

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DOS CITROS
POR *Brevipalpus phoenicis* (GEIJSKES, 1939) (ACARI :
TENUIPALPIDAE) PARA PLANTAS ASSOCIADAS A
POMARES CÍTRICOS**

Maria Andréia Nunes

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Dezembro de 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DOS CITROS
POR *Brevipalpus phoenicis* (GEIJSKES, 1939) (ACARI :
TENUIPALPIDAE) PARA PLANTAS ASSOCIADAS A
POMARES CÍTRICOS**

Maria Andréia Nunes

Orientador: Prof. Dr. Carlos Amadeu Leite de Oliveira

Co-Orientadora: Juliana de Freitas-Astúa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Entomologia Agrícola).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Dezembro de 2007

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Maria Andréia Nunes – nasceu no dia 20 de janeiro de 1975, em Americana, Estado de São Paulo. Realizou seu Ensino Fundamental em instituição pública e, posteriormente, concluiu seu Ensino Médio em 1995, possuindo habilitação plena em Processamento de Dados. Obteve licenciatura plena em Ciências Biológicas no ano de 2000, na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de São José do Rio Preto. Neste período, foi integrante do PET (Programa Especial de Treinamento), auxiliando na organização e assessorando em vários eventos científicos e acadêmicos. Iniciou seus estudos em acarologia, colaborando no projeto BIOTA-FAPESP. De setembro de 2001 a abril de 2002, ministrou aulas no Ensino Fundamental e Médio, nas disciplinas de Ciências e Biologia, na rede pública de ensino em Americana e Jaboticabal. cursou mestrado entre março de 2002 e fevereiro de 2004 na UNESP, Câmpus de Jaboticabal, e doutorado na mesma instituição entre março de 2004 e dezembro de 2007, onde foi diretora da Associação de Pós-Graduandos (APG) e representante discente na comissão permanente de ensino da referida instituição de março de 2005 a fevereiro de 2006, além de outras atividades que possibilitaram crescimento pessoal e aprendizado intelectual.

Dedico....

...A Deus, tudo que faço, é resultado da tua dádiva maior, a vida.

...A minha família:

meus queridos pais Sebastião e Aparecida, sei que seu amor é incondicional,

meus irmãos e conselheiros: Devair, Dercivam e Delcídio e suas escolhidas,

meus pequenos incentivos e sobrinhos Alex, Natanael, Amanda e Maristela,

devo muito a todos ...

Ofereço...

...Aos meus amigos, que compartilharam muito mais que as alegrias e aliviaram meus fardos...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Amadeu Leite de Oliveira, cuja ética, experiência e paciência me fazem orgulhar de tê-lo como mestre.

À Dra. Juliana Freitas-Ástúa (Embrapa/APTA Citros Sylvio Moreira-IAC), que co-orientou esta pesquisa, sua incansável busca por respostas me incentivaram.

Ao Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima (Esalq/USP), pela parceria e orientação nos procedimentos em microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de bolsa de estudo para a realização deste trabalho, e ao Fundo de Defesa da Citricultura – FUNDECITRUS, pelo apoio financeiro de parte dos custos necessários para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade e do setor Horto Florestal da FCAV/UNESP, em especial à Raquel M. de Assis, Maria Isabel Vitale, Natalina D. Curci, Reinaldo A. Longo, Wanderley P. Brasil e Luís Ligeiro, pela amizade e pronto atendimento.

Em especial à Mariangela Alves pela amizade de longa data, apoio incondicional e pelas preciosas sugestões, aos colegas e amigos, Ana Maria G. Thuler, Márcio L. de Oliveira, Renata A. Luizon, Fernando C. Pattaro, Marcos Z. da Silva, Nilson F. Pólo, Marcelo G. Ruiz, Jair S. S. Pinto, Márcio B. V. Dias, Fernando A. Vianna e outros tantos, que auxiliaram de alguma forma na execução deste trabalho e possibilitaram um crescimento intelectual e pessoal.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, agradeço.

SUMÁRIO

	Página
Lista de figuras.....	vi
Lista de tabelas.....	viii
RESUMO.....	ix
SUMARY.....	x
I INTRODUÇÃO.....	1
II REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O impacto da leprose no mercado citrícola brasileiro.....	3
2.2 Viroses transmitidas por ácaros <i>Brevipalpus</i> (VTBs).....	3
2.3 Leprose dos citros.....	5
2.4 Aspectos taxonômicos, morfológicos e bioecológicos de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	8
2.5 Características do Citrus leprosis virus (CiLV).....	10
2.6 Estudos de transmissibilidade do vírus da leprose.....	12
2.7 Plantas hospedeiras de <i>Brevipalpus phoenicis</i> associadas a quebra- ventos, cercas-vivas e plantas infestantes de pomares cítricos.....	13
III MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Criações de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	17
3.2 Espécies vegetais.....	17
3.3 Transmissibilidade de leprose para plantas hospedeiras alternativas em casa-de-vegetação.....	18
3.4 Métodos de análise.....	19
3.4.1 Microscopia eletrônica.....	19
3.4.2 Transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase (RT- PCR).....	20
3.4.2.1 Extração do RNA total.....	20
3.4.2.2 Síntese do cDNA e RT-PCR.....	21
3.4.2.3 Clonagem dos produtos de PCR.....	21
3.4.2.4 Seqüenciamento e estudo de homologia de seqüências...	23
3.5 Transmissibilidade de leprose para plantas hospedeiras alternativas em campo.....	24
3.5.1 Plano experimental.....	24
3.5.2 Infestações do <i>Brevipalpus phoenicis</i>	25
3.5.3 Avaliações.....	27
3.5.3.1 Eficiência do método de infestação do <i>Brevipalpus</i> <i>phoenicis</i>	27
3.5.3.2 Dispersão de ácaros.....	27
3.5.3.3 Distribuição temporal de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	27
3.5.3.4 Incidência e severidade da leprose.....	28
3.5.3.5 Análise estatística dos dados.....	28
IV RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Transmissibilidade de leprose para plantas hospedeiras alternativas em casa-de-vegetação.....	29

