

## Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais

MUSSURY, R.M.<sup>1\*</sup>; BETONI, R.<sup>2</sup>; SILVA, M.A.<sup>3</sup>; SCALON S.P.Q.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Geral/Bioprospecção, Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, 79804-970 Dourados, MS, Brasil. \* maramussury@ufgd.edu.br <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Agronomia/Produção Vegetal, Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD, Faculdade de Ciências Agrárias, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, 79804-970 Dourados, MS, Brasil. <sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD, Faculdade de Ciências da Saúde, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, 79804-970 Dourados, MS, Brasil

**RESUMO:** Folhas de *Glycine max* (L.) Merrill, infectadas pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais foram avaliadas, visando determinar *in vivo* as modificações anatômicas nas diferentes estruturas/tecidos foliares, além de reconhecer prováveis mecanismos de defesa. Folhas de soja cultivar 181 provenientes do quinto nó foram inoculadas com fungo e tratadas com diferentes extratos vegetais, água e álcool 70%. Para comparação foram analisadas a anatomia das folhas sadia e infectada e realizadas medidas nas estruturas/tecidos foliares. Na folha infectada, observou-se destruição da epiderme e parênquima lacunoso, visível proliferação de tricomas e cutícula espessada, principalmente na face abaxial. Observou-se a presença de compostos fenólicos nas células da epiderme quando rompida, em função do crescimento micelial. Nas folhas infectadas e tratadas com os extratos vegetais de *Azadirachta indica*, *Maytenus ilicifolia* e *Allium sativum*, as estruturas/tecidos vegetais apresentaram aumento de espessura por alongamento celular.

**Palavras-chave:** ferrugem da soja, ferrugem asiática, urediósporos, fungos, *Glycine max*

**ABSTRACT.** Leaf anatomy of soybean infected with *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow and treated with plant extracts. *Glycine max* (L.) Merrill leaves, infected by the fungus *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow and treated with plant extracts, were evaluated with the aim of determining *in vivo* the anatomical modifications in different leaf structures and of identifying probable defense mechanisms. Leaves from the 181 soybean cultivar originated from the fifth node were inoculated with the fungus and treated with different plant extracts, water and alcohol at 70%. For comparison, the anatomy of the healthy and infected leaves was analyzed and the leaf structures were measured. In the infected leaf, there was destruction of the epidermis and lacunar parenchyma, apparent trichome proliferation and denser cuticle, especially on the abaxial surface. There were also phenolic compounds in ruptured epidermis cells, due to mycelium growth. In the infected leaves treated with *Azadirachta indica*, *Maytenus ilicifolia* and *Allium sativum* extracts, the plant tissues had an increase in thickness due to cell elongation.

**Key words:** soybean rust, Asiatic soybean rust, urediniospores, fungi, *Glycine max*

### INTRODUÇÃO

Dentre os vários patossistemas envolvendo fungos fitopatogênicos e planta hospedeira destaca-se o gênero *Phakopsora* sp. O fungo *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow, que é um basidiomiceto, pertencente à sub-classe Teliomicetidae, ordem Uredinales, e família Phakopsoraceae, representa a principal doença fúngica no Estado de Mato Grosso do Sul. A presença deste patógeno nas lavouras de soja foi verificada nos municípios de Sete Quedas,

Juti, Amambaí, Itaquirá, Itaporã, Laguna Carapã, Iguatemi, Aral Moreira, Chapadão do Sul, Costa Rica, São Gabriel do Oeste, Antonio João, Aral Moreira, Ponta Porã, Maracajú, Jardim, Dourados, Rio Brillante, Sidrolândia e Caarapó (Banco de Notícias - Embrapa, 2003/2004).

Estudos prévios, conduzidos por Agrios (1997) e Pascholati & Leite (1995) verificaram que de forma geral, as plantas desenvolveram mecanismos

de defesa contra estes fitopatógenos, os quais são desencadeados imediatamente após a presença destes organismos nos tecidos hospedeiros. Nesta interação, o simples contato entre o fitopatógeno e a planta desencadeia uma série de reações de reconhecimento celular, resultando em modificações estruturais, entre elas, mudanças morfológicas visíveis. O conhecimento da maneira pela qual o fitopatógeno altera a fisiologia do vegetal pode auxiliar no combate às doenças, bem como, na diminuição dos danos causados às culturas. Dessa forma, as análises histopatológicas permitem identificar os tecidos infectados pelos patógenos, associando-os com a fisiologia da planta e com os prejuízos causados ao vegetal.

