

DETECÇÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DOS CITROS NO ÁCARO VETOR

VALDENICE M. NOVELLI^{1,2}, JULIANA FREITAS-ASTÚA^{1,3},
ELIANE C. LOCALI-FABRIS¹, MARINÊS BASTIANEL¹, RENATA ANTONIOLI-LUIZON¹,
BERGHEM MORAIS RIBEIRO¹ e MARCOS ANTÔNIO MACHADO¹

RESUMO

A leprose dos citros, doença causada pelo CiLV-C (Citrus leprosis virus, cytoplasmic type), e transmitida por ácaros *Brevipalpus* spp., compromete o orçamento citrícola em milhões de dólares no controle de seu vetor. Ao adquirir o CiLV-C, o ácaro torna-se virulífero por toda sua vida, elevando as possibilidades de surtos da doença. A presença do ácaro não resulta necessariamente no aumento da doença, pois eles podem estar avirulíferos (sem o vírus). O desenvolvimento de um método molecular confiável e sensível para a diagnose da leprose, com base no genoma do CiLV-C, trouxe a perspectiva de realizar a detecção do vírus no vetor, antes mesmo do aparecimento dos sintomas nas plantas no campo. Foi possível identificar a presença do vírus em amostras de laboratório contendo quantidades diferentes de ácaros, sendo padronizado o número médio de dez ácaros para resultados confiáveis. Embora alguns métodos ainda necessitem de aprimoramento, principalmente para as amostras vindas do campo, esses dados sugerem que a detecção do CiLV-C em populações de *Brevipalpus* spp. pode contribuir para um manejo racional da leprose nos pomares, com implicações importantes na redução do ônus econômico e ambiental.

Termos de indexação: citros, *Brevipalpus* spp., diagnóstico.

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

² Bolsista PD-FAPESP (nº 04/11854-1). E-mail: valdenice@centrodecitricultura.br

³ Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, Cruz das Almas (BA).

SUMMARY

DETECTION AND MONITORING OF *CITRUS LEPROSIS VIRUS* IN THE MITE VECTOR

Citrus leprosis, disease caused by CiLV-C (Citrus leprosis virus, cytoplasmic type) and transmitted by false spider mites of the *Brevipalpus* genus, is responsible for several million dollars spent every year for the chemical control of the vector. Once the mites acquire CiLV-C, they become viruliferous for their whole life, increasing their chances of transmitting the disease. On the other hand, the presence of the mites does not result necessarily in the increase incidence of the disease, since they can be non-viruliferous (without the virus). The development of a sensitive molecular method for the diagnosis of leprosis based on the CiLV-C genome enabled the perspective of detecting and monitoring viruliferous mite populations, before the appearance of the symptoms in the field. In collaboration with citrus producers, preliminary studies demonstrated that this method presents a potential tool for the control and management of leprosis, with important implications on the reduction of economical and environmental costs.

Index terms: citrus, *Brevipalpus* spp., diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

A leprose, doença causada pelo vírus da leprose dos citros, tipo citoplasmático (Citrus leprosis virus, cytoplasmic type - CiLV-C), e transmitida pelo ácaro tenuipalpídeo *Brevipalpus phoenicis* Geijskes, é considerada uma das doenças virais de maior importância nos pomares brasileiros (MÜLLER et al., 2005). Dependendo do grau de infestação e da suscetibilidade da variedade, pode ocorrer grande prejuízo da produção com a redução da vida útil da planta, devido à queda de folhas, seca de ramos e depreciação dos frutos.

O manejo da doença é feito preventivamente pelo controle químico do vetor, com gastos em acaricidas estimados em 80 milhões de dólares/ano, representando um dos maiores custos entre os tratamentos fitossanitários em

pomares cítricos brasileiros (NEVES et al., 2004). Nos últimos anos, a importância da leprose tem aumentado no mundo, principalmente pela constatação de focos da doença em outros países da América do Sul e Central (BASTIANEL et al., 2006).

