

**AVALIAÇÃO HISTOQUÍMICA DE FOLHAS DE MARACUJAZEIRO
COMPROMETIDAS PELO VÍRUS DO ENDURECIMENTO DO FRUTO
(CABMV) E TRATADAS COM FERTILIZANTE FOLIAR**

**Naira Costa Soares Barbosa^{1,5}, Cristiane de Jesus Barbosa², Marcela Souza³,
Kelly Regina Batista Leite^{4,5}, Lazaro Benedito da Silva^{4,5}**

¹Graduanda do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA

³Laboratório de Fitopatologia, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola, Salvador, BA

⁴Professor adjunto, Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA

⁵Laboratório de Anatomia Vegetal e Identificação de Madeiras (LAVIM) -
Universidade Federal da Bahia

Palavras-chave: *Cowpea aphid-borne mosaic virus*, fitoquímica, *Passiflora edulis* Sims.

Introdução

O maracujá-amarelo, *Passiflora edulis* Sims. fv. *flavicarpa*, é uma espécie de grande importância econômica para o Brasil, devido à qualidade dos frutos, à divulgação junto aos consumidores e ao incentivo da agroindústria (BERNACCI et al., 2003). O fruto tem se destacado na fruticultura nacional, mesmo comparado a outras frutas tropicais com maior tradição de consumo, por oferecer rápido retorno econômico, bem como a oportunidade de uma receita distribuída pela maior parte do ano (MELETTI, 2011). Entre 2005 e 2010, a produção brasileira avançou de 480 mil a 920 mil toneladas (IBGE, 2012). Embora tenha ocorrido aumento da produtividade, nos últimos 30 anos observou-se vários ciclos de retração e expansão da cultura, sendo causados em partes por problemas fitopatológicos (MELETTI, 2011). As doenças de etiologia viral destacam-se como um dos grandes problemas enfrentados pelos passicultores, especialmente a causada pelo vírus do endurecimento dos frutos, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (RIBEIRO et al., 2006). A doença é caracterizada por mosaico e distorção das folhas, diminuição do número de frutos produzidos, endurecimento dos frutos e redução do pericarpo, diminuindo seu valor comercial, causando assim danos quantitativos e qualitativos à produção (MORAES, 2002; NASCIMENTO et al., 2004; 2006). A transmissão do vírus ocorre por meios mecânicos e também por pulgões (KITAJIMA et al., 1986) e ainda não se conhece uma medida de controle efetiva (JUNQUEIRA, 2005; MORAES, 2002; NASCIMENTO et al., 2006; ALFENAS et al., 2005), por ser o maracujazeiro uma planta com longo período de cultivo e o vírus

transmitido de forma não persistente por afídeos, os esforços para controlar a doença pelo combate ao vetor têm demonstrado pouca eficiência (PIO-RIBEIRO & MARIANO, 1997). Por isso, as recomendações técnicas são relacionadas a medidas de exclusão, com o objetivo de evitar a disseminação do vírus por áreas indenadas ou convivência com o vírus nas áreas medianamente afetadas (MELETTI, 2005).

Uma forma possível de minimizar os danos provocados pelo vírus é através da utilização de fertilizantes foliares. Há relatos de que a utilização semanal do produto em plantas infectadas por vírus, apresentando sintomas visíveis, resultou em melhora do aspecto das mesmas, que voltaram a seu desenvolvimento normal, sem os sintomas. Porém, não há trabalhos científicos que comprovem que o uso de adubo foliar melhora os sintomas em plantas infectadas por vírus. Segundo SOUZA-DIAS (2006), os resultados da ação do fertilizante se equiparam a uma indução de tolerância da hospedeira ao vírus, que pode ser reversível, pois em casos aplicação de forma irregular, observa-se retorno dos sintomas.

As plantas possuem diferentes mecanismos estruturais e bioquímicos, geneticamente determinados, que podem contribuir para a resistência das mesmas contra fitopatógenos, sendo sua efetividade dependente da expressão dos mesmos no momento certo, em magnitude adequada e em uma sequência lógica, após o contato do patógeno com o hospedeiro (PASCHOLATI & LEITE, 1995). Os autores citados afirmam também que a indução da resistência é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento inicial, com o indutor, e a subsequente inoculação do patógeno. Isso indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e o acúmulo de substâncias, são importantes no fenômeno da resistência induzida.

No caso da espécie em questão, *Passiflora edulis*, ainda não há estudos fitoquímicos com plantas infectadas pelo vírus do endurecimento do fruto. Portanto, o presente trabalho teve como objetivos analisar os compostos químicos presentes em folhas de *Passiflora edulis* infectados pelo vírus CABMV, pulverizados ou não com fertilizante foliar, com plantas normais. Assim, visa à caracterização histoquímica das folhas de plantas contaminadas e à avaliação da ação do fertilizante sobre as modificações provocadas pelo vírus, refletindo no desenvolvimento da planta.