SUMÁRIO (continuação)

	Página
4.1.1 Análise de sintomas.....	30
4.1.2 RT-PCR.....	32
4.1.3 Análise de seqüenciamento dos “amplicons”.....	33
4.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão.....	33
4.2 Transmissibilidade da leprose para plantas hospedeiras alternativas em campo.....	38
4.2.1 Eficiência do método de infestação de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	38
4.2.2 Dispersão de ácaros.....	39
4.2.3 Distribuição temporal do <i>Brevipalpus phoenicis</i>	41
4.2.4 Incidência de leprose nas plantas de laranja.....	43
4.2.4.1 Incidência de leprose nas plantas de laranja diretamente infestadas (plantas centrais).....	43
4.2.4.2 Incidência de leprose nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas diretamente infestadas.....	44
4.2.5 Severidade de leprose.....	48
4.2.5.1 Severidade de leprose nas plantas de laranja diretamente infestadas.....	48
4.2.5.2 Severidade de leprose nas plantas de laranja não infestadas diretamente.....	49
IV CONCLUSÕES.....	53
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

N ^o	Página
1	Vista de uma parcela experimental: tratamento: plantas de laranja (Pêra) (l) no centro da parcela e de grevilea (g) lateralmente (glg)..... 25
2	Placa de Petri contendo discos de folha de laranja, sobre algodão umedecido, infestadas por <i>Brevipalpus phoenicis</i> 26
3	Afixação de discos foliares infestados com ácaros nas folhas das plantas..... 26
4	a) Lesões em folhas de diversas espécies vegetais infestadas com ácaros <i>Brevipalpus phoenicis</i> infectados com vírus da leprose: a) <i>Bixa orellana</i> (urucum); b) <i>Commelina benghalensis</i> (trapoeraba); c) <i>Citrus sinensis</i> (laranja var. Pêra); d) <i>Grevilea robusta</i> (grevilea); e) <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (hibisco); f) <i>Malvaviscus arboreus</i> (malvavisco)..... 31
5	Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de RT-PCR utilizando <i>primers</i> específicos da região do gene que codifica a proteína de movimento de CiLV, extensão 1-kb Ladder (Invitrogen). + = plantas infectadas. - = controles negativos. Cb = <i>Commelina benghalensis</i> ; Cc = <i>Citrus sinensis</i> var. Pêra; Gr = <i>Grevilea robusta</i> ; Bo = <i>Bixa orellana</i> ; Ma = <i>Malvaviscus arboreus</i> 32
6	Eletromicrografias, obtidas em microscópio eletrônico de transmissão de cortes de tecidos foliares infectados pelo vírus da leprose dos citros (CiLV-C). a) Vista transversal e longitudinal do vírus em <i>Citrus sinensis</i>); Corte transversal em: b) <i>Commelina benghalensis</i> ; c) <i>Malvaviscus arboreus</i> ; d) <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> 34
7	Eletromicrografia obtida em microscópio eletrônico de transmissão, de corte mediano do corpo de <i>Brevipalpus phoenicis</i> (foto de Elliot Watanabe Kitajima)..... 35
8	Porcentagens médias de plantas de laranja com sintomas de leprose nos blocos (bl1, bl2, bl3, bl4) e média dos blocos, independentemente dos tratamentos, 30 dias após a infestação..... 39
9	Número médio de ácaros <i>Brevipalpus phoenicis</i> transformado em $\arcsen(x + 0,5)^{1/2}$ plantas centrais e laterais em função do hospedeiro, avaliada 90 dias após a infestação, (g = grevilea, l = laranja, s = sansão-do-campo, m = malvavisco), médias com as mesmas letras não diferem estatisticamente..... 40

LISTA DE FIGURAS (continuação)

