**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”**

**LCB5735 – Anatomia Vegetal**

Profa. Dra. Beatriz Appezzato da Glória

**AUXÍLIO DA HISTOPATOLOGIA NO ENTENDIMENTO DOS PATOSSISTEMAS: EXEMPLOS RECENTES**

**Discentes**:

Fernanda P. Del Corona – 14373681

Vitoria B. P de Assis - 13427744

1. **Introdução**

A microscopia iniciou-se por Robert Hooke que, em 1665, publicou o primeiro artigo descrevendo um fungo por meio de seu microscópio. Adicionalmente, Hooke cunhou o termo “célula” e instigou outros cientistas de sua época a observá-la através de lentes. Dessa forma, a descoberta de microrganismos e o aprofundamento no estudo de células, por meio dos microscópios, colaborou para o entendimento e avanço das diferentes vertentes da ciência, moldando as diversas áreas do conhecimento atual (Haavisto, V., 2022).

A Fitopatologia, área da ciência que estuda doenças de plantas, investiga tanto o patógeno em si (microorganismos), como também a relação patógeno-planta hospedeira-ambiente (triângulo da doença). Unindo a histopatologia à fitopatologia cria-se um entendimento mais detalhado de diversos patossistemas, podendo através dele determinar quais artifícios os patógenos utilizam para infectar, colonizar e se reproduzir nas plantas. Saber como o microorganismo completa seu ciclo no hospedeiro ajuda a determinar qual o melhor método de manejo a ser explorado (Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., 2018).

Além disso, entender qual o comportamento da planta frente à doença é muito importante, sabe-se que na maioria das vezes a planta consegue se defender dos microrganismos tanto de forma química quanto de forma estrutural, evitando a progressão das doenças. Desta forma, a histopatologia é fortemente empregada como ferramenta para o entendimento dos agentes fitopatogênicos e sua interação, principalmente, com a planta hospedeira na qual resulta a doença. Portanto, o objetivo deste trabalho foi citar exemplos dos quatro principais fitopatógenos, e alguns exemplos práticos de como as plantas se defendem estruturalmente de microrganismos (Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., 2018).

**2. Subáreas do conhecimento**

2. Bacteriologia - Huanglongbing ou Greening dos Citros

 A doença Huanglongbing (HLB) é hoje o principal problema fitossanitário e a maior ameaça da cultura dos citros. Seu agente causal já foi considerado um micoplasma por suas características de sintomas e localização no floema, mas nunca provado. Isso se deve ao fato de que nunca foi isolado em meio de cultura pura. Apesar dos inúmeros esforços e técnicas empregadas para isolar o patógeno, nenhuma tentativa foi bem sucedida. Até que em 1984, Monica Garnier e Joseph Bové provaram, por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), a natureza bacteriana e Gram negativa do agente, o qual recebeu a classificação de ‘Candidatus *Liberibacter asiaticus’* (CLas) (Bové, J., 2006).

 Os estudos mais recentes ainda dependem do MET para extrair mais informações sobre o patógeno, sua interação com a planta hospedeira, e principalmente as consequências dessa interação, a qual resulta na morte da planta. Pelos cortes, foi possível observar a formação de calose nos poros das placas crivadas dos elementos crivados do floema. Entretanto, a presença e ausência de células bacterianas nas proximidades dos poros são fator determinante para a formação de calose, redução dos níveis de reactive oxygen species (ROS) e íons de cálcio (Ca2+). Os principais cientistas deste estudo formaram duas hipóteses com base em suas observações nas seções longitudinais dos elementos do floema e suas placas crivadas de diferentes órgãos do citros. Em ambas hipóteses a planta está infectada, entretanto, a primeira situação na qual as células bacterianas não estavam presentes em uma determinada região do floema, o sistema de defesa da planta hospedeira foi acionado e houve o aumento da deposição de calose nos poros das placas, assim como um aumento dos níveis de ROS e Ca2+. Porém, nas seções onde se encontram grande quantidade de células bacterianas de CLas, o inverso foi observado: pouca deposição de calose e os poros das placas crivadas estavam com o diâmetro maior, e os níveis de ROS e Ca2+ reduzidos. Desta forma, conclui-se que a acumulação de CLas nos elementos do floema inibe a deposição de calose e suprime a concentração de ROS e Ca2+ (Achor, D., et al, 2020; Bernardini, C., et al, 2022).

2. Virologia - blunervirus tomato fruit blotch virus (ToFBV) e Leprose dos Citros (CiLV-N e CiLV-C)

 Uma das formas de enriquecer o conhecimento em viroses de plantas e suas estratégias de interação e parasitismo com a planta hospedeira é por meio de MET. Visto que partículas virais têm em torno de 50-60 nm por 120 nm, e localizam-se próximas a diferentes estruturas celulares como retículo endoplasmático e a região perinuclear. Em alguns casos como *Citrus Leprosis Virus* tipo nuclear (CiLV-N), o vírus consegue adentrar o núcleo celular e se replicar. Essa identificação só foi possível pelo uso do MET (Kitajima, E., et al, 2022).