Materiais e métodos

As plantas utilizadas foram provenientes de sementes de maracujá, *P. edulis*, obtidas a partir de trabalhos de pesquisa desenvolvidos pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. A semeadura foi feita em sacos de polietileno preenchidos com substrato composto com terra de barranco, terra vegetal, calcário dolomítico, superfosfato simples e cloreto de potássio. O ensaio foi mantido em casa telada, na área experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA), e consistiu de 5 tratamentos: T1 – testemunho, plantas não pulverizadas e não inoculadas com o vírus, T2 – plantas pulverizadas com o fertilizante, T3 - plantas não pulverizadas e inoculadas com

CABMV, T4 – plantas pulverizadas após a inoculação com CABMV e T5 – plantas pulverizadas antes da inoculação com CABMV.

O fertilizante foliar utilizado foi o Adhevir's, que apresenta em sua composição Ca a 5,0%; B, 1,0%; Mg, 1,0%; S, 1%; COT, 5%. Sua densidade é de 1,25 g/cm³.

Para o tratamento T2, a primeira pulverização ocorreu 90 dias após a germinação, e posteriormente foram realizadas pulverizações semanais com o fertilizante foliar na concentração de 1 ml/l. Até a data da coleta, as plantas haviam sido pulverizadas 7 vezes. As plantas do T3 foram inoculadas mecanicamente após, aproximadamente, 120 dias de idade, com extrato de folhas infectadas com CABMV, com sintomas da doença do endurecimento dos frutos. Para a obtenção do extrato, as folhas infectadas foram maceradas em almofariz, em uma proporção de 2 g de folha infectada para 8 mL de solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0 com sulfito de sódio. Para a inoculação, foram utilizadas 2 folhas de cada indivíduo, sendo escolhidas as mais novas. As folhas foram pulverizadas com uma pequena quantidade do abrasivo Carborundum (óxido de alumínio), para provocar ferimentos nas células, e posteriormente aplicou-se o extrato friccionando as partes superiores das folhas com os dedos, por três vezes consecutivas para padronizar a pressão de inóculo. Após 2 minutos da inoculação as folhas foram lavadas, para retirar o excesso do abrasivo. Para o tratamento T4, após 15 dias a partir da data da inoculação, foi realizada a primeira pulverização, e assim foram realizadas pulverizações sucessivas. No tratamento T5, após 5 pulverizações com o fertilizante, foi realizada a inoculação, procedendo-se como no tratamento T3.

Para a realização dos testes histoquímicos, foram realizadas seções transversais da região da nervura central das folhas, à mão livre, com lâmina de barbear, em material fresco. O material foi submetido aos testes com cloreto férrico 10% (Johansen, 1940), para compostos fenólicos; cloreto de zinco iodado (Jensen, 1962), para celulose, lignina e amido; floroglucinol acidificado (Johansen, 1940), para lignina; lugol (Berlyn & Miksche, 1976), para amido; Sudan IV (Gerlach, 1984), para lipídios; e ácido clorídrico 10% (Chamberlain, 1932) para cristais. As lâminas obtidas foram fotomicrografadas utilizando-se microscópio Zeiss AX10 Scope.A1, acoplado a câmera Canon.

Resultados e Discussão

O cloreto férrico apresenta coloração verde escura para compostos fenólicos. Em todos os tratamentos a reação foi positiva no parênquima paliçádico e lacunoso. Porém para o T5, a reação foi mais intensa que para os outros tratamentos.

Muitos compostos fenólicos agem na defesa do vegetal contra agentes patogênicos, sendo sintetizados em resposta à infecção, limitando a propagação do patógeno invasor (Taiz & Zeiger, 1998). Pelos resultados do teste realizado, pode-se afirmar que o T5, de plantas pulverizadas antes da inoculação, foi o que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos, o que representa possivelmente um mecanismo de defesa. O fato

de ter sido pulverizada antes da inoculação pode ter gerado uma resposta mais eficiente da planta quando submetida ao patógeno.

O cloreto de zinco iodado apresenta coloração azul para celulose, amarela para lignina e negra-azulada para amido. Em todos os tratamentos, foi positiva para celulose na epiderme, e na nervura principal foi positiva no colênquima, parênquima e floema. Para lignina foi positiva no xilema em todos os tratamentos. E para amido foi positiva no parênquima paliçádico e lacunoso, sendo que no T4, a reação foi mais intensa no parênquima paliçádico em relação aos outros tratamentos.

O lugol é também utilizado para detectar amido, apresentando coloração azulada. Em todos tratamentos, foi positiva no parênquima paliçádico e lacunoso. Porém foi mais intensa no parênquima paliçádico para os tratamentos T3 e T4, em relação aos outros tratamentos.

Os testes realizados demonstraram que o amido esteve presente em maior quantidade em T4, principalmente no parênquima paliçádico. Em T3 também esteve presente em grande quantidade.