N ^o .	Página
10	42
<p>Número médio de ácaros <i>Brevipalpus phoenicis</i> transformados em arc-sen $(x + 0,5)^{1/2}$ nos diversos tratamentos, avaliado 90 dias após a infestação em 15cm de ramo de 8 plantas (glg=grevílea-laranja-grevílea; lll=laranja-laranja-laranja; mlm=malvavisco-laranja-malvavisco; sls=sansão-do-campo-laranja-sansão-do-campo; lgl=laranja-grevílea-laranja; lml=laranja-malvavisco-laranja; lsl=laranja-sansão-do-campo-laranja). Médias com as mesmas letras não diferem estatisticamente.....</p>	
11	43
<p>Número médio de ácaros <i>Brevipalpus phoenicis</i> transformados em arc-sen $(x + 0,5)^{1/2}$ nos diversos tratamentos, avaliado 180 dias após a infestação em 15cm de ramo de 8 plantas (glg=grevílea-laranja-grevílea; lll=laranja-laranja-laranja; mlm=malvavisco-laranja-malvavisco; sls=sansão-do-campo-laranja-sansão-do-campo; lgl=laranja-grevílea-laranja; lml=laranja-malvavisco-laranja, lsl=laranja-sansão-do-campo-laranja). Médias com as mesmas letras não diferem estatisticamente.....</p>	
12	44
<p>Porcentagem de plantas de laranjas infestadas com ácaros <i>Brevipalpus phoenicis</i> virulíferos com sintomas de leprose nos tratamentos lll=laranja-laranja-laranja; glg=grevílea-laranja-grevílea; mlm=malvavisco-laranja-malvavisco; sls=sansão-do-campo-laranja-sansão-do-campo.....</p>	
13	46
<p>Incidência de leprose (%) nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas de grevílea (lgl), laranja (lll), malvavisco (lml) e sansão-do-campo (lsl), 90 e 180 dias após serem infestadas artificialmente com <i>Brevipalpus phoenicis</i>.....</p>	
14	48
<p>Relação entre a incidência de plantas de laranja com sintomas e o número de <i>Brevipalpus phoenicis</i>.....</p>	
15	49
<p>Severidade de leprose nas plantas de laranja infestadas com ácaros <i>Brevipalpus phoenicis</i> virulíferos, tendo, lateralmente, plantas de grevílea (glg), laranja (lll), malvavisco (mlm) e sansão-de-campo (sls).....</p>	
16	50
<p>Severidade de leprose nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas de grevílea (lgl), laranja (lll), malvavisco (lml) e sansão-do-campo (lsl), 90 dias após serem infestadas artificialmente com <i>Brevipalpus phoenicis</i> virulíferos.....</p>	
17	51
<p>Severidade de leprose nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas de grevílea (lgl), laranja (lll), malvavisco (lml) e sansão-do-campo (lsl) 180 dias após serem infestadas artificialmente com <i>Brevipalpus phoenicis</i> virulíferos.....</p>	

LISTA DE TABELAS

		Páginas
1	Plantas infestantes de ocorrência no Brasil e hospedeiras de <i>Brevipalpus phoenicis</i>	14
2	Escala visual de notas para avaliação da severidade de leprose em plantas de laranja.....	28
3	Indicativo da presença de CiLV-C em várias espécies de plantas hospedeiras por meio de diferentes técnicas de diagnose.....	29
4	Similaridade entre seqüências do CiLV-C das plantas-teste e daquelas disponíveis no GenBank.....	33
5	Incidência de leprose nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas de grevilea (Igl), laranja (III), malvavisco (ImI) e sansão-do-campo (IsI), 90 dias após serem infestadas artificialmente com <i>Brevipalpus phoenicis</i> virulíferos.....	46
6	Incidência de leprose nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas de grevilea (Igl), laranja (II), malvavisco (ImI) e sansão-do-campo (IsI), 180 dias após serem infestadas artificialmente com <i>Brevipalpus phoenicis</i> virulíferos.....	46

TRANSMISSÃO DO VÍRUS DA LEPROSE DOS CITROS POR *Brevipalpus phoenicis* (GEIJSKES, 1939) (ACARI : TENUIPALPIDAE) PARA PLANTAS ASSOCIADAS A POMARES CÍTRICOS.

RESUMO: Este trabalho teve como objetivo investigar a possibilidade de plantas utilizadas como cercas-vivas e quebra-ventos, bem como plantas invasoras comuns em pomares cítricos, hospedarem o Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) e servirem de inóculo para os citros. Em casa-de-vegetação, ácaros provenientes de uma criação-estoque sobre frutos de laranja Pêra, com sintomas de leprose, foram transferidos para folhas isoladas por barreira adesiva de: hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.), malvaisco (*Malvaviscus arboreus* Cav.), grevílea (*Grevilea robusta* A. Cunn.), urucum (*Bixa orellana* L.), trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.) e laranja [*Citrus sinensis* (L.) (Osbeck)]. Após 90 dias da infestação, os ácaros descendentes foram transferidos para mudas de laranja “Natal”. Amostras de tecidos das plantas testes se mostraram positivos para todas as plantas inoculadas com ácaros virulíferos por análise de RT-PCR utilizando-se de “primers” específicos para detecção do CiLV-C e foram verificadas a presença de partículas virais em hibisco, laranja, malvaisco, e trapoeraba em análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Em campo, laranja, malvaisco, grevílea e sansão-do-campo foram plantados próximos a plantas-teste de laranja e infestados com ácaros virulíferos. Essas espécies foram avaliadas quanto à presença de ácaros, à incidência e à severidade da doença. Foi possível observar que a incidência e a severidade da leprose foram maiores nas plantas de laranja que estavam próximas às laranjeiras infestadas, seguidas daquelas próximas a malvaisco e sansão-do-campo, que diferiram estatisticamente de grevílea. Estes resultados indicam que as plantas analisadas podem ser importantes na epidemiologia da doença.

