

POTENCIAL DE COLONIZAÇÃO DO ÁCARO DA LEPROSE (*BREVIPALPUS PHOENICIS*) EM RAMOS E FRUTOS COM SINTOMAS CLORÓTICOS E NECRÓTICOS DE LEPROSE

THAMIRIS P. SIPRIANO¹; VALDENICE M. NOVELLI²; ALEX JUNIOR SOARES³;
MARIA ANDRÉIA NUNES⁴; MARCELA P. BERGAMINI⁵

Nº 12150

RESUMO

A leprose dos citros é uma das doenças virais de maior importância, principalmente para a citricultura paulista. É causada pelo vírus da leprose dos citros (*Citrus leprosis virus* – CiLV), transmitida pelo ácaro vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes, e caracterizada por lesões locais em folhas, frutos, e ramos e, dependendo do grau de infestação, pode gerar grandes prejuízos aos citricultores. O manejo da doença é feito com base no controle da presença do vetor nos pomares, e quase que exclusivamente com uso de acaricidas, comprometendo o orçamento citrícola em milhões de dólares anuais. Alguns estudos sugerem que nem todas as lesões de leprose constituem-se em abrigos ideais para o ácaro e nem como fontes de inóculo da doença. O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de diferentes tipos de lesões em frutos e ramos sintomáticos para a colonização do ácaro e, conseqüentemente, disseminação do vírus da leprose dos citros (CiLV-C). A avaliação foi feita observando-se o tipo de tecido e de lesões, cloróticas ou necróticas, em frutos e ramos, verificando a multiplicação do ácaro nestes tecidos, bem como a aquisição do vírus. Esperava-se estabelecer o tipo de tecido com lesões em frutos e ramos com maior potencial de colonização pelo ácaro da leprose e verificar a eficiência deste comportamento como fonte de aquisição do CiLV-C. Estes resultados poderão ser úteis para definição de estratégias para o manejo da doença em campo, reduzindo custos de poda e diminuindo o custo dos tratamentos fitossanitários através da redução do uso de acaricidas.

¹ Bolsista CNPq: Graduação em Ciências Biológicas, UNIARARAS, Araras-SP, thamirissipriano@hotmail.com

² Orientadora: Pesquisadora, IAC-CCSM, Cordeirópolis-SP.

³ Colaborador: Bolsista IC-CNPq, UNIARARAS, Araras-SP e IAC-CCSM.

⁴ Colaboradora: PD-FAPESP, IAC-CCSM, Cordeirópolis-SP.

⁵ Colaboradora: Bolsista IC-FAPESP, UFSCar-Araras, SP e IAC-CCSM.

ABSTRACT

Citrus leprosis is a viral disease of the most importance, especially for the citrus industry in São Paulo. It is caused by *Citrus leprosis virus* (CiLV-C), transmitted by *Brevipalpus phoenicis* Geijskes, and characterized by local lesions on leaves, fruits, and branches. The management of the disease is made based on the presence and control of vector in orchards, and almost exclusively with the use of acaricides, compromising citrus orchards in millions of dollars annually. Some studies suggest that not all leprosis lesions are ideal for colonization mites and as source of inoculum of disease. The objective of this study was to evaluate the potential of different types of lesions in symptomatic branches and fruit for the colonization of the mite. The evaluation was made by observing the type of tissue injury and, chlorosis or necrosis, in fruit and twigs, checking the multiplication mite these tissues, and the acquisition of the virus. Through this work is possible to establish the type of tissue injury in fruits and branches with the greatest potential for colonization by leprosis mite and verify the efficiency of this behavior as a source of acquisition of CiLV-C. These results may be useful for developing strategies for disease management in the field, reducing costs and pesticide treatments.

INTRODUÇÃO

A leprose dos citros é considerada a de maior importância econômica recente, especialmente no estado de São Paulo. Descrita originalmente na Flórida (EUA) há mais de 100 anos, e relatada nas décadas seguintes no Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil, recentemente foi 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 nas ilhas do Caribe, ainda indenens, pelos possíveis danos que a doença possa vir a causar, dada sua natureza destrutiva.

