

**POTENCIAL DE FOLHAS, FRUTOS E RAMOS DE CITROS COMO FONTE DE
INÓCULO DO VÍRUS DA LEPROSE DOS CITROS**

BRUNA AP. **CUNHA**¹; MARIA A. **NUNES**²; ALEX JR. **SOARES**²; MARCELA P.
BERGAMINI²; MARINÊS **BASTIANEL**²;
JULIANA **FREITAS-ASTUA**^{2,3}; VALDENICE M. **NOVELLI**⁴

Nº 11113

RESUMO

A leprose é considerada a doença viral de maior importância econômica dos citros no Brasil, especialmente no estado de São Paulo, onde causa prejuízos anuais estimados em 100 milhões de dólares aos produtores s. A doença é causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) e transmitida pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. Os sintomas são caracterizados por lesões locais, cloróticas e necróticas, em folhas, frutos e ramos. Dependendo do nível de infestação, as plantas com leprose podem apresentar acentuada queda de frutos e definhamento, terminando com a sua morte. Alguns estudos sugerem que nem todas as lesões de leprose 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 o vírus ser adquirido pelos ácaros. O objetivo deste trabalho foi verificar, por ensaios biológicos e moleculares, o potencial de diferentes tipos de lesões em folhas, frutos e ramos sintomáticos, como fonte de inóculo e disseminação do CiLV-C. Através dos resultados obtidos foi possível estabelecer o tipo de lesão em folhas, frutos e ramos com maior potencial como fonte de inóculo do vírus. Estas informações deverão auxiliar os produtores para o correto manejo da doença no campo.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas UNIARARAS Araras/SP,
bruna.ap.cunha@gmail.com

² Colaboradores: Instituto Agrônomo de Campinas, Centro APTA Citros Sylvio Moreira – Cordeirópolis

³ Colaboradora: Embrapa Mandioca e Fruticultura – Cruz das Almas - BA.

⁴ Orientadora: Pesquisadora, Instituto Agrônomo de Campinas, Centro APTA Citros Sylvio Moreira – Cordeirópolis –SP.

ABSTRACT

Leprosis is considered the most important viral disease affecting citrus in Brazil, especially in São Paulo State, where annual losses are estimated in 100 million dollars. The disease is caused by *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) and transmitted by *Brevipalpus phoenicis* mites. Leprosis is characterized by the presence of chlorotic and necrotic localized lesions in leaves, fruits, and branches. Depending on the level of infestation, the plants may have accentuated leaf and fruit drop, and can die. Some studies suggest that not all lesions are sources of inoculum of the virus. The objective of this study was to evaluate the potential of different types of lesions (chlorotic and necrotic) on leaves, fruits and branches as sources of inoculum of CiLV-C. Through these results it was possible to determine the type of lesion on leaves, fruits and branches with the greatest potential as source of inoculum of CiLV-C. This information may lead to a better management of the disease in the field.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de laranja, com uma estimativa de receita para exportação brasileira de dois bilhões de dólares para a safra 2010/2011 (Citrus BR, 2011 <http://www.citrusbr.com.br>). Porém, embora competitiva, a citricultura brasileira é bastante vulnerável em função da estreita base genética e dos diversos problemas fitossanitários. Dentre esses problemas, a leprose dos citros é considerada uma das doenças de maior importância econômica, especialmente no estado de São Paulo. A leprose foi descrita originalmente na Flórida (EUA) há mais de 100 anos, e relatada nas décadas seguintes no Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil, recentemente constatada na Bolívia, Venezuela, Colômbia, e em praticamente todos os países da América Central e no México (BASTIANEL et al., 2010). Esta disseminação pelas Américas causa preocupação aos EUA, onde a leprose dos citros não é relatada desde os anos 1970, e às ilhas do Caribe, ainda indenes, pelos possíveis danos que a doença possa vir a causar, dada sua natureza destrutiva.

A doença é causada pelo *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C) e transmitida por ácaros do gênero *Brevipalpus* spp., sendo que a espécie *B. phoenicis* é o vetor dominante no estado de São Paulo (RODRIGUES et al., 2005). O ácaro pode adquirir e inocular o CiLV-C em qualquer fase ativa de seu desenvolvimento (larva, ninfa e adulto), não havendo passagem transovariana do vírus (BOARETTO et al., 1993; NOVELLI et al., 2005), portanto o CiLV-C uma vez adquirido não é transmitido às gerações posteriores.

