

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO PARA A OTIMIZAÇÃO DA TRANSMISSÃO EXPERIMENTAL DO VÍRUS DA LEPROSE DOS CITROS

VANDECLUI RODRIGUES¹, MARINÊS BASTIANEL¹, KAREN KUBO¹, ANDRÉ LUIZ FADEL¹, FERNANDA NICOLINI¹, VALDENICE MOREIRA NOVELLI¹ e JULIANA FREITAS-ASTÚA^{1,2}

RESUMO

A leprose, uma das principais doenças da citricultura, é causada pelo vírus da leprose dos citros, tipo citoplasmático (Citrus leprosis virus, cytoplasmic type - CiLV-C), transmitido de forma persistente por *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). O vírus permanece restrito à área da lesão e, conseqüentemente, ocorre em baixo título na planta hospedeira. Dessa forma, sua transmissão é altamente dependente do ácaro vetor, que deve ter condições adequadas para infestar satisfatoriamente as plantas-teste. *Brevipalpus* spp. costumam ser encontrados em pequeno número no campo, normalmente em frutos e ramos, próximos a abrigos, como lesões de verrugose e galerias de larva minadora. Em condições de laboratório, para aumentar as populações do ácaro, comumente os indivíduos são mantidos sobre frutos de citros que apresentam abrigos naturais ou em frutos que simulam verrugose, utilizando-se de uma mistura de farinha de trigo, gesso, areia fina e água. Nesse estudo, empregou-se a mesma mistura em folhas de citros com o objetivo de facilitar a fixação e a reprodução dos ácaros nas plantas e aumentar a eficiência de transmissão do CiLV-C em estudos controlados sobre a leprose, em casa de vegetação.

Termos de indexação: CiLV-C, verrugose, laranja doce, ácaro, *Brevipalpus*.

¹ CAPTA Citros Sylvio Moreira-IAC, Caixa Postal 4, 13490-970, Cordeirópolis (SP). Fone/fax: (19) 3546-1399.

² Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas (BA). E-mail: jfastua@centrodecitricultura.br.

SUMMARY

IMPROVED METHOD FOR EXPERIMENTAL TRANSMISSION OF CITRUS LEPROSIS

Citrus leprosis, one of the main diseases of the crop, is caused by Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) and transmitted in a persistent manner by the mite vector (*Brevipalpus phoenicis*). The virus is limited by the local lesions it induces in susceptible hosts and, consequently, is found in low concentrations in the host plant. Hence, its transmission is highly dependent on the mite vector, which needs adequate conditions to infest the test-plants accordingly. *Brevipalpus* spp. are often found in low population densities, normally close to shelters such as scab lesions and Asian leafminer galleries. Under laboratory conditions, mite populations are commonly reared onto citrus fruits presenting natural shelters or a mixture of wheat flour, fine sand, gypsum and water that mimics scab lesions. In this work we used this mixture on sweet orange leaves with the objective to favor the mites establishment and reproduction and, consequently, enhance the success of CiLV-C transmission in greenhouses studies.

Index terms: CiLV-C, citrus scab, sweet orange, mite, *Brevipalpus*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, maior produtor de citros do mundo, tem na citricultura uma das principais atividades do agronegócio, tendo a exportação de sucos de laranja na safra de 2006/07 superado 2,0 bilhões de dólares (SECEX/MDIC, 2007). A produtividade da citricultura brasileira, entretanto, ainda é relativamente baixa, basicamente por causa de pragas e doenças, cujos controles representam elevada parcela dos custos de produção.

Entre tais doenças, uma das mais importantes da cultura é causada pelo vírus da leprose dos citros (CiLV), transmitido de forma persistente por *Brevipalpus phoenicis*, um ácaro polífago e cosmopolita. O manejo da leprose baseia-se no controle químico do vetor, estimando-se, apenas no Estado

de São Paulo, gastos acima de 80 milhões de dólares/ano para esse controle (NEVES et al., 2004). Apesar da grande relevância, principalmente em São Paulo, encontra-se o vírus da leprose em todas as regiões produtoras de citros do Brasil e em vários países das Américas do Sul e Central (BASTIANEL et al., 2006).

São conhecidas duas formas do vírus, referidas como nuclear (CiLV-N) e citoplasmática (CiLV-C), em função da sua localização na célula vegetal infectada (RODRIGUES et al., 2003). Essa última, no entanto, prevalece em todas as regiões onde a doença foi relatada, e em mais de 90% dos pomares brasileiros (BASTIANEL et al., 2006). Caracteriza-se por apresentar lesões circulares cloróticas ou necróticas nas folhas, ramos e frutos, causando uma diminuição drástica da produção em vista da desfolha e queda prematura dos frutos (BITANCOURT, 1955).