A doença é causada pelo vírus *Citrus leprosis virus* (CiLV), mais comumente pelo tipo citoplasmático (CiLV-C), e transmitida por ácaros do gênero *Brevipalpus* spp., sendo caracterizada 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). Anualmente, são estimados 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 (NEVES et al., 2004; BASTIANEL et al., 2006). Portanto, na quase totalidade dos pomares, o manejo é feito de maneira preventiva e o controle químico, através de acaricidas, representa o mais importante grupo de produtos fitossanitários usados na citricultura brasileira.

No Brasil, a transmissão da leprose dos citros é feita por *B. phoenicis* (MUSUMECI & ROSSETTI, 1963). O ácaro pode adquirir e inocular o CiLV-C em qualquer uma das fases de seu desenvolvimento (larva, ninfa, e adulto) e estudos indicam que o CiLV-C uma vez adquirido

não é transmitido às gerações posteriores; portanto não ocorre passagem transovariana do vírus em *B. phoenicis* (BOARETTO et al. 1993; CHIAVEGATO, 1995; NOVELLI et al. 2005).

As lesões ocasionadas pelo CiLV-C, em folhas e frutos, e em diferentes idades de ramos, são caracterizadas como lesões cloróticas ou necróticas. No entanto, não existe um estudo que comprove a eficiência destas lesões como locais de multiplicação e manutenção das populações de ácaros no campo. O tipo de lesão ou estágio de desenvolvimento dos sintomas podem também interferir nos resultados para diagnóstico da doença. Supostamente, as lesões cloróticas ou iniciais de leprose são as mais adequadas para testes moleculares quando comparadas com as lesões do tipo necróticas. Os resultados obtidos por Gomes e colaboradores (2004), através de microscopia eletrônica, demonstraram que em lesões novas de folhas, a maioria das células da epiderme e parênquima do mesófilo contém o vírus, enquanto, em lesões maduras, o número de células contendo o vírus é menor. Porém, ainda não é conhecido o potencial destes locais para a multiplicação dos ácaros e a conseqüente disseminação do CiLV-C no campo.

Ao estabelecer o tipo de lesão com maior potencial de multiplicação do ácaro e disseminação do vírus, espera-se reduzir o custo total do tratamento fitossanitário com a redução do uso de acaricidas e, assim, viabilizar a sua adoção pelos citricultores como medida de manejo da leprose dos citros. Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial de diferentes tipos de lesões de leprose em frutos e ramos sintomáticos de plantas cítricas, como abrigo para a multiplicação dos ácaros e, conseqüentemente, como fonte de inóculo do vírus (CiLV-C), para subsidiar as boas práticas de manejo da doença, de forma econômica e prática.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no laboratório de Acarologia, e em casa de vegetação, no Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – IAC, Cordeirópolis-SP. As coletas de frutos e ramos com lesões de leprose foram feitas em pomares comerciais de citros, pertencentes a citricultores parceiros.

Criação-estoque de *B. phoenicis* avirulíferos : A criação-estoque de ácaros não-virulíferos foi desenvolvida em frutos de laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck), dada a alta suscetibilidade que estes apresentam à leprose. Os frutos foram coletados em pomares isentos de pulverizações, lavados e secos para a total retirada, sob microscópio estereoscópico, de possíveis ácaros e insetos presentes. Os frutos foram parcialmente parafinados, deixando-se uma área circular de 2,5 cm de diâmetro, e as arenas de criação delimitadas por uma barreira adesiva com cola entomológica (Tanglefoot[®]) para impedir a fuga dos ácaros. A criação-estoque dos ácaros não-virulíferos foi iniciada a partir de ovos de *B. phoenicis* obtidos de uma criação mantida há vários anos, em laboratório. Sempre que necessário, os frutos em início de deterioração foram substituídos por frutos de mesma origem, previamente preparados e

vistoriados como descrito anteriormente. 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.