 Outra observação relevante é que os efeitos citopáticos são considerados características da biologia viral e estão relacionados diretamente com os traços dos genomas virais. Realmente, dentro de um gênero de vírus ou até mesmo em uma família, as espécies virais compartilham as mesmas similaridades de interação celular e localização intracelular. Desta forma, a identificação dessas características são imprescindíveis para a correta classificação taxonômica dos vírus fitopatogênicos (Kitajima, E., et al., 2022).

 Similarmente, a microscopia de luz também foi uma ferramenta útil para identificar características de fitoviroses, que neste caso, de estruturas pós-formadas nos tecidos vegetais durante a infecção por vírus. Um exemplo disso são as formações de ductos traumáticos de goma próximos aos feixes vasculares observados em frutos e folhas de citros infectadas com CiLV-N. Interessante notar que nos tecidos infectados com o tipo citoplasmático (CiLV-C) não foram observadas essas características. Esse fato complementa as já conhecidas diferenças entre os dois tipos de vírus, no qual são duas espécies diferentes mas que causam a mesma doença e são transmitidos pelo mesmo gênero de ácaro, *Brevipalpus* spp. (Marques, J., et al, 2010) .

**2.1. Meloidoginose**

 Através das análises histológicas é possível elucidar de forma prática como alguns patossistemas funcionam, muitas das vezes conhecer como ocorre os processos do ciclo das doenças garante estratégias mais eficazes de controle. Um patógeno muito importante, é o nematoide que é parasita de plantas e que ameaça constantemente a agricultura. Suas perdas são expressivas pois causam danos às raízes que são refletidos na parte aérea. Esses animais são endoparasitas obrigatórios, ou seja, são seres que dependem exclusivamente do seu hospedeiro. Para sobreviver, os juvenis de estágio dois penetram nas plantas através da raiz, infectam o córtex até chegar no cilindro vascular, onde colonizam as células presentes na endoderme e no periciclo. Após a infecção, os nematoides estabelecem um sítio de alimentação chamado de cenócito, ou células gigantes, que são células de tamanho anormal que possuem muitos núcleos e um protoplasma denso. A função desta célula é garantir que todo produto fotoassimilado pela planta seja absorvido por meio dos plasmodesmos, e alimente o nematoide. A quantidade e o tamanho das células gigantes dependem de vários fatores, sendo um deles a concentração do inóculo inicial. Desta forma, quanto maior a quantidade de espécimes, maior serão as alterações morfológicas na planta. Com o avanço na colonização há hipertrofia e hiperplasia das células corticais que mais tarde darão origem às galhas que são os principais sintomas do gênero *Meloidogyne*. Com o aumento das galhas e das células gigantes o cilindro vascular fica deformado e comprometido, dando origem aos sintomas secundários relacionados ao estresse hídrico e uma queda no crescimento da planta (FERRAZ & BROWN, 2016; DANISH, M., et al, 2021; MONTEIRO & SASSER, 1983).

**2.2. Antracnose**

 A antracnose é uma doença muito disseminada dentro da agricultura pois possui muitos hospedeiros e isto dificulta o seu controle. O fungo causador da doença é o *Colletotrichum*, e é um patógeno hemibiotrófico que possui uma fase quiescente entre a infecção e a colonização. Os sintomas mais comuns da doença são lesões necróticas deprimidas em frutos, e nas folhas as lesões muitas das vezes são angulares distribuídas por todo o limbo foliar. No início do processo de infecção os conídios aderidos à superfície emitem um tubo germinativo e que possui na ponta uma estrutura denominada apressório que facilita a entrada do patógeno na célula do hospedeiro. Na macieira, foi observado que no processo de infecção o conídio produz enzimas que degradam a cutícula deixando-a mais fina, e logo depois emite uma hifa infectiva que é capaz entrar em contato com a célula do hospedeiro. Neste momento, ao atingir a parede celular o patógeno se alimenta da célula sem a matar, e permanece lá até que as condições estejam favoráveis à colonização, este processo é chamado de biotrofismo. Diferente da infecção, na colonização o fungo mata as células do hospedeiro para poder extrair seu conteúdo e continuar seu ciclo e é neste estágio que observamos os primeiros sintomas da doença, ou seja. A histologia permite ao fitopatologista definir melhor processos e documentar as características de cada patógeno em cada hospedeiro, e este conhecimento ajuda a determinar estratégias de manejo pautadas na interrupção do ciclo do patógeno (SHANG, et al., 2020).