Sabe-se que apenas a presença do vetor nos pomares não acarreta prejuízos, mas, sim, a disponibilidade de fontes de inóculo (CiLV-C). Condições ambientais favoráveis, portanto, como a utilização de variedades altamente suscetíveis e o longo período de latência, entre 20 e 60 dias para o aparecimento dos primeiros sintomas, podem levar à ocorrência de surtos da doença no campo e, conseqüentemente, a detecção do patógeno quando o controle já está bastante difícil (CHIAVEGATO & SALIBE, 1984).

Alguns estudos sugerem que o ácaro não se movimenta nos pomares de forma tão rápida quanto a maioria dos vetores de doenças em plantas, possivelmente por sua anatomia plana e pelo comportamento de se esconder em frestas ou saliências, como nas lesões de verrugose em frutos (ALVES, 2004). Assim, embora a dispersão do ácaro da leprose possa ser limitada em um pomar, em longo prazo, o número de ácaros que se dispersam pode ser suficiente para formar focos significativos de infestação, sendo esse um fator a considerar na epidemiologia da doença no campo (ALVES, 2004).

Recentemente, estudando o padrão espacial da doença, BASSANEZI & LARANJEIRA (2007), verificaram que a correlação espacial entre plantas infestadas por ácaros e plantas com sintomas é muito baixa. Segundo esses autores, nos pomares estudados, as plantas sintomáticas apresentaram um padrão agregado, enquanto as infestadas com ácaros, não. A ausência de sintomas nas plantas infestadas poderia ser explicada pela presença de populações avirulíferas de *B. phoenicis*.

Acredita-se que o monitoramento e a amostragem do ácaro são fundamentais para determinar quando e onde deverá ser feito o controle. Nesse sentido, a predição de populações do ácaro avirulíferas e virulíferas, juntamente com dados da distribuição espacial de plantas com sintomas de leprose, seriam de grande auxílio para o entendimento da epidemiologia da doença e o conseqüente aprimoramento de estratégias de manejo com menor impacto ao meio ambiente.

A possibilidade de monitorar populações de ácaros tornou-se real a partir do desenvolvimento de um teste molecular sensível para a detecção do CiLV-C (LOCALI et al., 2003). No presente trabalho, utilizando populações de ácaros mantidas sob condições controladas e amostras de campo, apresentaram-se os primeiros resultados para a validação desse teste na detecção de ácaros virulíferos e as expectativas de aplicação desse método para auxiliar o manejo da doença em campo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o potencial do método desenvolvido para detectar a presença do vírus da leprose (CiLV-C) em *B. phoenicis*, utilizaram-se amostras de duas populações de ácaros avirulíferas e virulíferas, mantidas sobre frutos de laranja doce variedade Pêra [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], na Clínica Entomológica de Citros do Centro APTA Citros 'Sylvio Moreira'. Obtiveram-se as amostras virulíferas a partir da permanência de ácaros em lesões foliares de leprose, por 72 horas, para que, por meio da alimentação, houvesse a aquisição do CiLV-C.

Adicionalmente, realizaram-se análises em, aproximadamente, 120 amostras de ácaros provenientes de pomares de três localidades citrícolas paulistas: Casa Branca, Itapetininga e Brotas. Coletaram-se tais amostras pelos produtores, em frutos, aleatoriamente nos pomares, sem nosso conhecimento prévio da presença ou não do inóculo.

Para a validação do método, investigou-se o número de ácaros necessário para a detecção do CiLV-C. Após permanecerem por 72 horas nas fontes de inóculo, retiraram-se os ácaros de frutos e folhas, com o auxílio de pincéis de poucos pêlos, e colocados em microtubos de 1,5 mL, formando pools com três repetições de dez diferentes quantidades de ácaros: 400, 200, 50, 20, 10, 5, 4, 3, 2 e 1 indivíduos. Para as amostras de frutos de campo, enviadas pelos produtores, coletaram-se os ácaros sob lupa, acondicionando-os diretamente em tubos. Nesse caso, o número de ácaros por amostra variou de 1 a 15.