O potencial do *B. phoenicis* como vetor de vírus de plantas vem-se tornando cada vez mais evidente, sendo o transmissor de cerca de 40 viroses em diferentes culturas, incluindo, além dos citros, o café, o maracujá e várias plantas ornamentais (KITAJIMA et al., 2003a, b). Os citros estão entre as mais de 400 plantas hospedeiras desse ácaro, as quais incluem plantas suculentas, cactáceas, herbáceas, ornamentais e várias espécies arbóreas (CHILDERS et al., 2003).

A reprodução de *Brevipalpus* é por partenogênese telítoca, com fêmeas originando indivíduos geneticamente idênticos, sendo que a reprodução sexual raramente observada, ocorre em menos de 1% dos casos (HELLE et al., 1980). Ao adquirir o vírus, os ácaros têm a habilidade de transmiti-lo por todo seu ciclo de vida, incluindo as fases de larva, ninfa e adulto. Sugeriu-se que a relação vírus-vetor seria do tipo persistente propagativa (RODRIGUES, 2000); entretanto, estudos de microscopia eletrônica de transmissão e PCR quantitativo em tempo real estão em andamento para confirmar esse fato (NICOLINI et al., 2007).

A não-deteção de partículas virais em ovos de fêmeas virulíferas (NOVELLI et al., 2005) e a impossibilidade de transmissão do vírus por indivíduos originários dessas fêmeas, confirmam a não-transmissão transovariana do CiLV-C (BOARETTO et al., 1993). Apesar da aparente plasticidade de adaptação desse ácaro, ainda é um desafio mantê-lo em condições ideais,

em laboratório, para a realização de testes de transmissão e outros experimentos biológicos. Em campo, os ácaros têm o hábito de se esconder em reentrâncias nas plantas, onde depositam seus ovos, preferencialmente em lesões de ferrugose causada pelos fungos *Elsinoe fawcetti* e *E. australis* (BITANCOURT & JENKINS, 1936). Quando confinados em áreas pequenas, porém, ficam facilmente estressados, comprometendo o seu desenvolvimento.

Laboratórios que mantêm populações de *Brevipalpus*, principalmente para trabalhos envolvendo resistência a acaricidas, utilizam uma mistura de farinha de trigo, gesso, areia fina e água, a qual simula lesões de ferrugose e serve como abrigo aos ácaros, permitindo melhor adaptação, reprodução e manutenção dessas populações (EVERALDO B. ALVES, comunicação pessoal).

Dado o sucesso desse método em frutos, supõe-se que tal procedimento poderia favorecer também o desenvolvimento de ácaros em plantas-teste, normalmente mudas sem frutos, utilizadas em experimentos envolvendo a transmissão do CiLV-C, tendo como consequência direta o aumento do número de lesões de leprose.

Visando favorecer a transmissão do CiLV-C em experimentos controlados, estabeleceu-se uma experiência para avaliar a eficácia da mistura de farinha de trigo, gesso, areia fina e água, em folhas de plantas de citros, objetivando-se a melhoria das condições para o desenvolvimento e a manutenção de ácaros nessas plantas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Uma população de *B. phoenicis* proveniente de pomares com leprose, do Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira'; foi estabelecida e multiplicada em frutos de laranja Pêra [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]. Coletaram-se folhas de laranja Pêra sintomáticas para leprose do mesmo local, usando-as como fonte de inóculo inicial. Para a aquisição do vírus, mantiveram-se os ácaros sobre essas folhas sintomáticas por 48 horas, transferindo-os, após esse período, para plantas-teste de laranja Pêra. Realizaram-se quatro tratamentos e utilizaram-se quatro repetições de plantas para cada tratamento, totalizando 16 plantas, obtidas por sementes e com oito meses de idade. Cada planta foi infestada com 75 ácaros, num total de 1.200 ácaros. Os tratamentos foram:

A. Ácaros confinados em folhas delimitadas por cola entomológica contendo uma mistura de farinha de trigo, gesso e areia fina, na proporção de 1:1:2, mais água para dar liga (25 ácaros por folha, três folhas por planta);

B. Ácaros confinados em folhas delimitadas por cola entomológica sem a mistura (25 ácaros por folha, três folhas por planta);

C. Ácaros transferidos para uma única folha de cada planta-teste contendo a mistura de farinha de trigo, gesso e areia fina (1:1:2) mais água, sem a adição de cola entomológica (75 ácaros livres por planta);

D. Ácaros transferidos para uma única folha de cada planta-teste sem a mistura e sem a cola entomológica (75 ácaros livres por planta).

