

## **RAMOS SINTOMÁTICOS DE CITROS COMO COLONIZADORES DO ÁCARO *BREVIPALPUS PHOENICIS* E COMO FONTE DE INÓCULO DO VÍRUS DA LEPROSE DOS CITROS**

ALEX JR. **SOARES**<sup>1</sup>; BRUNA AP. **CUNHA**<sup>2</sup>; MARIA A. **NUNES**<sup>2</sup>; LUCIANE F.  
**COERINI**<sup>2</sup>; MARINES **BASTIANEL**<sup>2</sup>; JULIANA **FREITAS-ASTUA**<sup>2,3</sup>;  
VALDENICE M. **NOVELLI**<sup>4</sup>

**Nº 11143**

### **RESUMO**

A leprose dos citros é causada pelo vírus da leprose dos citros (*Citrus leprosis virus C* – CiLV-C) e transmitida pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). A doença é caracterizada por lesões cloróticas e necróticas em folhas, frutos, e ramos e, dependendo do grau de infestação, pode gerar grandes prejuízos aos citricultores. O manejo é feito com base no controle do vetor, quase que exclusivamente com uso de acaricidas, o que compromete o orçamento citrícola em milhões de dólares anuais. Especula-se que nem todos os tipos de lesões de leprose seriam viáveis para a colonização do ácaro e para a aquisição do CiLV-C. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de diferentes tipos de ramos sintomáticos como local de abrigo e multiplicação dos ácaros, bem como a sua viabilidade como fontes de inóculo e disseminação do CiLV-C. Ramos com diferentes tipos de lesões (cloróticas e necróticas) e diâmetros foram avaliados em ensaios para determinar a colonização, além da aquisição e transmissão do CiLV-C pelo ácaro. Para verificar a presença de partículas do CiLV-C foram feitas análises de RT-PCR de amostras de cada tipo de lesão. Os resultados mostraram que independente do tipo de lesão (clorótica ou necrótica) existe o risco de aquisição e transmissão do CiLV-C. As análises moleculares confirmaram a presença do vírus nas diferentes lesões amostradas de ramos. Dados preliminares sugerem ser possível a colonização e sobrevivência de *B. phoenicis* sobre ramos sintomáticos. Os resultados deste trabalho serão úteis para o estabelecimento de estratégias para o manejo da doença em campo.

<sup>1</sup> Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, UNIRARAS, SP - alexjr7@gmail.com

<sup>2</sup> Colaboradores: Instituto Agronômico de Campinas, Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeirópolis.

<sup>3</sup> Colaboradora: Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas- BA.

<sup>4</sup> Orientadora: Pesquisadora, Instituto Agronômico de Campinas, Centro APTA Citros Sylvio Moreira – Cordeirópolis –SP.

## ABSTRACT

Citrus leprosis is caused by *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) and transmitted by *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae). The disease is characterized by chlorotic and necrotic lesions on leaves, fruits and branches, and can cause severe damage to the crop. The management of leprosis relies almost exclusively on the use of acaricides, with millions of dollars spent annually in the control of the vector. It is speculated that not all types of lesions are viable for colonization of the mite and acquisition of the virus. The objective of this study was to evaluate the potential of different types of symptomatic branches as substrate for mite development and multiplication, sources of CiLV-C acquisition, and transmission. Branches in different types of lesions (chlorotic or necrotic) and diameters were assessed for those parameters. To verify the presence of CiLV-C, samples of each treatment were analyzed by RT-PCR. Preliminary data suggest colonization and survival of *B. phoenicis* on symptomatic branches. The results also showed that CiLV-C can be acquired and transmitted regardless of the type of symptoms (chlorotic or necrotic) in the branches. This information may be useful in establishing strategies for the management of the disease in the field.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador de citros, com uma estimativa de safra 2011-2012 de 387 milhões de caixas de laranja de 40,8 Kg. (Citrus BR, 2011 <http://www.citrusbr.com.br>). Embora competitiva, a citricultura brasileira apresenta baixa produtividade, principalmente por ser afetada por inúmeras pragas e doenças, estando entre as culturas com as maiores perdas devido ao ataque de insetos, ácaros e diversos patógenos.