Os estudos anatômicos relacionados à patogênese são de importância fundamental para o entendimento dos mecanismos de resistência em diversos patossistemas, estando a estrutura celular e tissular da planta muito relacionada com o desenvolvimento das doenças vegetais. De acordo com Pascholati & Leite (1995), as plantas desenvolveram mecanismos estruturais e bioquímicos para evitar ou mesmo retardar a infecção, sendo que estes mecanismos podem ser expressos espontaneamente pela planta ou serem incitados pelo patógeno, sendo assim designados de passivos e induzidos, respectivamente. Os mecanismos de resistências estruturais têm a função de inibir física e quimicamente a ação patogênica, enquanto os bioquímicos têm a função de alterar a fisiologia do patógeno (Aist, 1983).

As primeiras barreiras que os microorganismos encontram para estabelecer a infecção são a cutícula e a parede celular. Segundo McNeil et al. (1984), as paredes celulares não apenas afetam o tamanho e a forma das células, como também constituem barreiras aos microrganismos, pois, para os patógenos penetrarem nas células, há necessidade destes organismos secretarem uma mistura complexa composta por enzimas degradadoras, como por exemplo, as celulases e as pectinases. De acordo com esses mesmos autores, existem proteínas estruturais nas paredes celulares das plantas que inibem o ataque do patógeno e, ainda, fragmentos da parede celular, liberados para o citoplasma, que sinalizam e incitam as reações de resistência. Este processo foi também observado por Benhamou et al. (1991), em feijoeiro com antracnose, onde os elicitores eram fragmentos pécticos da lamela média, que desencadeavam a síntese e o acúmulo de metabólitos secundários como, por exemplo, os compostos fenólicos.

Para o controle das doenças de plantas, métodos físicos e biológicos se constituem em alternativas viáveis e desejáveis em relação ao químico tradicional, principalmente em função de não

deixarem resíduos tóxicos. Ainda, o emprego dos chamados fungicidas naturais aparece como mais uma opção ao uso dos fungicidas sintéticos, em termos de eficiência de controle (Wilson & Wisniewski, 1994). De acordo com Wilson et al. (1997), a literatura tem registrado a eficiência de extratos, obtidos de espécies botânicas, em promover a inibição do desenvolvimento de vários fitopatógenos de natureza fúngica.

Diante da o exposto, e buscando alternativas de controle natural ao fungo *Phakopsora pachyrhizi*, o objetivo da presente pesquisa foi caracterizar os tecidos vegetais lesados de *Glycine max* (L.) Merrill, reconhecer prováveis mecanismos de defesa e avaliar "in vivo" as modificações anatômicas nas diferentes estruturas/tecidos foliares de soja, quando tratadas com extratos vegetais e infectadas pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi*.

## MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi conduzido no horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal da Grande Dourados e as análises anatômicas realizadas no laboratório de Botânica da mesma Universidade.

Um total de 100 sementes da cultivar 181 de soja foram semeadas em vasos plásticos contendo 3 kg da mistura de terra, areia e esterco (2:1:2). Para inoculação foi preparada uma suspensão de urediniosporos de *Phakopsora pachyrhizi* ( $3 \times 10^4$  esporos por mL, contendo 0,1 mL de Tween 20% por 10 mL) a qual foi aplicada com pulverizador manual de 1 litro. As plantas inoculadas com fungo foram mantidas em casa de vegetação cobertas com sombrite 50%.

Aos 30 dias após a semeadura, quando as mesmas já se encontravam com folhas totalmente expandidas, realizou-se a aplicação dos extratos a cada três dias consecutivos, três vezes ao dia por 90 dias. Os extratos utilizados foram *Mentha piperita* L. (hortelã), *Alternanthera brasiliana* L. (terramicina), *Melissa officinalis* L. (melissa), *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (capim-limão), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (fáfia ou ginseng brasileiro), *Azadirachta indica* A. Juss (nim), *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss (espinheira-santa) e *Allium sativum* L. (alho). Para obtenção dos extratos, foram pesadas 20 g de folhas secas e trituradas, adicionados 100 mL de álcool etílico a 70% e deixados por sete dias em temperatura ambiente, agitando-os a cada dois dias. A seguir, o material foi filtrado em papel de filtro e armazenado em frascos âmbar a temperatura de 20°C. No caso do *A. sativum*, foi feito o extrato dos bulbilhos secos e triturados. Cada planta de soja no momento da aplicação foi protegida de forma que os extratos não interferissem

em outra planta tratada com outro extrato. Paralelamente, foi mantido um controle negativo com álcool 70%. A planta controle sadia foi regada periodicamente com água (testemunha).