A eficiência de transmissão do CiLV-C foi medida através da contagem do número de lesões típicas de leprose aos 15, 19, 26 e 27 dias após a infestação. Análise da variância e teste de comparação de médias foram realizadas na última avaliação por meio do programa estatístico SASM -Agri (CANTERI et al., 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas quatro avaliações fenotípicas para a presença de sintomas característicos de leprose dos citros, feitas aos 15, 19, 26 e 27 dias após a infestação com ácaros virulíferos, considerou-se o número de lesões em folhas. Nos tratamentos em que os ácaros não foram confinados pelo uso da cola entomológica, consideraram-se também as lesões em pecíolo e ramos. Lesões características da doença, bem como o aspecto da mistura utilizada nas folhas podem ser visualizadas na Figura 1. O número de lesões encontrado em cada avaliação, para todos os tratamentos, considerando a média das lesões por planta, encontra-se na Tabela 1.

Observa-se que, à medida que aumenta o tempo de inoculação, há um aumento significativo do número de lesões para todos os tratamentos. Esse aumento, contudo, é mais acentuado para os tratamentos A e C (Figura 2). Ambos tiveram uma área coberta com uma mistura de farinha, gesso e areia fina (Tabela 1).



Figura 1. Folhas de laranja Pêra infestadas com ácaros virulíferos. 1) Lesões em folhas delimitadas por cola entomológica sem a mistura de farinha, gesso e areia fina (tratamento B); 2) Folhas que receberam a mistura (tratamento C); e 3) Lesões em uma folha infestada, que recebeu a mistura (tratamento A) após a sua retirada para facilitar a visualização dos sintomas.

A análise de comparação de médias, realizada para os dados observados em cada período de avaliação, mostrou que houve diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos que receberam a mistura de farinha de trigo, gesso e areia fina (tratamentos A e C) e aqueles que não a receberam (B e, D), independentemente de os ácaros estarem ou não confinados pela cola entomológica. Tais resultados sugerem que a simulação de abrigos, que servem de esconderijo para os ácaros em folhas, favorecem a colonização dos mesmos na planta, propiciando maior eficiência na transmissão do CiLV-C e, conseqüentemente, maior número de lesões.

Apesar de os tratamentos A e C (os quais contêm a mistura) terem apresentado médias não estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) no número de lesões por planta, indicando que não houve influência do confinamento dos ácaros no número médio de lesões, deve-se atentar para o fato de que, no tratamento C, grande número delas apareceu nos pecíolos e ramos, o que dificulta a utilização dessas plantas tanto para ensaios biológicos quanto para moleculares.

Tabela 1. Número médio de lesões observadas em cada tratamento (média de quatro plantas). Para a análise de variância transformaram-se as médias pelo método da raiz quadrada.

Tratamentos	Avaliações (d.a.i. ¹)			
	1ª (15)	2ª (19)	3ª (26)	4ª (27)
Nº médio de lesões por tratamento				
A (ácaros em folhas delimitadas com cola e com a mistura)	6,75a ²	59,75a	154,00a	244,50a
B (ácaros em folhas delimitadas com cola e sem a mistura)	0,00b	19,25b	43,25b	52,75b
C (ácaros em folhas não delimitadas e com a mistura)	9,25a	45,00a	124,00a	199,00a
D (ácaros em folhas não delimitadas e sem a mistura)	0,00b	11,75b	44,75b	59,75b
CV (%)	58,36	38,93	35,29	32,76

¹ Números de dias após a infestação com ácaros virulíferos; ² Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de significância de 5%.

Dessa forma, a decisão de confinar ou não os ácaros nas folhas deve ser tomada em função do objetivo do experimento. Os resultados mostraram que ácaros confinados proporcionaram maior número de lesões por folha, o que é útil, por exemplo, para fonte de inóculo. Além disso, evita a queda de folhas devido à ocorrência de lesões no pecíolo, observadas nos tratamentos em que os ácaros foram mantidos livres na planta. Por outro lado, os ácaros livres tendem a colonizar melhor a planta, garantindo a manutenção do inóculo por mais tempo. De fato, ALBUQUERQUE et al. (1995), avaliando o comportamento de ácaros em frutos de laranja Pêra, com e sem verrugose, demonstraram que ácaros em frutos lisos, isto é, sem abrigos, apresentaram maior movimentação, em função da procura por abrigos, favorecendo a disseminação do vírus para ramos e outros locais da planta.