A leprose dos citros é uma doença viral de maior importância econômica recente, especialmente no estado de São Paulo. A disseminação da doença pelas Américas causa preocupações aos EUA, pois desde os anos 1970 não se tem relato da leprose dos citros nessas áreas (BASTIANEL et al., 2010). A doença é causada pelo vírus da leprose dos citros (*Citrus leprosis virus C*, CiLV-C), e transmitida por *Brevipalpus phoenicis*, ácaro da família Tenuipalpidae, cosmopolita e polífago. Diferentemente de outras doenças transmitidas por vetores, a leprose dos citros não é uma doença sistêmica, ou seja, seu patógeno fica restrito ao local onde ocorreu alimentação do ácaro virulífero. Em geral, as folhas, ramos e frutos atacados

apresentam lesões, que aparecem cerca de 17 a 60 dias após a inoculação do vírus pelo ácaro (BASTIANEL et al., 2006).

Dependendo da quantidade de lesões, e da época de aparecimento de sintomas, pode ocorrer intensa desfolha na planta e queda dos frutos, e nos ramos a doença pode levar ao descamamento e à seca, tornando-os improdutivos. A alta infestação por ácaros virulíferos pode levar à diminuição da vida útil ou até a morte das plantas, principalmente quando são infectadas ainda jovens (ROSSETTI, 2001).

Embora existam diferentes tipos de lesões ocasionadas pelo CiLV-C, em várias idades de ramos, supostamente, nem todas as lesões constituem-se em fontes de inóculo da doença, quer por não conter mais o vírus, quer em razão de sua baixa titulação, ou ainda, pela impossibilidade de ser adquirido pelos ácaros em razão de condições inadequadas para sua alimentação. Dado o exposto, ressalta-se a importância de avaliar o risco que, diferentes lesões de leprose em ramos, em diferentes estágios de suberificação, representam para a multiplicação dos ácaros e para a disseminação da doença em campo.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial de diferentes tipos de ramos sintomáticos de plantas cítricas como fonte de inóculo do vírus da leprose dos citros, para subsidiar as práticas de redução de inóculo (poda de ramos sintomáticos) no manejo da doença e a viabilidade destes tecidos como locais de abrigo e multiplicação das populações de ácaros. Foram investigadas: (1) a presença do CiLV-C em lesões de ramos cítricos com diferentes diâmetros e estádios de suberificação (lesões cloróticas e necróticas); (2) a capacidade de colonização e sobrevivência de *B. phoenicis* nos diferentes tipos de ramos (cloróticos, necróticos e ramos secos com lesões); (3) a eficiência de aquisição do CiLV-C pelo ácaro nas diferentes lesões de leprose em ramos; e (4) a eficiência de transmissão do CiLV-C, adquirido pelo *B. phoenicis* nas lesões de leprose de ramos de vários diâmetros, para plantas sadias.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira”-IAC (CCSM-IAC), Cordeirópolis, SP, e as coletas de ramos foram feitas em pomares comerciais de citros.

### **Criação de *B. phoenicis***

A criação estoque de ácaros avirulíferos foi multiplicada em frutos de laranja doce (*C. sinensis*) e mantida em sala climatizada (25° C; 70-90% umidade e fotofase de 12 h).

### **Seleção e preparo dos ramos para colonização e sobrevivência de *B. phoenicis***

Os ramos foram coletados com o auxílio de tesoura de poda e acondicionados em sacos plásticos, mantidos sob refrigeração, até o início dos experimentos. O experimento foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos repetidos 15 vezes, sendo cada parcela representada por um segmento de ramo selecionado. Os ramos foram selecionados com diferentes diâmetros e de acordo com os diferentes tipos de lesões avaliadas - lesões antigas (necróticas) e recentes de leprose (cloróticas), e ramos secos com lesões.

