reação de acessos de *Cucurbita* sp. ao *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV). **Horticultura Brasileira**, v.23, p.206-210, 2005.

NASCIMENTO, A.V.S., SANTANA, E.N., BRAZ, A.S.K., ALFENAS, P.F., PIO-RIBEIRO, G., ANDRADE, G.P., CARVALHO, M.G.; ZERBINI, F.M. 2006. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in Passion fruit in Brazil, and causes Passion fruit woodiness disease. **Archives of Virology**, v.151, n.9, p.1797-1809.

NAYUDU, M. V. **Plant viruses**. New Delhi:Tata McGraw-Hill, 2008.

NOGUEIRA-FILHO, G.C.; RONCATTO, G.; RUGGIERO, C.; OLIVEIRA, G.C.; MALHEIROS, E.B. Estudo da enxertia hipocotiledonar do maracujazeiro-amarelo sobre dois portaenxertos, através de microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.32, p.647-652, 2010.

ORAWU, M.; MELIS, R.; LAING, M.; DERERA, J. Genetic inheritance of resistance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in cowpea. **Euphytica**, v.189, p.191–201, 2013.

PASSOS, M.A.B.; MENDONÇA, M.S. Epiderme dos segmentos foliares de *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae) em três fases de desenvolvimento. **Acta Amazônica**, v.36, p.431-436, 2006.

PERVEZ, H.; ASHRAF, M.; MAKHDUM, M.I.; MAHMOOD, T. Potassium nutrition of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in relation to cotton leaf curl virus disease in aridsols. **Pakistan Journal of Botany**, v.39, p.529-539, 2007.

PINTO, P.H.D.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V.; RESENDE, R.O.; MATTOS, J.K.A.; MELO, B. 2008. Reação de genótipos de maracujazeiro-azedo ao vírus do endurecimento do fruto (*Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV). **Bioscience Journal**, v.24, n.2, p.19-26.

ROSSATTO, D.R.; KOLB, R.M. *Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera (Asteraceae) changes in leaf structure due to differences in light and edaphic conditions. **Acta Botanica Brasílica**, v. 24, p. 605-612, 2010.

SOUSA, N.C.M. **Ação de fertilizantes organominerais e acilbenzolar - S - metil sobre transmissão viral por *Bemisia tabaci* biótipo B (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae), em tomateiro**. 2015. 68 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SUMBALI, G.; MEHROTA, R. S. **Principles of Microbiology**. New Delhi: Tata McGraw Hill, 2009, 948p.

TAKIMOTO, J.K.; QUEIROZ-VOLTAN, R.B.; SOUZA-DIAS, J.A.C.; CIA, E. Alterações anatômicas em algodoeiro infectado pelo vírus da doença azul. **Bragantia**, v.68, p.109-116, 2009.

VOLGEMANN, T.C; NISHIO, J.N.; SMITH, W.K. Leaves and light capture: light propagation and gradients of carbon fixation within leaves. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.1, n.2, p.65-70, 1996.

WHITWORTH, J.L.; NOLTE, P.; MCINTOSH, C.; DAVIDSON, R. Effect of *Potato virus Y* on yield of three potato cultivars grown under different nitrogen levels. **Plant Disease**, v.90, p.73-76, 2006.

ZANON, S. G., LUCAS KENNEDY SILVA LIMA, L. K.S. SOARES, T.L., ABREU, E.F.M.; BARBOSA, C.J., CERQUEIRA-SILVA, C.B.M., JESUS, O.N.; OLIVEIRA, E.J. Identification of *Passiflora* spp. genotypes resistant to Cowpea aphid-borne mosaic virus and leaf anatomical response under controlled conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 231, p.166-178, 2018.



Mandioca e Fruticultura

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

CGPE 15639