Palavras-chave: cercas-vivas, CiLV-C, quebra-ventos e plantas infestantes.

**TRANSMISSION OF CITRUS LEPROSIS VIRUS BY *Brevipalpus phoenicis*
(GEIJSKES, 1939) TO PLANTS ASSOCIATED WITH CITRUS GROVES**

SUMMARY: The objective of this work was to investigate the possibility that hedgerows, windbreaks, and weeds normally found in citrus orchards could host Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C), serving as its source of inoculum. In greenhouse, mites reared onto sweet orange fruits var. "Pêra" symptomatic for leprosis were transferred to leaves, isolated by adhesive barrier, of *Hibiscus rosa-sinensis*, *Malvaviscus arboreus*, *Grevilea robusta*, *Bixa orellana*, *Commelina benghalensis* and *Citrus sinensis*. After 90 days of infestation, the descendant mites were transferred to Natal sweet orange plants to verify the transferability of the virus back to citrus. Nonviruliferous mites, which had no feed access to diseased tissue, were used as control. Localized lesions (chlorotic or necrotic spots, ringspots) developed in almost all tested plants. Tissue samples of plants infested with viruliferous and non-viruliferous mites were submitted to RT-PCR with specific primers to CiLV-C. Transmission electron microscopy analyses detected the presence of viral inclusions in *C. benghalensis*, *H. rosa-sinensis*, *M. arboreus*, and *C. sinensis*. In experimental groves, *C. sinensis*, *G. robusta*, *M. arboreus* and *Mimosa caesalpinaefolia* were planted and infested with viruliferous mites around citrus plants. There was a clear variation in leprosis incidence and severity observed in sweet orange plants depending on the alternative host cultivated beside them. The higher intensity of the disease was observed in sweet orange plants that were close to *C. sinensis*, followed by those close to *M. arboreus* and *Mimosa caesalpinaefolia*. The intensity of leprosis in sweet oranges planted near *G. robusta* was significantly lower than in those cultivated close to the other hosts. These results suggest that the alternative hosts tested can play a role in the epidemiology of the disease, serving as sources of inoculum of the virus.

Keywords: hedgerows, CiLV-C, windbreaks and weeds.

I INTRODUÇÃO

A leprose dos citros é uma das doenças mais importantes na cultura da laranja doce no Brasil, cujos custos para seu controle chegam a US\$ 75.000.000 por ano (BASSANEZI et al., 2002). A doença acarreta desde a depreciação do fruto até queda prematura das folhas e frutos, podendo reduzir a vida útil da planta. Os sintomas da leprose são localizados e incluem descamação intensa nos ramos, manchas anelares cloróticas nas folhas e manchas circulares necróticas deprimidas na região central nos frutos (BITANCOURT, 1955a).

O agente causal da doença foi identificado por KITAJIMA et al. (1972), que observaram em cortes de folhas de laranja com sintomas de leprose em microscópio eletrônico de transmissão, partículas virais bastiformes com aproximadamente 40nm de diâmetro e com 100-120nm de comprimento no interior do núcleo. Mais tarde, KITAJIMA et al. (1974) verificaram partículas virais no lúmen do retículo endoplasmático, e viroplasmas densos no citoplasma, ficando identificado dois tipos de vírus da leprose dos citros distintos, o citoplasmático (CiLV-C) e o nuclear (CiLV-N) (RODRIGUES et al., 2003a).

A leprose possui registro na América do Sul (Argentina, Brasil, Bolívia, Colômbia, Paraguai, Uruguai e Venezuela) e mais recentemente nas Américas Central (Panamá, Costa Rica, Guatemala) e do Norte e (México). (ARAYA GONZÁLES, 2000; BASTIANEL et al., 2006; BITANCOURT, 1937; DOMINGUEZ et al., 2001; FAWCETT, 1936; EON et al., 2006, RODRIGUES, 1995; SPEGAZZINI, 1920; VERGANI, 1945). Entretanto, os primeiros relatos foram feitos no Estado da Flórida, nos EUA, no início do século 20 embora tenha desaparecido desde a década de 1930 (CHILDERS et al., 2003b).

A ocorrência da leprose está associada à presença de *Brevipalpus phoenicis* Geijskes, 1939 (Acari: Tenuipalpidae) que, ao se alimentar de células de tecido infectado, ingere partículas virais, e posteriormente infecta tecidos saudáveis ao se alimentar novamente. Entretanto não ocorre a transmissão transovariana do vírus, motivo pelo qual a dispersão do ácaro tem papel fundamental na evolução da doença nos pomares cítricos (CHIAVEGATO, 1996; RODRIGUES et al., 1997).