A extração de RNA total baseou-se no protocolo de GIBBS & MACKENZIE (1997), eliminando-se a fase inicial de lavagem com tampão (10

mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 2 M NaCl; 0,05% BSA). O diagnóstico para presença do vírus no ácaro baseou-se na transcrição reversa seguida de PCR (RT-PCR), utilizando-se iniciadores específicos desenvolvidos por LOCALI et al. (2003), para detecção do vírus da leprose (CiLV-C). Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídeo (0,5 ng/ml). Consideraram-se positivas para o CiLV-C as amostras que amplificaram o fragmento esperado contendo aproximadamente 339 pb.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste molecular foi eficiente na identificação de amostras de ácaros avirulíferas e virulíferas provenientes das populações mantidas em laboratório. Após adequação do método de extração de RNA total, foi possível obter resultados positivos para amostras de ácaros virulíferos em todas as quantidades de ácaros avaliadas. Nas amostras contendo de um a cinco ácaros, porém, o padrão de amplificação nem sempre foi consistente, apresentando ora resultados positivos, ora negativos. Sendo assim, determinou-se que nas amostras a partir de 10 ácaros os resultados são satisfatórios e confiáveis. Essa redução no número de indivíduos para diagnóstico da presença do vírus é bastante significativa, principalmente quando se testam amostras de campo. Em trabalhos de monitoramento, considerando as constantes pulverizações, o número pequeno de ácaros pode ser um fator limitante dessa amostragem.

Durante a avaliação, observou-se que o sucesso da detecção do CiLV-C mediante a PCR está relacionado à concentração do vírus no ácaro vetor, visto que se deve utilizar um número mínimo de ácaro para que se tenha segurança nos resultados. Não há, porém, uma relação direta entre intensidade do produto de amplificação visualizado em gel de agarose e número de indivíduos por amostra, como se pode constatar nos tratamentos com 10, 20 e 50 indivíduos (Figura 1).

Provavelmente, nem todo ácaro se torna infectivo, assim como a concentração do vírus não ocorre de maneira uniforme na população, mesmo que alimentados em uma única fonte de inóculo. Faz-se necessário, portanto, um aprimoramento da técnica de diagnóstico para que a detecção do vírus

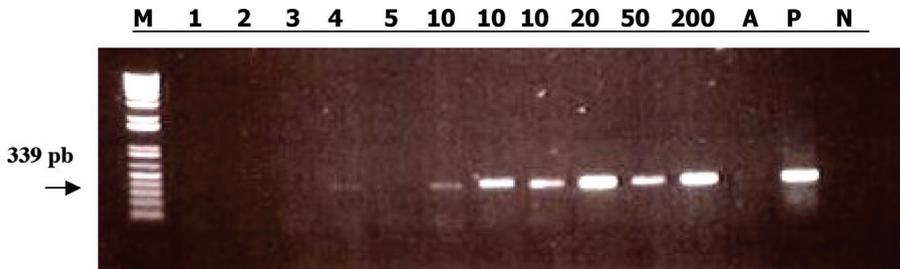


Figura 1. Padrão eletroforético das reações de amplificação de região gênica específica para confirmação da presença de CiLV-C em ácaros mantidos por 72 horas em fonte de inóculo. **M.** Marcador 1 kb DNA LADDER (Invitrogen); **1 a 200.** Correspondem à quantidade de ácaros em cada amostra; **A, P e N.** Controles usando água, ácaros sabidamente infectados e não infectados respectivamente.

possa ser obtida em amostras com títulos menores, assim como quantificadas. Neste sentido, o estabelecimento de um protocolo para a detecção e quantificação do CiLV-C em amostras vegetais e no vetor, com base no uso da PCR em tempo real (RT-qPCR) tem sido trabalhado (NICOLINI et al., 2007).