O amido é o principal carboidrato de armazenamento na maioria das folhas, e é formado diretamente a partir da fotossíntese, sendo que se acumula na luz diurna quando a fotossíntese excede as taxas combinadas de respiração e translocação (SALISBURY & ROSS, 2012). Segundo Da Matta et al. (1997), em seu trabalho com espécies de *Coffea*, o acúmulo de amido nas folhas do cafeeiro durante a época fria seria uma consequência da redução nas taxas de crescimento e importante causa da inibição da fotossíntese. Dias-Filho (2005) também correlacionou o acúmulo de amido nas folhas como responsável pela diminuição da fotossíntese.

Leite e Pascholati (1995) correlacionam o aumento dos níveis de alguns substratos, como amido e açúcares solúveis, que se acumulam, com o aumento da respiração, em plantas infectadas. Os autores explicam que a respiração de um hospedeiro infectado aumenta porque os tecidos doentes passam a utilizar suas reservas de carboidratos, aumentando a atividade metabólica. Ocorre também a biossíntese e o acúmulo de diversos compostos, sendo alguns diretamente ligados aos mecanismos de defesa.

O floroglucinol apresenta coloração vermelha para lignina. Em todos os tratamentos, a reação foi positiva apenas no xilema, e não houve diferenças quanto à intensidade da reação.

O Sudan IV apresenta coloração vermelha para lipídios em geral, cutina e suberina. Em todos os tratamentos a reação foi positiva na cutícula e parênquima, sendo que no parênquima foi possível a observação de gotículas de lipídios. Em T1 e T5 a reação foi mais intensa. Enquanto em T3, observou-se poucas gotículas de lipídios no parênquima lacunoso e ainda menos no paliçádico.

Os lipídios nas plantas tem como principal função a armazenagem de carbono, sendo que a biossíntese de gorduras e óleos requer um investimento grande de energia metabólica (Taiz & Zeiger, 1998).

O ácido clorídrico, utilizado para testar a composição dos cristais, sendo que em contato com o ácido, os cristais de oxalato de cálcio se dissolvem sem haver efervescência. Para todos os tratamentos, o teste revelou que os cristais eram compostos de oxalato de cálcio.

Referências

ALFENAS, P. F.; BRAZ, A. S. K.; TORRES, L. B.; SANTANA, E. N.; NASCIMENTO, A. V. S. DO; CARVALHO, M. G. DE; OTONI, W. C.; ZERBINI, F. M. Plantas transgênicas de maracujá-amarelo expressando um RNA derivado do genoma do *Cowpea aphid-borne mosaic virus* são resistentes ao endurecimento dos frutos. Fitopatologia Brasileira; volume 30, número 1, páginas 33-38. Fevereiro 2005.

BERNACCI, Luís Carlos; MELETTI, Laura Maria Molina; SOARES-SCOTT, Marta Dias. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, p. 355-356, Agosto 2003.

DA MATTA, F.M.; MAESTRI, M.; MOSQUIM, P.R.; BARROS, R.S. 1997a. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. Plant Sci., 128, 43-50

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Maracujá: área plantada e quantidade produzida. Brasília, 2010. (Produção Agrícola Municipal, 2005 a 2010). Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 12 de agosto de 2012.

KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.W.; CRESTANI, O.A. Enfermidades de etiologia viral e associadas a organismos do tipo micoplasma em maracujazeiro no Brasil. Fitopatologia Brasileira, v.11, p.409-432, 1986.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, Volume Especial, E. 083-091, Outubro 2011.

MORAES, M. C.; VIEIRA, M. L. C. NOVAES, Q. S.; REZENDE, J. A. M. Susceptibilidade de *Passiflora nitida* ao *Passion fruit woodiness virus*. Fitopatol. bras. 27(1), jan - fev 2002.

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 passionfruit in Brazil, and causes passionfruit woodiness disease. Archives of Virology 151:1797-1809.

NASCIMENTO, A.V.S., SOUZA, A.R.R., ALFENAS, P.F., ANDRADE, G.P., CARVALHO, M.G., PIO-RIBEIRO, G. & ZERBINI, F.M. Análise filogenética de potyvírus causando endurecimento dos frutos do maracujazeiro no Nordeste do Brasil. Fitopatologia Brasileira 29:378-383. 2004.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. Manual de fitopatologia. São Paulo : Ceres, 1995. p.393-416.

PIO-RIBEIRO, C.; MARIANO, R. L. R. Doenças do maracujazeiro. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. Manual de fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ceres, 1997. p. 488-497.

RIBEIRO, L.M. ; PEIXOTO, J.R. ; ANDRADE, S.R.M. de ; MERCADANTE-SIMÕES, M.O.; FONSECA, R. S. ; VIEIRA, L.M. . Organogênese In Vitro em acessos de Maracujazeiro amarelo infectados pelo vírus CABMV. UNIMONTES Científica, v. 8, p. 87-98, 2006. ; Meio de divulgação: Vários; Série: 1; ISSN/ISBN: 15192571.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. Fisiologia das plantas. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. 1998. Plant physiology. 2nd. Ed. Sunderland, Sinauer.