Ao final de 90 dias procedeu-se a análise anatômica. Os folíolos foram fixados em FAA 50 (Johansen, 1940) e estocados em álcool 70%. Foram confeccionadas lâminas semi-permanentes, utilizando-se cortes transversais feitos a mão livre, com auxílio de lâmina de barbear. Estes foram corados com Safranina e Azul de Astra, sendo montados em gelatina glicerínada. O material também foi incluído em historesina da marca Leica, seguindo-se as recomendações do fabricante e seccionado transversalmente com cerca de 8-10 mm de espessura, em séries transversais. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina a 0,05%, em tampão acetato pH 4,7 (O'Brien et al., 1965) e as lâminas montadas em Permount.

O laminário preparado foi analisado em microscópio de luz. As fotomicrografias e as medidas da espessura das estruturas/tecidos foliares (cutícula, epiderme, parênquima paliçádico, parênquima lacunoso e nervura central) foram obtidas em microscópio binocular com câmera fotográfica acoplada e programa de captura de imagem Moticam 2300 3.0MP live Resolution. Os desenhos foram feitos com auxílio de câmara clara, adaptada a microscópio Coleman.

O teste histoquímico com cloreto férrico para detecção de compostos fenólicos (Johansen, 1940) foi realizado em seções transversais de material fresco, obtidas à mão-livre com auxílio de lâmina de barbear.

O experimento foi analisado com base no delineamento inteiramente casualizado, com 11 tratamentos contendo 10 repetições cada. As médias obtidas, após análise de variância, foram comparadas pelo teste Tukey a 5%.

## RESULTADO E DISCUSSÃO

Morfológicamente a ferrugem da soja aparece em qualquer fase do desenvolvimento da planta e caracteriza-se pelo aparecimento de minúsculas lesões marrom a castanho escuro em ambas as faces da superfície foliar (Figuras 1 a 4). A lesão aparece no interior da aréola foliar (Figura 5), exibindo erupções que formam a urédia globosa. Os urediósporos são liberados diretamente do ostíolo circular, que é uma abertura localizada na urédia (Figura 6).

O processo de infecção por *P. pachyrhizi* começa quando urediósporos germinados produzem um tubo germinativo (Figuras 7 e 8) que cresce através da superfície da folha até a formação do apressório. Observaram-se lesões em toda folha, mas a liberação de urediósporos foi observada na face abaxial dessas.

Em secção paradérmica observa-se que

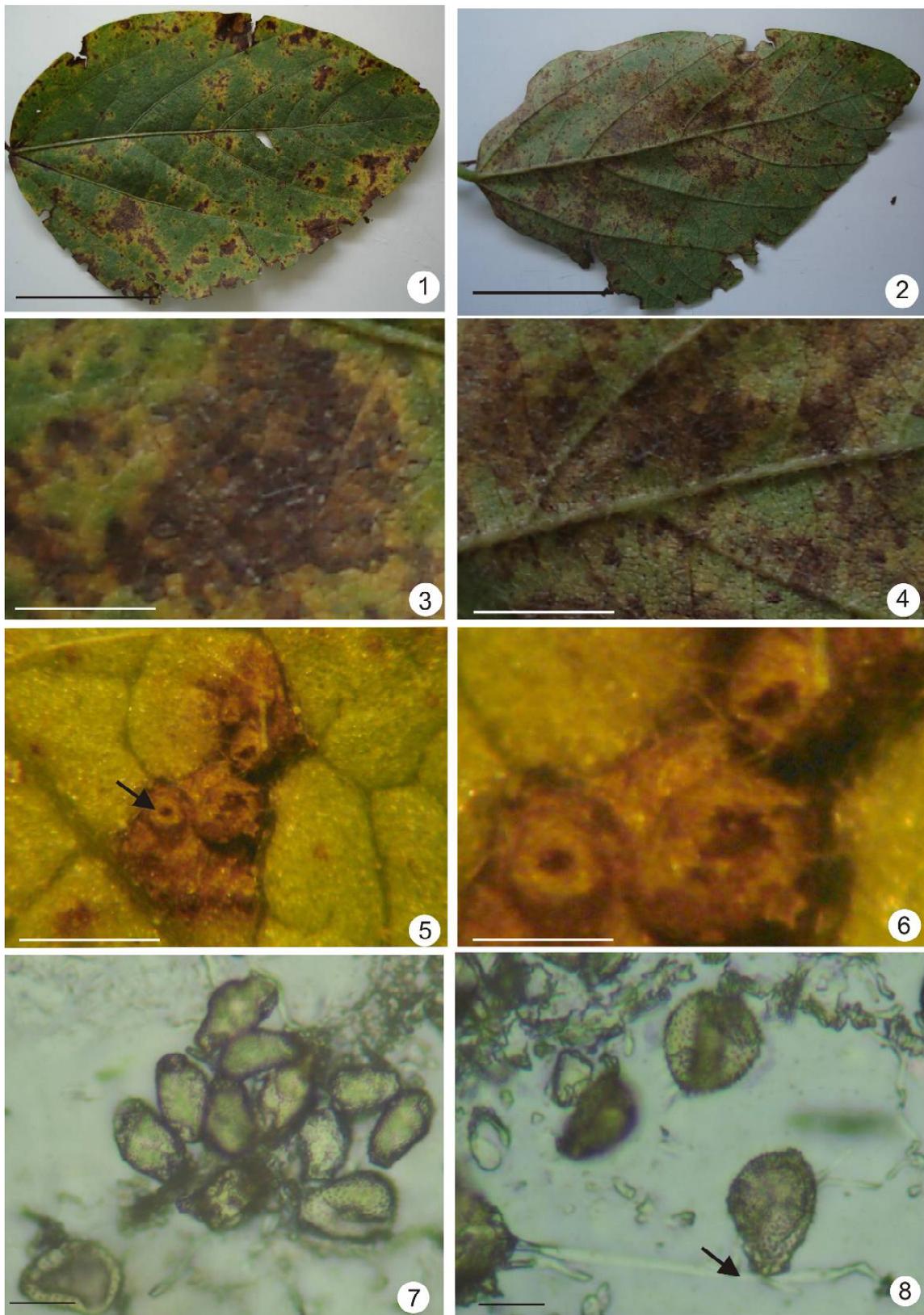
ambas as faces da epiderme apresentam estômatos do tipo paracítico (Figuras 9 e 10) e tricomas tectores (Figura 10) com paredes ligeiramente onduladas.