O ácaro é cosmopolita, sendo relatado em todos os continentes salvo as regiões Ártica e Antártica, e apresenta polifagia com registro de aproximadamente 456 hospedeiros, o que atesta seu alto grau de adaptação, tornando-o de difícil controle (CHILDERS et al, 2003a).

Cercas-vivas e quebra-ventos são recomendados em pomares cítricos para impedir o trânsito de pessoas e animais, e diminuir correntes de ar que acabam por atuar como agentes dispersores de ácaros (GRAVENA, 1991). Essas plantas, bem como as infestantes, foram alvos de recentes estudos que comprovam serem muitas delas hospedeiras do ácaro vetor da doença e indícios de serem hospedeiras também do CiLV-C (MAIA & OLIVEIRA, 2005), motivo pelo qual tornou-se crucial avaliar, por métodos seguros, a possibilidade desta infecção. Face ao exposto, este trabalho teve como objetivo comprovar se o vírus da leprose dos citros pode ser transmitido, através do processo de alimentação de ácaros *B. phoenicis*, para plantas não rutáceas comuns ao agrossistema citrícola como cercas-vivas, quebra-ventos e plantas invasoras, e destas para os citros em condições de casa-de-vegetação e de campo, bem como caracterizar os sintomas de leprose nessas plantas.

II REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O impacto da leprose no mercado citrícola brasileiro

A laranja surgiu à aproximadamente 2000 anos a.C. na região leste do continente asiático, onde atualmente encontra-se a Índia, China, Butão, Mianmar (ex-Birmânia) e Malásia. De lá teria sido levada à Europa, e durante a Idade Média, no processo de expansão e colonização, chegou às Américas (ABRECITRUS, 2007).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor de citros do mundo, abrangendo uma área de um milhão de hectares, sendo responsável por 25% de toda a produção mundial, o que corresponde em torno de 17 milhões de toneladas de frutos de laranjas, e atende cerca de 50% da demanda mundial de suco de laranja concentrado, o que corresponde, em termos de exportação, a cerca de US\$1 bilhão/ano (AGRIANUAL, 2006).

O maior parque citrícola do país está situado no Estado de São Paulo que representa 84% de toda a produção cítrica brasileira, distribuída em 322 municípios. A atividade econômica é essencial nesses municípios, pois o setor emprega diretamente cerca de 400 mil pessoas (BORGES & ALMEIDA, 2000).

Entretanto, a produção citrícola poderia ser muito maior se não fosse a ação de inúmeras pragas e doenças que acometem a cultura. Somente para o controle do ácaro da leprose, os custos chegam a variar de US\$ 60 a 75 milhões por ano, um impacto da ordem de 35% no total de insumos e 15% nos custos finais da produção. Desta forma, a melhoria no manejo dos ácaros e da doença pode contribuir decisivamente para a diminuição dos custos de produção e no valor dessa "commoditie" (BASSANEZI et al., 2002; RODRIGUES, 2000).

2.2 Viroses transmitidas por ácaros *Brevipalpus* (VTBs)

O conhecimento das viroses transmitidas por *Brevipalpus*, nesses últimos anos, aumentou consideravelmente, a ponto de KITAJIMA et al. (2003) terem listado 25 vírus associados a *Brevipalpus* sp. localizados no Brasil, entre elas:

Citrus leprosis virus (CiLV-C e -N) em citros, Ligustrum ringspot virus (LiRSV) em ligustre, Coffee ringspot virus (CoRSV) em café, Passion fruit green spot virus (PFGSV) em maracujá, Hibiscus green spot virus (HGSV) em hibisco, Malvavirus ringspot virus (MRSV) em malvaisco, Ivy green spot virus (GSV) em hera, Clerodendron chlorotic spot virus (CCSV) em clerodendro, Orchid fleck virus (OFV) em orquídeas e *Solanum violaeifolium* ringspot virus (SVRSV) em solanum.

Atualmente, conhecem-se 51 viroses transmitidas por *Brevipalpus* em plantas ornamentais e culturas diversas, sendo a maior parte delas, ou seja, 45, transmitidas por *B. phoenicis*, 4 por *B. obovatus* e duas por *B. californicus* (FERREIRA, 2005).

Algumas dessas viroses possuem mais de uma espécie-vetora pertencente ao gênero *Brevipalpus*, como a leprose dos citros, com relatos de transmissão por *B. phoenicis*, *B. obovatus* e *B. californicus*, sendo *B. phoenicis* o vetor com maior expressão e importância (CHILDERS et al., 2003a).

Com exceção do OFV em orquídeas, que tem distribuição mundial, os demais vírus são encontrados apenas nas Américas (KITAJIMA et al., 2003). Eles não tem ação sistêmica na planta hospedeira, induzindo o aparecimento de lesões localizadas características, o que torna o papel do vetor extremamente importante nestes patossistemas (KITAJIMA et al., 2003).

Geralmente as lesões localizadas são caracterizadas por manchas cloróticas em forma de anel em folhas verdes e coloração verde em folhas senescentes, amareladas. Apesar de os sintomas serem mais comuns em folhas e frutos, eles ocorrem em alguns casos em ramos na forma de necrose de tecido (FERREIRA, 2005).