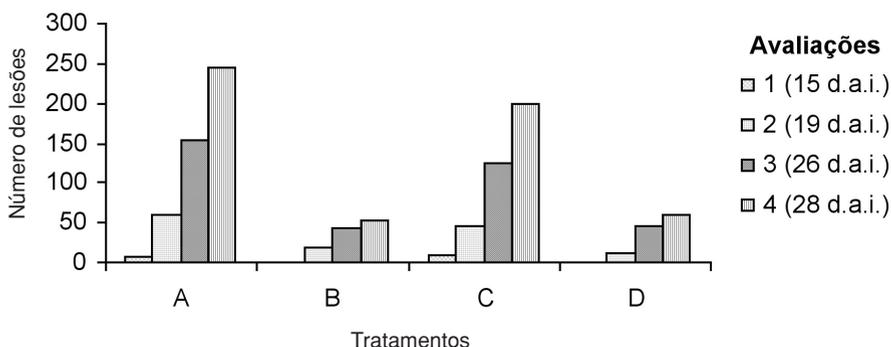


Figura 2. Número médio de lesões por planta observadas em cada tratamento e em cada avaliação fenotípica realizada. d.a.i = dias após a infestação com ácaros virulíferos.

Com esses resultados, pode-se concluir que a mistura de farinha, gesso e areia fina propicia um abrigo adequado para os ácaros, mimetizando condições encontradas no campo, aumentando, assim, a eficiência da transmissão do CiLV-C em condições controladas. Também, vale ressaltar que esse tratamento tem sido empregado com sucesso para estudos de transmissão de outros vírus transmitidos por *Brevipalpus* spp., como o da mancha anular do cafeeiro (CoRSV - dados não mostrados).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, F.A.; OLIVEIRA, C.A.L. & BARRETO, M. Comportamento do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em frutos de citros. In: OLIVEIRA, C.A.L. & DONADIO, L.C. (Eds.). **Leprose dos citros**. Jaboticabal, Funep, 1995. p.77-90.
- BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. & MACHADO, M.A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopatologica**, v.32, n.3, p.211-220, 2006.
- BITANCOURT, A.A. Estudos sobre a leprose dos citros. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.22, p.161-231, 1955.
- BITANCOURT, A.A. & JENKINS, A.E. Perfect stage of the sweet orange fruit scab fungus. **Mycologia**, v.28, n.5, p.489-492, 1936.

- BOARETTO, M.A.C.; CHIAVEGATO, L.G. & SILVA, C.A.D. Transmissão da leprose através de fêmeas de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) e de seus descendentes, em condições de laboratório. **Científica**, São Paulo, v.21, n.2, p.245-253, 1993.
- CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTI, E.A. & GODOY, C.V. SASM-Agri: sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.
- CHILDERS, C.C.; RODRIGUES, J.C.V. & WELBOURN, W.C. Host plants of *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, and *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) and their potential involvement in the spread of one or more viral diseases vectored by these mites. **Experimental and Applied Acarology**, v.30, n.1-3, p.29-105, 2003.
- HELLE, W.; BOLLAND, H.R. & HEITMANS, W.R.B. Chromosomes and types of parthenogenesis in the false spider mites (Acari: Tenuipalpidae). **Genetica**, v.54, p.545-550, 1980.
- KITAJIMA, E.W.; CHAGAS, C.M. & RODRIGUES, J.C.V. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, v.30, n.1-5, p.135-160, 2003a.
- KITAJIMA, E.W.; REZENDE, J.A.M. & RODRIGUES, J.C.V. Passion fruit green spot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on passion fruit in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.30, n.1-5, p.225-231, 2003b.
- NEVES, E.M.; RODRIGUES, L. & GASTALDI, H.L.G. Defensivos agrícolas e custos na produção de citros. **Visão Agrícola**, Piracicaba, v. 1, n. 2, p. 127-131, 2004.
- NOVELLI, V.M.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; LOCALI, E. C. ; ARRIVABEM, F.; HILF, M.E.; GOTTWALD, T.R. & MACHADO, M.A. Detecção do vírus da leprose dos citros (CiLV-C) através de RT-PCR em diferentes fases de desenvolvimento do ácaro vetor (*Brevipalpus phoenicis*). In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 38, Brasília/DF. **Fitopatologia Brasileira**, 2005. v.30, p.S183.
- NICOLINI, F.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W.; KUBO, K.S.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; SCHONS, J. & MACHADO, M.A. Evidences suggesting that *Brevipalpus phoenicis*-Citrus leprosis virus interaction may not be of circulative propagative type. In: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 12, 2007, Adana, Turkey. Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 12, 2007. p. 56.

- RODRIGUES, J.C.V. Relações patógeno-vetor-planta no sistema leprose dos citros. 168p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2000.
- RODRIGUES, J.C.V.; KITAJIMA, E.W.; CHILDERS, C.C. & CHAGAS, C.M. Citrus leprosis virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on citrus in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.30, n.1-3, p.161-179, 2003.
- SECEX/MDIC - Secretaria de Comércio Exterior/Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Disponível em: <http://www.aliceweb.desenvolvimento.gov.br>. Acesso em: 9/8/2007.