A anatomia da folha sadia, em secção transversal, na região internervural, é constituído por células epidérmicas de tamanhos variados com parede periclinal externa espessada (Figuras 11, 12 e 13). O mesofilo é dorsiventral, apresentando dois a três estratos de parênquima paliçádico, dispostos de forma descontínua que se prolongam até a região da nervura primária e três a quatro estratos frouxamente dispostos de parênquima lacunoso. Entre o parênquima paliçádico e lacunoso nota-se a presença de um estrato de parênquima paravenal (Figuras 11 e 12). O feixe vascular é envolvido por uma bainha de células parenquimáticas, as quais se arranjam de forma justaposta estendendo-se até a epiderme (Figura 12).

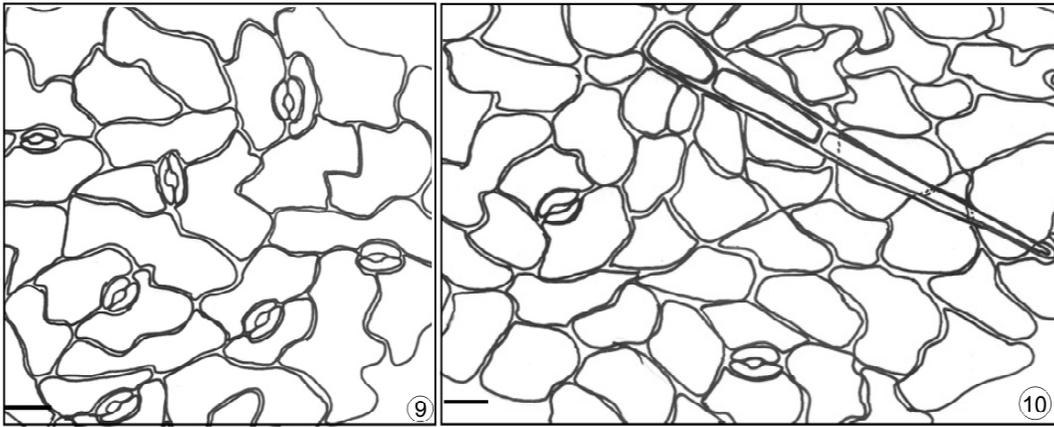
A nervura primária com contorno biconvexo (Figura 14) é constituída por células epidérmicas em ambas as faces com tamanho reduzido e com tricomas glandulares (Figura 15). Abaixo da epiderme, observam-se uma a duas camadas de colênquima e, mais internamente, células parenquimáticas de diferentes tamanhos, ocorrem junto ao feixe vascular (Figura 14). O tecido vascular é formado por um feixe vascular maior e um feixe vascular menor em posição frontal ao maior, apresentando fibras que envolvem de forma descontínua esses feixes (Figura 16).

Na planta infectada por *P. pachyrhizi*, após a penetração do fungo, as lesões avançadas nos tecidos foliares ocorrem na face abaxial (Figuras 17 e 18) com lise das células da epiderme e do parênquima lacunoso como resultado da intensa proliferação do tecido micelial (Figuras 19 e 20). Posteriormente uma saliência aparece no tecido epidérmico, o qual se rompe liberando urediósporos (Figura 21). Em alguns casos foi observado que o desenvolvimento micelial decorre em lise das células do mesofilo foliar comprometendo consequentemente a fotossíntese (Figura 22). De acordo com Andrade & Andrade (2002), redução da atividade fotossintética pela destruição dos tecidos foliares leva a desfolha prematura, redução do ciclo e formação dos grãos.