Há dois padrões citopáticos induzidos pelos VTBs: o padrão nuclear, geralmente associado à membrana do invólucro nuclear ou retículo endoplasmático, e com viroplasma elétron transparente, e o padrão citoplasmático, que possui membrana e se encontra no lúmen do retículo endoplasmático e com um viroplasma elétron denso no citoplasma (KITAJIMA et al., 2003).

Em algumas hospedeiras, como hibisco, pode-se encontrar os tipos nuclear e/ou citoplasmático na mesma célula, mas nas demais viroses esta observação não é freqüente (Kitajima et al., 2003).

2.3 Leprose dos Citros

O primeiro registro da leprose ocorreu em 1907, por Fawcett, no distrito de Pinellas, Flórida, EUA, denominado de “scaly bark”. Em 1911, a doença alcançou o ápice naquele país, chegando a afetar 75% dos pomares de 7 cidades produtoras de citros da região central do estado da Florida, sendo denominada “nail-head rust”. Mais tarde, na década de 30, através de comparações fotográficas dos sintomas de “scaly bark” e “nail head rust”, com a “lepra explosiva” da Argentina e a leprose dos citros do Brasil, Fawcett e Knorr concluíram que se tratavam da mesma doença. Nos EUA, a doença foi sendo controlada e em meados dos anos 50 desapareceu, razão atribuída às condições climáticas adversas e rigorosos tratamentos culturais, os quais contaram com acentuadas aplicações de calda de enxofre que reduziu drasticamente a população do ácaro vetor, que segundo KNORR (1968), tratava-se de *B. californicus* (CHILDERS et al., 2003b).

Na América do Sul, os relatos da doença começaram a surgir na década de 20, com a denominação de “lepra explosiva”, que afetava plantas de laranja em Misiones, Argentina (SPEGAZZINI, 1920).

No Brasil, o primeiro relato é atribuído a BITANCOURT (1937) que a constatou no Estado de São Paulo na década de 30, denominando-a de leprose dos citros. O autor ressaltou a importância da doença em razão das condições climáticas favoráveis ao vetor e ao alto valor da produção de laranja.

Relatos da ocorrência da doença na Ásia e África não foram confirmados (MURAYAMA et al., 2000) e não há registros da doença na Europa, o que evidencia que a leprose encontra-se restrita às Américas.

Na América do Sul está presente na Argentina, nas províncias de Misiones e Corrientes, no Brasil, nos estados de Acre, Amazonas, Bahia, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe,

Tocantins, e Distrito Federal, existem relatos na Colômbia Paraguai, Uruguai, Bolívia e Venezuela (BASTIANEL et al., 2006a; BITANCOURT 1937, 1955a; FAWCETT, 1936; LEON et al., 2006; SPEGAZZINI, 1920; VERGANI, 1945). Na América Central existem registros no Panamá, Costa Rica, Guatemala, Honduras e mais recentemente e América do Norte, no México (ARAYA GONZÁLES, 2000; BASTIANEL et al., 2006a; DOMINGUEZ et al., 2001).

Apesar de estar distribuída em vários estados brasileiros, a doença está concentrada na região noroeste do Estado de São Paulo com ocorrência praticamente em todo o parque citrícola, onde o clima e a estiagem prolongada favorecem o vetor da doença (BASSANEZI et al., 2002).

A leprose é severa nas laranjas-doce [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], laranjas-azedas (*C. aurantium*) e pomelos (*C. paradisi*), a incidência é menor em outras espécies cítricas, como mandarins (*C. reshni* Tanaka, *C. deliciosa* Tenore, *C. reticulata*), híbridos como Tangor Murcott, são muito pouco suscetíveis, enquanto, lima da pérsia (*C. aurantifolia*), limões verdadeiros (*C. limon*), limas ácidas (*C. aurantifolia*), limas doces (*C. limettioides*, *C. medica*) são resistentes à doença (BASSANEZI et al., 2002; BASTIANEL et al., 2004; BASTIANEL et al., 2006b; BITANCOURT, 1955b; ROESSING & SALIBE, 1967; RODRIGUES, 1995).

O vírus não se torna sistêmico, ficando restrito a região de alimentação do ácaro. Os sintomas de leprose começam a surgir em torno de 7 dias da infestação com ácaros virulíferos. Nos ramos as lesões são cloróticas e gradativamente se tornam necróticas, levando à descamação e aspereza intensa. Nas folhas, ocorrem manchas circulares cloróticas de coloração verde-escura no centro e amarelada de 2-3 mm na periferia. Nos frutos, enquanto verdes, as lesões são também circulares cloróticas com região central verde escura, que com o amadurecimento do fruto tornam-se deprimidas escuras, irregulares e necróticas. Essas lesões podem surgir em frutos a partir de 4-5 cm de diâmetro (BITANCOURT, 1955a,b, c).

A leprose diminui a longevidade da planta, seca os ramos, causa queda prematura das folhas e frutos, acarretando grande prejuízo. O controle da doença é realizado, principalmente, através do combate químico ao ácaro vetor, razão

pela qual, muitos trabalhos, nesse sentido, têm sido realizados (NAKANO et al., 1987; OLIVEIRA et al., 1991). Recentemente tem-se dado ênfase ao controle biológico com utilização de ácaros predadores ou fungos, e a busca de plantas resistentes à doença (BASTIANEL et al., 2006b; SILVA, 2005).