Os sintomas da doença são caracterizados por lesões locais em folhas, frutos, ramos e, quando a planta apresenta alta taxa de infecção, pode ocorrer queda prematura dos frutos e definhamento, levando a planta à morte (ROSSETTI, 2001). Em geral, acarreta sérios prejuízos à cultura, tanto com relação às perdas de produção, quanto para o controle da doença. Estimam-se gastos na ordem de 60 a 100 milhões de dólares com uso de acaricidas e, dependendo do grau de infestação e da suscetibilidade da variedade à doença, pode ocorrer a redução de 30 a 100% da produção (BASTIANEL et al., 2010). Portanto, na quase totalidade dos pomares, o manejo é feito de maneira preventiva e o controle por acaricidas representa o mais importante grupo de produtos fitossanitários usados na citricultura brasileira.

Provavelmente, 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 o vírus ser adquirido pelos ácaros devido às condições inadequadas para sua alimentação. Assim, embora as lesões possam, supostamente, oferecer condições ao ácaro para seu abrigo e reprodução, não é comprovado se de fato constituem-se em fontes de alimentação e aquisição do CiLV-C.

Dado o exposto, ressalta-se a importância de avaliar o risco que diferentes tipos lesões de leprose em folhas, frutos e ramos, em diferentes estádios de suberificação, representam para a disseminação da doença. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, através de ensaios biológicos e moleculares, o potencial de diferentes tipos de lesões em folhas, frutos e ramos sintomáticos de plantas cítricas, como fonte de inóculo do CiLV-C, para subsidiar as práticas de redução de inóculo no manejo da doença de forma econômica e prática.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Acarologia, e em casa de vegetação, no Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” – IAC, Cordeirópolis-SP. As coletas de folhas, frutos e ramos com lesões de leprose foram feitas em pomar orgânico, de plantas de laranja Westin (*Citrus sinensis* L. Osbeck) enxertadas em limão Cravo (*C. limonia* Osbeck), no município de Borborema/SP.

Criação-estoque de ácaros *B. phoenicis* avirulíferos

A criação-estoque de ácaros não-virulíferos, iniciada a partir de ovos, foi feita sobre frutos de laranja doce (*C. sinensis*), dada a alta suscetibilidade destes à leprose. Os frutos foram coletados em pomares isentos de pulverizações, lavados e secos para a total retirada, de possíveis ácaros e insetos, sob microscópio estereoscópico. Após limpeza, os frutos foram preparados seguindo metodologia padrão para preservação e isolamento dos ácaros, conforme descrita em Rodrigues et al. (2007).

Sempre que necessário, os frutos em início de deterioração foram substituídos por frutos de mesma origem, previamente preparados e vistoriados. A transferência dos ácaros foi feita pela justaposição e/ou encostia dos frutos. A criação-estoque foi mantida em sala climatizada à uma temperatura de 25°C, com umidade relativa do ar de 70-90% e fotofase de 12 horas.

Tratamentos para verificar a capacidade de aquisição e transmissão do CiLV-C pelo *B. phoenicis*.

Os diferentes tecidos lesionados (folhas, frutos e ramos) foram coletados e desinfetados no laboratório, conforme mencionado acima. Os tratamentos realizados incluíram diferentes tipos de tecidos e lesões de leprose (Tabela 1). Os ramos foram selecionados e cortados em tamanhos de aproximadamente 23 cm de comprimento, deixando 7 cm da parte apical do ramo e 10 cm da parte inferior delimitadas por cola Tanglefoot®. Cada tratamento foi feito com 15 amostras de cada tipo de lesão, clorótica e necrótica, com cinco repetições, sendo a cada três amostras de tecido uma repetição. Em seguida com auxílio de um pincel foram transferidos para cada ramo 30 fêmeas adultas de *B. phoenicis* livres de CiLV-C. Os ramos infestados foram colocados, separadamente, em suportes, e mantidos em bandejas contendo água, para evitar dessecação. Após infestação foram mantidos em sala climatizada com temperatura de 25°C, umidade relativa do ar de 70-90% e fotofase de 12 horas.

Trinta folhas contendo lesões cloróticas e necróticas foram lavadas e examinadas com auxílio de microscópio estereoscópico para eliminação de possíveis ácaros e insetos remanescentes. Após a secagem, cada folha foi colocada em placa de Petri e as bordas isoladas com tiras de algodão umedecido, para impedir a fuga dos ácaros. Em seguida, com auxílio de um pincel foram transferidas para cada folha 30 fêmeas adultas de *B. phoenicis* livres de CiLV-C. Após, os tratamentos foram mantidos em sala climatizada nas condições anteriormente descritas.

Os frutos contendo as lesões cloróticas e necróticas foram previamente preparados, lavados e desinfetados. Em seguida com auxílio de um pincel foram

transferidas 30 fêmeas adultas avirulíferas de *B. phoenicis*. Após infestação, os frutos foram isolados em bandejas e mantidos em sala climatizada. Para todos os tratamentos foram feitos experimentos controle, ou seja, ácaros avirulíferos foram transferidos para folhas, frutos e ramos saudáveis e sem lesões. Após cada infestação, os ácaros foram mantidos nestes diferentes tecidos e lesões, por aproximadamente 72 h para aquisição do CiLV-C.