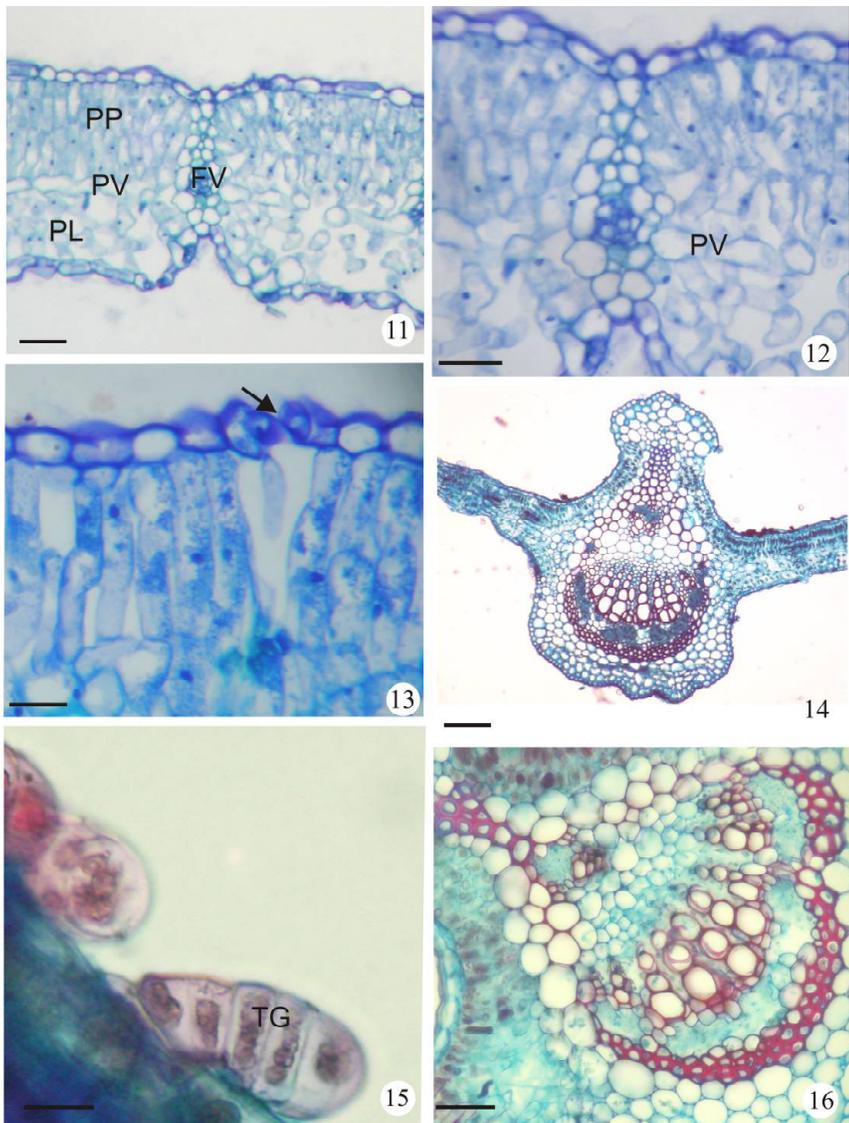
Dentre os mecanismos de resistência, os tricomas e os tecidos lignificados funcionam como uma barreira mecânica à invasão do fungo (Kunwart et al., 1985; Pascholati & Leite, 1995). Além dos tricomas, a cutícula e a parede celular são as primeiras barreiras que os microorganismos encontram para estabelecer a infecção. Segundo McNeil et al. (1984), as paredes celulares não apenas afetam o tamanho e a forma das células, como também, constituem barreiras aos microorganismos por secretarem uma mistura complexa de substâncias. Em *G. max* infectada por *P. pachyrhizi* observa-se visualmente intensa pilosidade no limbo



**FIGURAS 1-8:** Fotografias de folhas de *Glycyne max* infectadas por *Phakopsora pachyrhizi*. **1.** Superfície adaxial da folha lesionada. **2.** Superfície abaxial da folha lesionada. **3.** Detalhe da lesão na superfície adaxial. **4.** Detalhe da lesão na superfície abaxial. **5.** Urédia aberta (seta-ostíolo). **6.** Detalhe da urédia aberta. **7.** Urediósporos. **8.** Urediósporo germinando (seta). Figuras 1 a 4- Barras de escala 1 cm; Figuras 5 e 6- Barras de escala 1mm; Figuras 7 e 8- Barras de escala de 100  $\mu$ m.