A etiologia da doença, à princípio, foi muito questionada, sendo alguns fungos, como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Hormodendron* sp. e *Cladosporium herbarium* var. *citri*, sugeridos como seu agente causal (VERGANI, 1945). Quando se atentou para a associação onstante da leprose com infestações de *Brevipalpus*, sugeriu-se que as lesões poderiam ser resultado de toxinas liberadas pelo ácaro no processo alimentar (KNORR, 1968).

Nos EUA, a doença era relatada em associação à espécie *B. californicus* (KNORR, 1968), na Argentina e Venezuela com *B. obovatus* (VERGANI, 1945), e no Brasil à *B. phoenicis* (MUSUMECI & ROSSETTI, 1963).

Devido à associação freqüente à *Brevipalpus* sp. e pelas características dos sintomas, surgiu a hipótese de que a enfermidade poderia ser causada por um vírus transmitido pelo ácaro. Várias evidências reforçaram esta hipótese, uma delas foi a expansão de lesões a partir de fragmentos de tecidos lesionados enxertados em plantas sadias (KNORR, 1968; CHAGAS & ROSSETTI, 1980); fortes evidências ao microscópio eletrônico da presença de partículas virais em tecidos sintomáticos (KITAJIMA et al., 1972); extratos de lesões da leprose reproduziam lesões em plantas sadias, inoculadas mecanicamente (COLARICCIO et al., 1995); e a detecção molecular do vírus através da amplificação, por RT-PCR, de fragmentos de cDNA viral somente em plantas sintomáticas para leprose infectadas com ácaros virulíferos (LOCALI et al., 2003).

Atualmente, ações de controle, baseadas no manejo integrado de pragas (MIP), tentam minimizar os custos de produção e os impactos ambientais gerados pelo uso indiscriminado de agrotóxicos. As recomendações para manejo da doença no pomar incluem várias ações, sendo algumas direcionadas ao controle do vetor como monitoramento das populações de *B. phoenicis* no pomar, rotação de acaricidas com modos de ação distintos para atender ao manejo da resistência dos ácaros e utilização de produtos seletivos aos inimigos naturais; outras ações

procuram evitar a dispersão dos ácaro como, utilização de cercas-vivas e quebra-ventos, limpeza das caixas de coleta e colheita de todos os frutos inclusive os caídos no chão; e ações baseadas na diminuição dos focos da doença, como poda de ramos sintomáticos (GRAVENA, 1991; OLIVEIRA, 1986).

Outras questões relacionadas ao manejo ainda são controversas, como por exemplo, a presença de plantas infestantes no pomar. GRAVENA (1991) propõe a utilização de plantas herbáceas, para, entre outras razões, servir de refúgio de ácaros predadores. Todavia, ULIAN & OLIVEIRA (2001) alertam para o risco dessa prática ao ctros, devido a algumas destas plantas hospedarem *B. phoenicis*.

2.4 Aspectos taxonômicos, morfológicos e bioecológicos de *Brevipalpus phoenicis*

Denominado como ácaro-da-leprose no Brasil, ou internacionalmente como “false spider mite”, a espécie *B. phoenicis* pertence a classe Arachnida, sub-classe Acari, sub-ordem Prostigmata, superfamília Tetranychoida e família Tenuipalpidae, que reúne ácaros conhecidos como planos, em que estão descritos 600 espécies distribuídas em 3 gêneros, alguns deles com destacada importância econômica (HARAMOTO, 1969).

Apesar de muito semelhante às espécies *B. californicus* e *B. obovatus*, *B. phoenicis* pode ser distinguida das demais pela quetotaxia dorsal opistosomal na qual pode-se verificar um par de setas humerais, cinco pares de setas dorso-laterais e pela presença de dois solenídeos no tarso II, também denominados setas ômega (ω) (WELBORN et al., 2003). Os exemplares descritos por Geijskes em 1939 foram coletados a partir de *Phoenix* sp. (Palmaceae), dando assim origem ao seu nome (HARAMOTO, 1969).

A fêmea possui corpo oval, tamanho entre 0,29 mm a 0,31 mm, é maior que os machos, que têm corpo pouco mais afilado; ambos têm coloração alaranjada e escurecem com a idade, variam com o alimento e condições climáticas; na região do aparelho digestivo aparece uma zona de cor mais escurecida em forma da letra “H” no idiossoma (HARAMOTO, 1969).

Os ovos são elípticos, alaranjados e brilhantes, possuem tamanho de 0,10 a 0,11 mm de comprimento e 0,06 a 0,08 mm de largura, se aderem através de substância adesiva ao substrato e, conforme vão ficando mais velhos, tornam-se mais avermelhados (HARAMOTO, 1969; LAL, 1978). É possível identificar uma estrutura globular com 10 μm na região equatorial do ovo, relacionada, provavelmente, à respiração (RODRIGUES & MACHADO, 2000).