Capacidade de colonização de *B. phoenicis* em diferentes lesões de leprose de frutos e ramos de citros:

preparo do material: em campo foram selecionados frutos e ramos com lesões cloróticas e necróticas de leprose. Em laboratório todo material foi lavado e examinado com auxílio de microscópio estereoscópico para eliminação de possíveis ácaros e insetos. Foram utilizados para cada tratamento 15 amostras de cada tipo de tecido (frutos e ramos), com cinco repetições, sendo a cada três amostras de tecido uma repetição. Os frutos foram parcialmente parafinados, deixando-se uma área circular de 2,5 cm de diâmetro, e os locais das lesões delimitados por cola Tanglefoot®. Os ramos foram selecionados em tamanhos de aproximadamente 20 cm de comprimento, deixando 5 cm da parte apical do ramo e 10 cm da parte inferior delimitadas por cola Tanglefoot®. Cada segmento de ramo foi colocado, separadamente, em suporte e deixado na água até o limite do anel inferior com Tanglefoot®. Todo material preparado (frutos e ramos) foi infestado por ácaros avirulíferos e mantidos em sala climatizada a uma temperatura de 25°C, com 70-90% de umidade relativa do ar e fotofase de 12 horas. A disposição do material na sala climatizada foi inteiramente casualizada.

Infestações com ácaros avirulíferos: trinta fêmeas adultas de *B. phoenicis*, procedentes da criação-estoque não-virulífera foram transferidas para cada tipo de tecido isolado (frutos e ramos) de acordo com cada tratamento (Tabela 1). A transferência dos ácaros foi realizada com auxílio de um pincel de único pêlo. Estes ácaros foram mantidos por 30 a 60 dias, nos diferentes tratamentos para alimentação, multiplicação, e conseqüente aquisição do CiLV-C.

Capacidade de colonização e sobrevivência de *B. phoenicis*: decorridos 30 e 60 dias após infestação dos ramos (Tabela 1), foi feita a contagem do número de ovos, larvas, ninfas e adultos de *B. phoenicis* sobre frutos e ramos de citros contendo diferentes lesões de leprose, estabelecendo-se qual melhor local para abrigo e multiplicação do ácaro.

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

T1	Frutos com lesões cloróticas de leprose
T2	Frutos com lesões necróticas de leprose
T3	Frutos sadios, sem sintomas de leprose (controle)
T4	Ramo de 20 cm com lesões cloróticas de leprose
T5	Ramo de 20 cm com lesões necróticas de leprose
T6	Ramo de 20 cm sadios, sem sintomas (controle)
T7	Ramos de 20 cm secos, com sintomas de leprose

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da colonização de *B. phoenicis* em ramos e frutos com lesões cloróticas e necróticas de leprose: Foram selecionados ramos e frutos de planta adulta, cultivada em pomar orgânico, contendo as diferentes lesões. Para cada tratamento foram usados 15 ramos destacados, mantidos em suporte plástico sobre bandejas contendo água, e 15 frutos previamente parafinados e preparados (Figura 1), seguindo metodologia de Rodrigues et al. (2007). Em cada fruto e ramo foram transferidos 30 ácaros avirulíferos, das populações mantidas no laboratório de Acarologia. Como controle foram usados ramos e frutos sem lesões igualmente tratados e infestados. Após infestações, todos os tratamentos foram mantidos em sala climatizada com temperatura de 25°C (+/- 5°C).

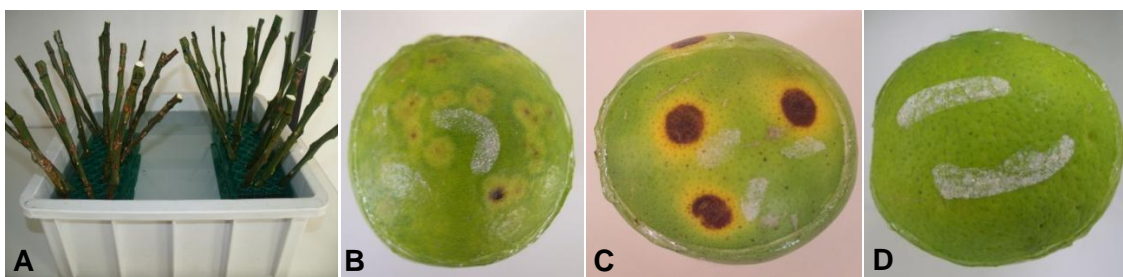


Figura 1. Experimentos em ramos (A) e frutos (B-lesões cloróticas, C-necróticas, D-controle) para a avaliação da colonização de ácaros.