**FIGURAS 9 e 10:** Faces da epiderme de *Glycine max*. **9.** Face adaxial. **10.** Face abaxial, evidenciando o tricoma tector (seta) e estômatos (ponta de seta). Barras de escala-1 cm.



**FIGURAS 11-16.** Anatomia do limbo sadio de *Glycine max*. **11.** Visão geral da região internervural. **12.** Detalhe do feixe da região internervural. **13.** Detalhe da epiderme unisseriada com estômato (seta). **14.** Visão geral da nervura primária. **15.** Tricoma glandular. **16.** Detalhe dos feixes da nervura primária. (FV-feixe vascular, PL-parênquima lacunoso, PP-parênquima paliádico, PV-parênquima paravenal, TG-tricoma glandular). (Barra de escala 100  $\mu$ m).

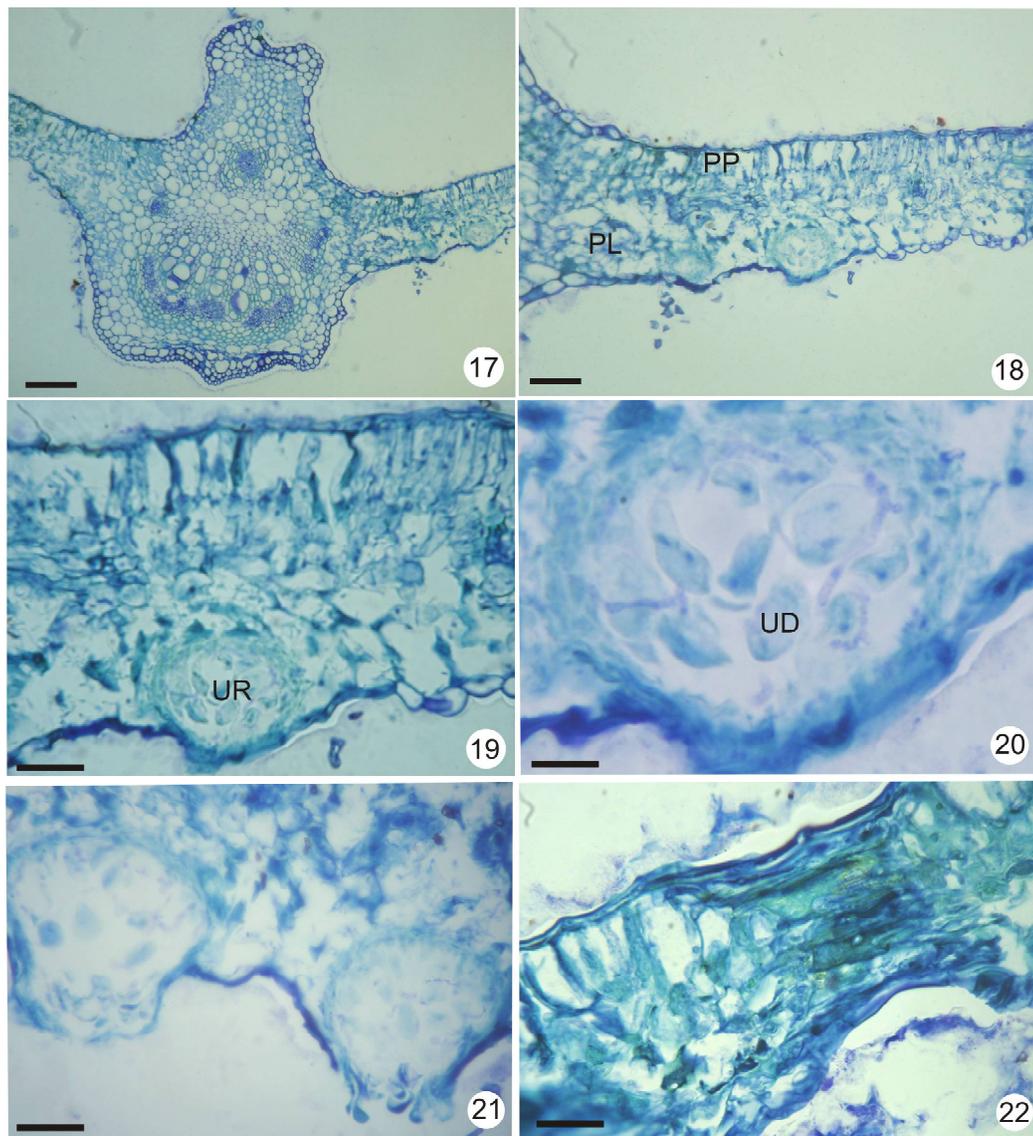
principalmente na face abaxial, funcionando provavelmente, como importante barreira à penetração do patógeno. Jiménez-Díaz (1996) observa que quando a planta hospedeira apresenta densa pilosidade, as hifas permanecem na superfície da folha enoveladas nos tricomas presentes, indicando haver uma relação entre a densidade de tricomas e a resistência à doença.