Neste trabalho, as amostras de ácaros coletadas de frutos provenientes de campo não apresentaram resultados satisfatórios, ou seja, nem sempre foi possível identificar populações virulíferas, mesmo quando se coletavam mais de 10 ácaros de frutos sintomáticos.

Sabe-se que, de um *pool* de ácaros coletados de um mesmo fruto, há possibilidade de alguns indivíduos estarem virulíferos, enquanto outros, não, gerando os resultados inconsistentes durante o processo de amplificação. Outro aspecto relevante, portanto, a mencionar é que, embora os sintomas sejam visualizados em diferentes partes da planta, as partículas virais estão restritas às lesões. Assim, em não se tratando de uma doença viral sistêmica, a presença do CiLV-C nos ácaros coletados em campo depende de eles terem se alimentado precisamente em locais com lesões. ALVES (2004) sugere que a dispersão do ácaro em campo não ocorre de maneira rápida, podendo, inclusive, ser limitada a uma dada área citrícola. Nesse sentido, a aparente inconsistência nos resultados de campo não surpreende, visto tratar-se de

amostras provenientes de grandes pomares, cuja dispersão do ácaro pode estar ocorrendo de maneira lenta e aleatória, independentemente da presença de inóculo de CiLV-C.

Este trabalho valida o teste molecular para a detecção do CiLV-C em populações de ácaros mantidos sob condições controladas e, mesmo utilizando um número mínimo de indivíduos, a técnica mostrou-se muito eficiente. Entretanto, para que o monitoramento de populações de ácaros em campo se torne uma ferramenta adicional, seja factível e se torne eficiente para o manejo da leprose, faz-se necessário aperfeiçoar a coleta e a amostragem de ácaros nos pomares. Nesse sentido, estão em andamento trabalhos voltados para tal enfoque em parceria com produtores, visando à detecção de ácaros virulíferos em campo antes mesmo do aparecimento de sintomas nas plantas. Com isso, pretende-se entender a epidemiologia da leprose e tentar, a médio e a longo prazo, propor novas estratégias de manejo da doença que tenham menor impacto econômico e ambiental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E.B. **Dinâmica da resistência de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) ao acaricida dicofol.** 79p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, Piracicaba., 2004.
- BASSANEZI, R.B. & LARANJEIRA, F.F. Spatial patterns of leprosis and its mite vector in commercial citrus groves in Brazil. **Plant Pathology**, Bath, UK, v.56, n.1, p.97-106, 2007.
- BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E.W. & MACHADO, M.A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.32, p.211-220, 2006.
- CHIAVEGATO, L.G. & SALIBE, A.A. Transmissibility of leprosis symptoms by *Brevipalpus phoenicis* to young citrus plants under laboratory conditions. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9., Riverside. 1984. **Proceedings ...** Riverside: International Organization of Citrus Virologists, p.218-221, 1984.
- GIBBS, A. & MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal Virology Methods**, Amsterdam, v.63, p.9-16, 1997.

- LOCALI, E.C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI, R.; KITAJIMA, E.W. & MACHADO, M.A. Development of a molecular tool for the diagnosis of leprosis, a major threat to the citrus production in the Americas. **Plant Disease**, St. Paul, v.87, n.11, p.1317-1321, 2003.
- MÜLLER, G.W.; TARGON, M.L.N.P.; CARVALHO, S.A.; SOUZA, A.A. & RODRIGUES, J.C.V. Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: MATTOS JR., D.; DE NEGRI, J.D.; PIO, R.M. & POMPEU JR., J. (Ed.). **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico e Fundag, 2005. p. 569.
- 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.
- NICOLINI, F.; BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; SCHONS, J.; CARLOS E.F.; LOCALI, E.C.; NOVELLI, V.M.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; SEGATTI, N. & MACHADO, M.A. Detecção e quantificação do vírus da leprose dos citros por PCR quantitativo em tempo real. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 10, 2007. (Supl.).