O objetivo era avaliar a colonização após 30 e 60 dias das infestações, verificando o número de ácaros em cada uma das fases biológicas e, desta maneira, se havia o estabelecimento das populações. Porém, nos experimentos envolvendo os ramos ocorreu a deterioração dos tecidos antes do término do período de contagem das fases. Verificou-se que no início do experimento, logo após a infestação ocorreu a postura de um grande número de ovos, porém no decorrer do tempo praticamente não observamos a eclosão e desenvolvimento das fases seguintes (Figura 2). Portanto, estas avaliações mostraram que a viabilidade dos ramos destacados é de no máximo 12 dias, após este período o tecido torna-se impróprio para a sobrevivência dos ácaros. Uma das alternativas testadas foi a encostia de um novo ramo nestes já em início de deterioração; porém, não tivemos sucesso já que aparentemente este procedimento causava estresse e a conseqüente morte dos ácaros.

Os experimentos de frutos foram iniciados e após 60 dias de colonização, no total de 5 repetições de cada tratamento (controle, cloróticos e necróticos), observamos respectivamente 731, 105 e 671 indivíduos, considerando ovos, larvas, ninfas (protoninfas e deutoninfas) e adultos de *B. phoenicis*. Aparentemente há uma tendência de melhor estabelecimento das populações de ácaros em frutos contendo lesões necróticas, quando comparados aos frutos do

grupo controle (Figura 3). Porém, como também tivemos problemas com a deterioração dos frutos novas infestações estão sendo conduzidas para confirmar estes resultados.

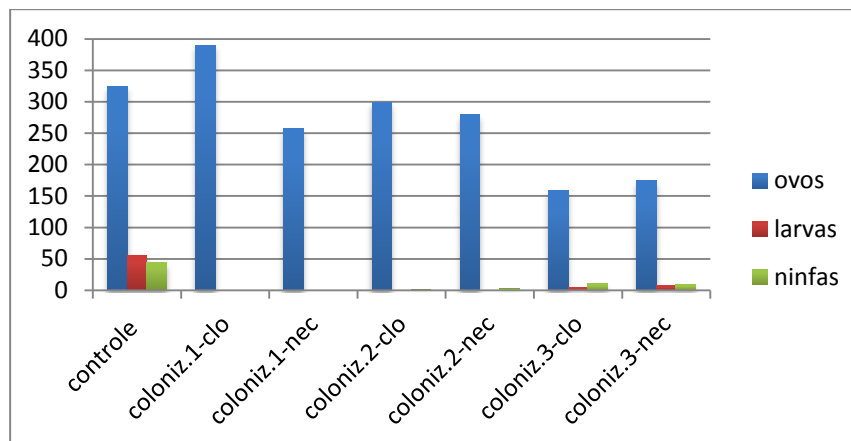


Figura 2. Número de ovos, larvas e ninfas em ramos destacados contendo lesões cloróticas (clo) e necróticas (nec) de leprose, em diferentes períodos (coloniz. 1, 2, 3), após infestação de ácaros adultos.

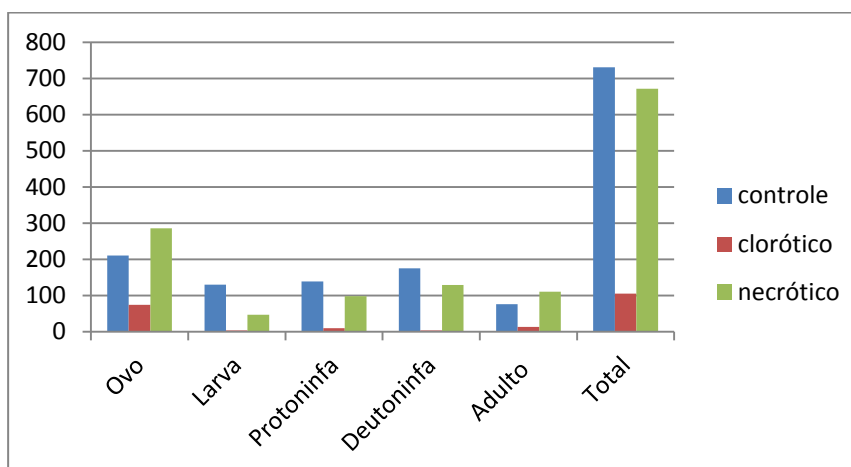


Figura 3. Número de ovos, larvas, ninfas (protoninfas e deutoninfas) e adultos de *B. phoenicis* observados após a colonização por 60 dias em frutos destacados sadios (controle) e em frutos contendo lesões cloróticas e necróticas de leprose, partindo de um número de inicial de 30 ácaros adultos.