Outra forma de inibição da colonização dos tecidos por *P. pachyrhizi*, foi a presença de compostos fenólicos nas células da epiderme rompida, em função do crescimento micelial. De acordo com Mauseth (1995), os compostos fenólicos podem inibir enzimas degradadoras celulares e dessa forma, atuam como

importantes barreiras à penetração do patógeno.

No patossistema avaliado verificou-se que nas folhas infectadas e tratadas com os extratos vegetais ocorreram modificações na espessura das diferentes estruturas/tecidos foliares analisadas, quando comparada com a testemunha, como pode ser observado na tabela 1.

Em soja tratada principalmente com *A. indica* (nim), *M. ilicifolia* (espinheira-santa) e *A. sativum* (alho), observou-se o aumento na espessura da epiderme da face abaxial e adaxial e no parênquima paliçádico, decorrente provavelmente de alongamento celular, tendo em vista que não foi observado aumento no número de camadas de



**FIGURAS 17-22.** Anatomia do metafilo de *Glycine max* infectado por *P. pachyrhizi*. **17.** Visão geral do limbo. **18.** Observação de urédias fechadas na face abaxial (seta). **19.** Detalhe da urédia desenvolvendo na face abaxial do limbo. **20.** Detalhe da urédia com urediósporos no interior. **21.** Urédia aberta liberando urediósporos. **22.** Destruição dos tecidos do vegetal pelo dano causado por *P. pachyrhizi* (PL-parênquima lacunoso, PP-parênquima paliçádico, UD-urédia, UR- urediósporos). (Barra de escala 100  $\mu$ m).

**TABELA 1.** Espessura ( $\mu\text{m}$ ) das estruturas/tecidos foliares de *Glycine max* infectadas e tratadas com diferentes extratos vegetais. Dourados, MS, 2007. (CS - cutícula superior; EPS - epiderme da face adaxial; PP - parênquima paliçádico; PL - parênquima lacunoso; EPI - epiderme da face abaxial; CI - cutícula inferior; NC - nervura central).

Extratos/Variáveis	CS	EPS	PP	PL	EPI	CI	NC
Espinheira-santa	9,6 a	74 ab	430 ab	440 a	72 ab	10 a	1262 a
Nim	9,6 a	76 ab	414 abc	400 ab	74 ab	9,2 a	1180 ab
Alho	8,8 a	88 a	460 a	378 ab	80 a	10 a	1080 bc
Capim-limão	10 a	64 bc	404 abc	336 ab	56 b	10 a	1064 bc
Melissa	10 a	62 bc	406 abc	344 ab	68 ab	10 a	962 c
Hortelã	10 a	66 abc	378 bcde	358 ab	68 ab	10 a	1078 bc
Terramicina	10 a	66 abc	392 abcd	336 ab	60 ab	10 a	1050 bc
Fáfia	10 a	58 bc	314 e	296 b	62 ab	9,6 a	1094 bc
Alecrim	9,6 a	50 c	328 de	334 ab	70 ab	10 a	1016 c
Testemunha	10 a	54 bc	364 bcde	306 b	54 b	10 a	1060 bc
Alcool 70%	9,6 a	62 bc	344 cde	346 ab	74 ab	9,6 a	1320 a
cv (%)	6,4	16,6	8,4	15,6	15,2	5,1	6,3

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

células. No entanto, no parênquima lacunoso observou-se aumento no número de camadas, com conseqüente aumento em espessura do tecido para o extrato de espinheira santa, quando comparada com a testemunha. Faz-se importante ressaltar que o extrato de alho, muito embora não diferindo estatisticamente da espinheira-santa e nim promoveu aumento do alongamento das células da epiderme superior e inferior e do parênquima paliçádico, constituindo-se, portanto, em um tratamento para ser mais bem estudado, tendo em vista que o processo de infecção inicia-se pela epiderme. De acordo com Murphy & Carr (2002), o sucesso da infecção localizada de um vírus requer a replicação e subsequente movimento célula a célula, a partir de células inicialmente inoculadas para células sadias adjacentes, via plasmodesmos. Se a utilização de extratos vegetais aumenta a espessura e/ou o número de camadas celulares frente à presença de *P. pachyrhizi*, pode-se provavelmente inferir que seja esse um mecanismo que reduz a penetração e colonização dos tecidos vegetais pelo fungo.