Tabela 1. Relação dos tratamentos estabelecidos para a aquisição e transmissão de CiLV-C por *B. phoenicis* em ramos, folhas e frutos de laranja com sintomas de leprose.

Tratamentos	
T1	Ramos com lesões cloróticas de leprose
T2	Ramos com lesões necróticas de leprose
T3	Ramos sadio, sem sintomas de leprose (controle)
T4	Folhas com lesões cloróticas de leprose
T5	Folhas com lesões necróticas de leprose
T6	Folhas saudáveis, sem sintomas de leprose (controle)
T7	Frutos com lesões cloróticas de leprose
T8	Frutos com lesões necróticas de leprose
T9	Frutos saudáveis, sem sintomas de leprose (controle)

Avaliação da aquisição do CiLV-C pelos ácaros

Após período de aquisição (72 h) as amostras de cada tratamento foram transferidas em grupos de 10 ácaros para microtubos e avaliadas quanto a infectividade nos diferentes tipos de tecidos e lesões, através de RT-PCR de acordo com metodologia descrita em Kubo et al. (2011).

Avaliação da transmissão do CiLV-C pelos ácaros

Aproximadamente 15 ácaros de cada tratamento (folhas, frutos e ramos) foram transferidos, com auxílio de um pincel, para 5 plântulas saudáveis de laranja doce. Diariamente, por um período de até 60 dias, após a transferência dos ácaros, foi verificado o surgimento de lesões de leprose. Estas plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas sempre que necessário.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificação da aquisição do CiLV-C por *B. phoenicis*, através de RT-PCR, utilizando iniciadores gênicos específicos, em 100% dos ácaros mantidos isolados em

folhas contendo lesões cloróticas de leprose foi detectada a presença do vírus. Enquanto que, nas lesões necróticas de folhas o percentual de ácaros diagnosticados como positivos foi de 60%. Já para as amostras provenientes das lesões em frutos este percentual variou de 80% de ácaros positivos para as lesões cloróticas e 60% para os de lesões necróticas. Portanto, embora tenham ocorrido variações no percentual de amostras positivas, em ambos os tipos de tecidos (folhas e frutos) e de lesões (cloróticas e necróticas) os ácaros foram capazes de adquirir o CiLV-C. Experimentos anteriores de Cunha et al. (2010) também sugeriram que ambos os tipos de lesões em ramos de citros podem ser importantes fontes de inóculo e devem ser considerados no manejo da doença para evitar a disseminação do vírus nos pomares.

Quanto à transmissão do CiLV-C, após aproximadamente 20 dias, 100% das plântulas infestadas com os ácaros provenientes das lesões cloróticas de folhas e frutos apresentaram sintomas característicos de leprose. Enquanto que 80 e 100% das plântulas infestadas com ácaros das lesões necróticas de folhas e frutos, respectivamente, foram positivas para a doença (Figura 1).

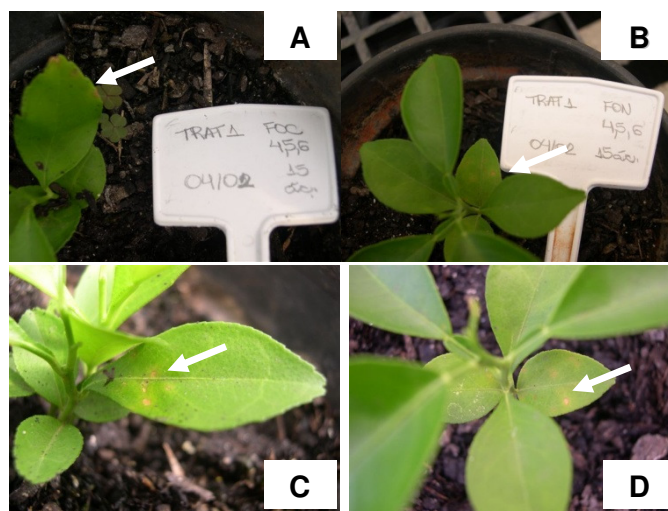


Figura 1: Plântulas de laranja com sintomas de leprose, após infestação com ácaros provenientes de folhas com lesões cloróticas (A) e necróticas (B), e com ácaros de frutos com lesões cloróticas (C) e necróticas (D).