Método alternativo para avaliação de ramos com sintomas como potencial local de colonização dos ácaros: conforme acima mencionado, os experimentos de colonização por terem sido conduzidos em ramos destacados, não tiveram sucesso na manutenção dos ácaros durante todo período necessário para a avaliação das fases biológicas (ovos, larvas, ninfas e adultos).

Portanto, para tornar viável a condução do experimento de colonização e estabelecimento das populações de ácaro em citros, as avaliações deverão ser feitas diretamente em ramos de plantas adultas protegidas, mantidas em campo. Assim, em pomar de laranja foram selecionadas duas plantas intensamente lesionadas por leprose, com lesões antigas e recentes em ramos de diferentes diâmetros e estádios de suberificação. Estas plantas foram retiradas com o auxílio de enxadão e trator, mantendo a integridade das raízes e copa. O sistema radicular das plantas e parte de solo foram acondicionados em sacos de estopa e molhados. Imediatamente, as plantas foram transportadas até as dependências do CCSM-IAC e transplantadas para o campo experimental. Nesta fase estamos aguardando o re-estabelecimento das plantas, as quais serão protegidas por um telado (Figura 3). Os ramos selecionados serão marcados, desinfestados de outros ácaros e insetos, delimitados com cola entomológica e infestados com os ácaros provenientes de nossas populações de laboratório.

Os frutos para o experimento de avaliação de lesões, cloróticas e necróticas, serão novamente coletados em pomares orgânicos e infestados com os ácaros. Será feito o acompanhamento de todo ciclo biológico do ácaro, nos diferentes tipos de lesões em ramos e frutos, verificando se há ou não o estabelecimento nos diferentes tipos de lesões e estimando o quanto estes tecidos são favoráveis ao desenvolvimento do ácaro.



Figura 4. Vista geral: (A) pomar orgânico e (B, C, D) plantas selecionadas para avaliação da colonização de ácaros da leprose em ramos com sintomas cloróticos e necróticos de leprose, (E) transporte das plantas para área experimental no CCSM-IAC, (F) plantas podadas no campo, em fase de re-estabelecimento para futuras infestações e avaliações.

DIFICULDADES ENCONTRADAS

A deterioração dos tecidos foi a maior dificuldade para a manutenção dos ramos e frutos durante os ensaios. Esperamos que com esta nova estratégia de avaliação direta em planta adulta, mantida em campo, possamos observar se ocorre a colonização dos ácaros nos diferentes tecidos lesionados, principalmente em ramos. Após o estabelecimento das plantas transplantadas para o campo experimental do CCSM-IAC, serão conduzidas as infestações nos ramos lesionados, e novos frutos serão coletados e avaliados quanto à colonização.

CONCLUSÃO

Aparentemente é possível a colonização de ácaros *B. phoenicis* em tecidos lesionados de frutos por leprose, com tendência há melhor multiplicação em lesões necróticas. Em ramos os experimentos utilizando plantas adultas lesionadas serão realizados para confirmação.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

Ao CCSM-IAC, pela oportunidade de estágio.

REFERÊNCIAS

- BASTIANEL M., FREITAS-ASTÚA J., KITAJIMA E.W. & MACHADO M.A. The citrus leprosis pathosystem. *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. 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.
- CHIAVEGATO, L.G. Avaliação da potencialidade de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) na transmissão da leprose em plantas cítricas. In: *Anais do 15º Congresso de Entomologia ... Caxambu*, p.14, 1995.
- GOMES, R.T.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; SALAROLI, R.B. & KITAJIMA, E.W. Distribution of CiLV-C in the citrus leaf lesions. *Resumo – XII Congresso Brasileiro de Biologia Celular*, Campinas, 2004.
- MUSUMECI, M.R. & ROSSETTI, V. Transmissão dos sintomas da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. *Ciência e Cultura* 15: 228. 1963.
- NEVES, E.M.; RODRIGUES, L. & GASTALDI, H.L.G. Defensivos agrícolas e custos na produção de citros. *Visão Agrícola* 1(2): 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 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.
- 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.