Em laranja, Marques et al. (2007) verificaram que a lise celular e a concomitante necrose do parênquima paliçádico atingiram os feixes vasculares e levaram esses feixes ao colapso e dessa forma, de acordo com Roberts et al. (1997), ocorre limitação na translocação do vírus para regiões ainda não infectadas. Em soja foi observada lise das células do parênquima lacunoso podendo estender-se até o paliçádico, à medida que a colonização dos tecidos aumenta.

De acordo com Bettiol (1991), o controle alternativo das doenças de plantas inclui mecanismos de resistência induzidos que podem ser estruturais ou químicos, como a formação de papilas, lignificação, tiloses, acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (Pascholati & Leite, 1995). Como no presente estudo o que foi avaliado foi a espessura de estruturas/tecidos foliares, provavelmente este seria um dos mecanismos de defesa da planta, associado a proliferação de tricomas e produção de compostos fenólicos.

Os trabalhos desenvolvidos com extratos obtidos a partir de plantas medicinais têm indicado o potencial das mesmas para diversas ações entre elas o controle de fitopatógenos, pela indução de fitoalexinas. Entretanto, a literatura sobre modificações anatômicas dos tecidos de plantas frente à ação de extratos vegetais é escassa. Assim, novos ensaios abordando outras análises devem ser conduzidos com essas plantas no sentido de determinar o modo de ação das substâncias produzidas, conferindo o aumento de espessura em determinadas estruturas/tecidos, o que provavelmente decorre de uma maior ativação do metabolismo de defesa dessas.

Diante do exposto conclui-se que os tecidos inicialmente infectados por *P. pachyrhizi* são epiderme e parênquima lacunoso; como forma de defesa há visual proliferação de tricomas e produção de compostos fenólicos, ocorrendo também aumento de espessura de estruturas/

tecidos foliares em soja tratada principalmente com *A. indica*, *M. ilicifolia* e *A. sativum*.

## AGRADECIMENTO

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, e à Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade da realização do trabalho.

## REFERÊNCIA

- AGRIOS, G.N. How plants defend themselves against pathogens. In: AGRIOS, G.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 4.ed. Califórnia: Academic Press, 1997. p.93-114.
- AIST, J.R. Structure response as resistance mechanisms. In: BAILEY, J.A.; DEVERALL, B.J. **The dynamics of host defense**. Sydney: Academic Press, 1983. p.33-70.
- ANDRADE, P.J.M.; ANDRADE, D.F.A.A. Ferrugem Asiática - uma ameaça a sojicultura brasileira. Dourados,MS: EMBRAPA Agropecuária Oeste. **Circular Técnica** 11. 2002.
- BANCO DE NOTÍCIAS. **Embrapa aponta perdas de U\$2 bilhões com ferrugem da soja na safra 2003/2004**. Disponível em: <www.cnpso.embrapa.br>. Acesso em: 02 jul. 2004.
- BENHAMOU, N. et al. Cell surface interaction between bean leaf cells and *Colletotrichum lindemuthianum*: Cytochemical aspects of pectin breakdown and fungal endopolygalacturonase accumulation. **Plant Physiology**, v.97, n.1, p.234-44, 1991.
- BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388p. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. Interacciones planta-hongos:mecanismos de infección, patogénesis y resistencia. In: LLACER, G. et al. **Patología vegetal**. Valencia: Sociedad Española de Fitopatología, 1996. p.739-69.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book Company. Inc., 1940. 523p.
- KUNWART, I.J.; SINGH, T.; SINCLAIR, J.B. Histopathology of mixed infection by *Colletotrichum truncatum*, *Phomopsis* spp. and *Cercospora sojina* in soybean seeds. **Phytopathology**, v.75, p.489-92, 1985.
- MARQUES, J.P.R. et al. Lesões foliares e de ramos de laranja-doce causadas pela leprose-dos-citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.11, p.1531-6, 2007.
- MAUSETH, J.D. Fungi. In: MAUSETH, J.D. **Botany: an introduction to plant biology**. 2ed. San Marino/California: Sunders College Publishing, 1995. p.542-74.
- MCNEIL, M.; DARVILL, A.; ALBERSHEIM, P. Structure and function of the primary cells walls of plant. **Annual Review Biochemistry**, v.53, p.625-63, 1984.
- MURPHY, A.M.; CARR, J.P. Salicylic acid has cell-specific effects on Tobacco mosaic virus replication and cell-to-cell movement. **Plant Physiology**, v.128, p.552-63, 2002.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue o. **Protoplasma**, v.59, n.2, p.368-73, 1965.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismo de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A. et al. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. p.417-53.
- ROBERTS, A.G. et al. Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. **Plant Cell**, v.9, p.1381-96, 1997.
- WILSON, C.L.; WISNIEWSKI, M.E. **Biological control of postharvest plant diseases of fruits and vegetables: theory and practice**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 465p.
- WILSON, C.L. et al. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v.81, p.204-10, 1997.