No experimento de transmissão utilizando ramos, para as plantas infestadas com os ácaros mantidos em lesões, aproximadamente 100% apresentaram sintomas típicos de leprose, tanto para as amostras de ácaros provenientes de lesões cloróticas, quanto para os de lesões necróticas, confirmando o potencial deste tipo de tecido lesionado como fonte de inóculo do CiLV-C. Para o experimento de aquisição, os

resultados de RT-PCR não foram conclusivos e estão em andamento novas repetições. Entretanto, devido aos resultados de transmissão terem sido positivos, ou seja, as plantas infestadas com ácaros provenientes das lesões apresentaram sintomas, podemos indiretamente concluir que ocorre a aquisição do CiLV-C.

Os resultados deste experimento, investigando os diferentes tipos de tecidos e lesões, estão sumarizados na Tabela 2. Esses dados corroboram os trabalhos de Pattaro (2006) e Andrade et al. (2010) ressaltando a importância da poda e retirada de material com lesões em campo e, portanto, respondem o constante questionamento dos produtores quanto a importância dos diferentes tipos de tecidos e lesões de leprose como fonte de inóculo. Sendo assim, consideramos que tanto as lesões cloróticas quanto as necróticas, nos diferentes tecidos da planta, devem ser eliminados do campo, mantendo em baixa a porcentagem de inóculo e diminuindo assim a oportunidade do ácaro tornar-se infectivo.

Tabela 2: Porcentagem de plantas e RT-PCR positivos para o CiLV-C, de acordo com o tipo de lesão em ramos, folhas e frutos. CL = lesão clorótica, NE = lesão necrótica.

* dados inconclusivos

TRATAMENTOS	PLANTAS	RT-PCR
RAMO CL	70%	*
RAMO NE	80%	*
FOLHA CL	100%	100%
FOLHA NE	80%	60%
FRUTO CL	100%	80%
FRUTO NE	100%	60%

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos neste trabalho foi possível verificar que não importa o tipo de órgão afetado ramo, folha e fruto, o ácaro *B. phoenicis* é capaz de adquirir e transmitir o vírus da leprose, independente do tipo de lesão (clorótica ou necrótica).

AGRADECIMENTOS

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

Ao CCSM – IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D.J., OLIVEIRA, C. A. L. & PATTARO, F. C. Poda no manejo da leprose dos citros: uma visão técnica e econômica. **Ciência e Prática** 36: 20-22, 2010.
- BASTIANEL, M., NOVELLI, V. M., KITAJIMA, E.W., KUBO, K.S., BASSANEZI, R.B., MACHADO, M.A. & FREITAS-ASTÚA, J. Citrus Leprosis: Centennial of an unusual mite-virus pathosystem. **Plant Disease** 94(3): 284-292, 2010.
- 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 seus descendentes, em condições de laboratório. **Científica** 21(2): 245-253, 1993.
- CITRUSB, 2011. In: Notícias: Exportações de suco de laranja pode render US\$ 2 bilhões em 2011. Disponível em <http://www.citrusbr.com.br>, acesso em 11/06/2011.
- CUNHA, B.A.; NUNES, M.A.; FREITAS-ASTUA, J.; BERGAMINI, M.P.; BASTIANEL, M. & NOVELLI, V.M. Different symptomatic tissues as sources of inoculum to *Citrus leprosis virus C* (CILV-C). **Citrus Research & Technology** 31 (Supl.), p. 128, 2010.
- KUBO, K.S.; NOVELLI, V.M.; BASTIANEL, M.; LOCALI-FABRIS, E.C.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; MACHADO, M.A. & FREITAS-ASTÚA, J. Detection of *Brevipalpus*-transmitted viruses in their mite vectors by RT-PCR. **Experimental & Applied Acarology** 53(1): 33-39, 2011.
- 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 do citros (CiLV-C) através de RT-PCR em diferentes fases de desenvolvimento do ácaro vetor (*Brevipalpus phoenicis*). **Fitopatologia Brasileira** 30, supl., p. S183, 2005.
- PATTARO, F. C. **Poda e controle químico como táticas de manejo da leprose dos citros**. Tese (Doutorado em Agronomia Entomologia Agrícola – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- RODRIGUES, V., ARRIVABEM, F., FREITAS-ASTUA, J., BASTIANEL, M., ANTONOLI-LUIZON, R., NOVELLI, V.M., LOCALI, E.C., GOULART, C. & MACHADO, M.A. Não-transmissão de isolado brasileiro do vírus da leprose dos citros por *Brevipalpus obovatus*. **Summa Phytopathologica** 31, supl., p. 64 (175), 2005.
- RODRIGUES, V.; BASTIANEL, M.; KUBO, K.; FADEL, A. L.; NICOLINI F.; NOVELLI, V. M. & FREITAS-ASTÚA, J. Desenvolvimento de um método para a otimização da transmissão experimental do vírus da leprose dos citros. **Laranja** 28(1):29-38, 2007.
- ROSSETTI, V.V. Manual ilustrado de doenças dos citros. Piracicaba: Fealq-Fundecitrus, 2001. 207p.