**2.3. Mecanismo de Defesa Estruturais Pré e Pós- Formados**

As plantas podem se defender dos patógenos de duas maneiras, quimicamente ou de maneira estrutural. Além disso, a defesa pode ser inata ou induzida após o aparecimento do patógeno. De toda forma, possuir ou não possuir essas características é que diferencia plantas resistentes de plantas suscetíveis. Se tratando de mecanismos de defesa estruturais pré-formados, observa-se que são pequenas diferenças que definem a doença, um exemplo é o que acontece entre a bactéria *Xanthomonas axonopodis pv. citri* e o citros. Na laranja, é uma doença muito comum e sua disseminação é feita através de aerossóis. Quantos às gotas de água entram em contato com os estômatos das folhas, o fluxo contínuo da lâmina de água consegue entrar dentro dos estômatos e isso faz com que as células bacterianas tenham acesso à câmara subestomática e continuem o processo de infeção. Na tangerina foi observado certa resistência à doença, e ao analisar a estrutura foliar foi visto que em alguns casos havia uma saliência sobre o estômago, que foi chamado de crista cuticular. Essa alteração na morfologia impedia a continuidade da lâmina de água na câmara subestomática, evitando a penetração das bactérias na folha (PASCHOALATTI & LEITE, 1995).

 Um outro caso interessante de Mecanismo de defesa estrutural, mas dessa vez pós formado é a formação de tilos dentro dos elementos de condução do xilema. Os tilos são estruturas provenientes do protoplasma de células parenquimáticas do xilema, e sua produção é iniciada quando a planta percebe a presença do patógeno. Assim, ao avaliar o progresso de *Ceratocystis fimbriata* em eucalipto, foi observado a formação de tilos nas plantas que foram inoculadas. Entretanto, nas variedades resistentes a essa doença havia deposição de lignina no tilos, diferente da variedade suscetível que não havia um reforço significativo na estrutura. A lignina é um polímero que confere resistência às células vegetais, tanto mecânica quanto fitopatogênica. Lee, e colaboradores (2019) dedicaram-se em analisar a resistência de tomates a *Pseudomonas syringae pv tomato* causadora da mancha bacteriana. Neste estudo foi visto que quando as células bacterianas começavam o processo de colonização eram interrompidas por uma deposição de lignina em volta de si, isso prejudicava sua motilidade e a nível de sintoma era possível ver manchas menores nas folhas.

**3. Referências bibliográficas**

ACHOR, D. et al. Dynamics of Candidatus Liberibacter asiaticus Movement and Sieve-Pore Plugging in Citrus Sink Cells[OPEN]. **Plant Physiology**, v. 182, n. 2, p. 852–891, 2020.

AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 5 ed. Ouro Fino-MG: Agronômica Ceres, 2018. v 1. 573 p.

BERNARDINI, C. et al. Candidatus Liberibacter asiaticus accumulation in the phloem inhibits callose and reactive oxygen species. **Plant Physiology**, v. 190, n. 2, p. 1090–1094, 2022.

BOVE, M. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal of Plant Pathology**, v. 88, n. 1, p. 7–37, 2006.

DANISH, M., ROBAB, M.I., MARRAIKI, N., SHAHID, M., ZAGHLOUL, N.S.S., NISHAT, Y. & SHAIKH, H. Root-knot nematode *Meloidogyne incognita* induced changes in morpho-anatomy and antioxidant enzymes activities in *Trachyspermum ammi* (L.) plant: A microscopic observation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, V. 116, 2021, 101725, ISSN 0885-5765,<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101725>.

FERRAZ, L. & BROWN, Derek. Nematologia de Plantas: fundamentos e importância. Manaus: **Norma Editora**, 2016. SN - 978-85-99031-26-1.

FIRMINO, A.C, et al. Análise histológica de plantas de eucalipto resistentes e suscetíveis inoculadas *Ceratocystis fimbriata*. **Sci. For** 46.118 (2018):209-216

HAAVISTO, Vilhelmiina. Suddenly I see: how microscopes made microbiology possible. **American Society for Microbiology**, Junho de 2022. Disponível em: <https://asm.org/Articles/2022/June/Suddenly-I-See-How-Microscopes-Made-Microbiology-P>

KITAJIMA, E. W. et al. *Tomato fruit blotch virus* cytopathology strengthens evolutionary links between plant blunerviruses and insect negeviruses. **Scientia Agricola**, v. 80, p. 1–10, 2023.

MARQUES, J. P. R. et al. Comparative morpho-anatomical studies of the lesions caused by *citrus leprosis virus* on sweet orange. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 2, p. 501–511, 2010.

MONTEIRO, A.R. & SASSER, J.N. Biología, Identificación y control de los nematodos de nódulo de la raiz: Especies de *Meloidogyne*. **Artes gráficas da Universidad del Estado de Carolina del Norte**, Carolina do Norte, 1983.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). Manual de fitopatologia. São Paulo: **Editora Ceres,** v. 1, ed. 5, 2018.

SHANG, S, LIANG, X, LIU, G, ET AL. Histological and ultrastructural characterization of the leaf infection events of *Colletotrichum fructicola* on *Malus domestica* ‘Gala’. ***Plant Pathol***. 2020; 69: 538–548. <https://doi.org/10.1111/ppa.13141>

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M., NICKEL, O., FAJARDO, T.V.M. & SEEMUELLER, E. Doenças da Macieira in: AMORIM, L., REZENDE, J.A.M., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 2. ed. São Paulo: **Agronômica Ceres**. ed. 5, 485 p. 2015.