Os ramos foram lavados e sob lupa retirados outros possíveis ácaros e insetos contaminantes. Em cada ramo, foi delimitada uma área de 10 cm nas extremidades, e demarcadas com cola entomológica Tanglefoot<sup>®</sup>, para evitar a fuga dos ácaros após a infestação.

Para a colonização foram transferidos para as áreas delimitadas, 10 ácaros adultos livres de CiLV-C, procedentes da criação-estoque. Após 15 a 30 dias da infestação, tempo suficiente para completar um ciclo biológico completo da população acarina, foi feita a contagem dos ácaros em todas as fases de desenvolvimento.

### **Aquisição e transmissão do CiLV-C nas diferentes lesões de leprose**

Foram selecionados 15 segmentos de ramos com 15 cm de comprimento, apresentando as características de cada tratamento (lesões cloróticas e necróticas). Após limpeza e preparo dos ramos, as extremidades foram delimitadas por Tanglefoot<sup>®</sup>. Cada segmento de ramo foi colocado, separadamente, em suportes, sobre bandejas contendo água para evitar ressecamento. Após a infestação, os ramos foram mantidos em sala climatizada (25° C; 70-90% de umidade e fotofase de 12 h).

As infestações foram feitas com 200 fêmeas avirulíferas de *B. phoenicis*, transferindo-as para cada seção isolada de ramo, seguindo os tratamentos. Os ácaros foram mantidos por três dias (72 h) para alimentação nas lesões de leprose e possível aquisição do CiLV-C. Após este período, os ácaros de cada tratamento foram transferidos em grupos de 10 para microtubos, com 3 repetições, e avaliados quanto a

infectividade nos diferentes tipos de ramos e lesões, através de diagnóstico molecular por RT-PCR (LOCALI et al., 2003).

Adicionalmente, para verificação da transmissão do CiLV-C, 15 ácaros de cada tratamento foram transferidos para 5 plântulas saudáveis de laranja, mantidas em casa de vegetação. Semanalmente, durante 60 dias, as plântulas foram inspecionadas para o surgimento e a quantificação de lesões.

### **Avaliação da presença do CiLV-C em de diferentes lesões de ramos**

Após a retirada dos ácaros de cada um dos tipos de ramos e lesões, foi feita a extração do RNA viral ao redor do tecido vegetal lesionado seguindo o método para extração do RNA total descrito por Gibbs & Mackenzie (1997). A presença do vírus foi confirmada pela amplificação de fragmento específico (LOCALI et al., 2003).

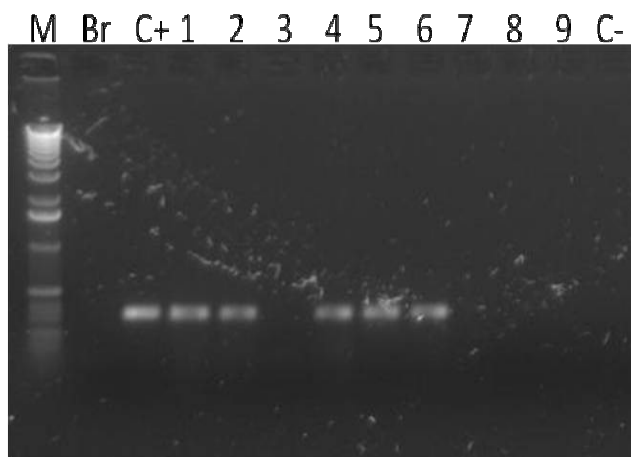
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Em ambos os tratamentos, utilizando ramos com lesões cloróticas e necróticas como fonte de inóculo do CiLV-C, foram observadas plantas com sintomas iniciais de leprose (Figura 1). Das plantas infestadas com ácaros mantidos em ramos com lesões cloróticas, após cerca de 20 dias, 70% apresentaram sintomas, enquanto para plantas infestadas com ácaros do tratamento com lesões necróticas 80% foram sintomáticas.



**Figura 1:** Plântulas de laranja doce com sintomas típicos de leprose, após infestação com ácaros mantidos em ramos com lesões cloróticas e necróticas.

As análises moleculares dos tecidos cloróticos e necróticos também foram positivas para presença do CiLV-C (Figura 2). Ambos resultados, biológicos e moleculares, comprovam que os ácaros são capazes de adquirir e transmitir o vírus da leprose para plantas saudáveis de citros.



**Figura 2:** Padrão de amplificação RT-PCR para a presença do CiLV-C em amostras de lesões cloróticas e necróticas em ramos de citros. M: marcador (Ladder 1Kb), Br: água para controle da reação, C+: Controle Positivo, 1, 2, 3: lesão de ramo necrótico, 4, 5, 6: lesão de ramo clorótico, 7, 8, 9: lesão em ramo seco; C-: controle negativo

No experimento de colonização foram observados, em média, 212 ovos e 54 ninfas, após cerca de 16 dias da infestação com ácaros adultos. Assim, embora preliminares, os resultados de colonização dos ácaros nos diferentes ramos, sugerem que o ácaro é capaz de colonizar e se manter em qualquer tipo de lesão. Porém, sugere-se que é necessário o tecido ser vegetativamente viável para a alimentação, visto que nos testes usando ramos secos com lesões não foram observados ácaros vivos após período de 72h. Novos ensaios estão sendo realizados para confirmar estas informações. Nos experimentos utilizando ramos com diferentes diâmetros não foram observadas diferenças na eficiência de aquisição e transmissão do CiLV-C. Portanto, esta característica não é determinante ou afeta a colonização dos ácaros ou a aquisição do vírus.

Diferentemente do que havia sido sugerido por Gravena (2005), que os sintomas antigos de leprose poderiam não mais conter o vírus, os resultados deste trabalho demonstraram que tanto lesões cloróticas quanto necróticas, independente do

diâmetro e estágios de suberificação dos ramos são fontes de inóculo do vírus CiLV-C e podem servir como abrigo para colonização e multiplicação dos ácaros.

## CONCLUSÃO

Os resultados biológicos e moleculares sugerem que em ramos de citros, tanto as lesões cloróticas quanto as necróticas são fonte de inóculo do vírus da leprose e podem potencializar a dispersão da doença em campo. Portanto, o manejo da doença em campo deve prever estratégias para eliminar estes tecidos que permanecem como fonte de inóculo.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida, à FAPESP pelo auxílio financeiro.

Ao CCSM – IAC, pela oportunidade de estágio.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTIANEL M., FREITAS-ASTÚA J., KITAJIMA E.W. & MACHADO M.A. The citrusleprosispathosystem. **Summa Phytopathologica** 32(3): 211-220, 2006.
- BASTIANEL, M., NOVELLI, V. M., KITAJIMA, E.W., KUBO, K.S., BASSANEZI, R.B., MACHADO, M.A. & FREITAS-ASTÚA, J. CitrusLeprosis: Centennial of an unusual mite-virus pathosystem. **Plant Disease** 94(3): 284-292, 2010.
- CITRUSBR, 2011. In: Exportações Brasileiras de Laranjas. Disponível em <http://www.citrusbr.com.br>, acesso em 18 de maio de 2011.
- GIBBS, A. & MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virology**, v.63, p.9-16, 1997.
- GRAVENA, S. **Manual Prático de Manejo Ecológico de Pragas de Citros**. Jaboticabal: Santa Teresina, 2005. p.372.
- LOCALI, E.C.; ASTUA, J. F.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; MONGE, G.A.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W. & MACHADO, M.A. Development of a molecular to major threat to citrus production in the Americas. **Plant Disease** 87(11): 1317-1321, 2003.
- ROSSETTI, V.V. **Manual ilustrado de doenças dos citros**. Piracicaba: Fealq-Fundecitrus, 2001. 207p.