A reprodução de *B. phoenicis* ocorre predominantemente por partenogênese telítoca, isto é, produz somente fêmeas geneticamente similares à progenitora, as quais são haplóides com dois cromossomos não homólogos ($n=2$), sendo o único caso descrito na literatura em que um organismo nunca produz a fase diplóide nem quando ocorre a reprodução sexuada, que é rara, e se realiza com a participação de machos, que representam 1% da população (HELLE et al., 1980; PIJNACKER et al., 1980; 1981; WEEKS et al., 2001).

Na cópula o macho dobra o opistosoma em posição vertical e com o primeiro e segundo pares de pernas levanta o corpo da fêmea e se insere embaixo segurando-a de maneira que as genitais se encaixam (HARAMOTO, 1969).

A presença de bactéria endosimbionte feminilizante *Cardinium* sp. na população destes ácaros pode explicar a raridade do macho (CHIGIRA & MIURA, 2005; NOVELLI et al., 2005). Não obstante, WEEKS et al. (2001) admitem que a espécie seja constituída de machos que pela ação da bactéria são feminilizados e tidos como fêmeas.

O ciclo de vida, ovo-adulto, dentre outros fatores, varia com a temperatura, umidade e alimentação, tendo sido verificado que a 20°C dura em torno de 17 dias (HARAMOTO, 1969; LAL, 1978; CHIAVEGATO, 1986; TRINDADE & CHIAVEGATO, 1990; TRINDADE & CHIAVEGATO, 1994). O ciclo médio é de 25 dias em mamoeiro (*Carica papaya*) a 25°C (HARAMOTO 1969). CHIAVEGATO (1986) verificou que em citros o desenvolvimento de ovo à adulto foi de 19,2 dias a 25°C. Já as observações de KENNEDY et al., (1996) em folhas de chá (*Comellia sinensis*), à 26°C, o ciclo de vida do ácaro foi de 19 dias.

O ácaro possui quatro fases móveis, larva, protoninfa, deutoninfa e adulto e quatro imóveis, ovo, protocrisálida, deutocrisálida e telocisálida (HARAMOTO 1969).

RODRIGUES (2000) verificou um alto grau de polimorfismo entre populações de duas diferentes colônias pela amplificação de fragmentos de DNA por PCR, sugerindo que a habilidade para formar colônias em diferentes espécies de plantas está relacionada com a variabilidade genética.

Segundo OLIVEIRA (1986), em estudos realizados na região noroeste do Estado de São Paulo, o aumento populacional do ácaro inicia-se a partir dos meses de março-abril, período de diminuição das precipitações, tendo um pico populacional nos meses de setembro-outubro, diminuindo novamente com o aumento das precipitações em novembro-dezembro.

Nas plantas de laranja os ácaros preferem os frutos às folhas (OLIVEIRA, 1986), sendo mais propícios os que apresentam verrugose (ALBUQUERQUE et al., 1995; CHIAVEGATO & KHARFAN, 1993; MARTINELLI et al., 1976).

2.5 Características do Citrus leprosis vírus (CiLV)

Nas folhas, as partículas virais encontram-se freqüentemente no mesófilo e contidas no parênquima vascular (COLARICCIO et al., 1995).

O vírus da leprose encontra-se em processo de classificação, todavia possui algumas características de membros da família Rhabdoviridae, por ter aparência baciliforme, ser envelopado e apresentar efeitos citopáticos similares. Esse vírus está sempre associado à membrana nuclear ou presente no lúmen do retículo endoplasmático, medindo aproximadamente 40 nm de largura e 100-120 nm de comprimento (COLARICCIO et al., 1995; KITAJIMA et al., 1972).

Existem dois tipos distintos de vírus da leprose dos cítrus, o tipo citoplasmático (CiLV-C), é, mais comum, encontrado na América do Sul e Central, caracterizado pela presença de partículas baciliformes (50-55nm x 120-130 nm) providas de membrana envoltória, no lúmen do retículo endoplasmático e de viroplasma denso e vacuolado no citoplasma, e, o tipo nuclear (CiLV-N), mais raro, presente no Brasil e também ao Norte do Panamá, no qual as partículas em forma

de bastonetes nus (40-50 nm x 100-110 nm) ocorrem no núcleo e no citoplasma e apresenta um viroplasma elétron-transparente no núcleo. Os dois tipos acarretam sintomas praticamente idênticos, entretanto pode-se notar que no tipo citoplasmático as lesões são maiores, menos amareladas em forma de halos concêntricos de goma, já para o tipo nuclear, as lesões circulares são menores e possuem um ponto necrótico ao centro e mais amareladas que o citoplasmático (KITAJIMA et al., 2004).

Geralmente o CiLV-C afeta os cloroplastos, levando-os à hipertrofia do sistema lamelar (MARQUES et al., 2007). Os efeitos citopáticos (citoplasmático) têm sido encontrados em outras doenças associadas a ácaros do gênero *Brevipalpus* em plantas como orquídeas, macujazeiro, *Ligustrum*, *Hibiscus*, cafeeiro, hera, manacá, *Clerodendron* etc. (KITAJIMA et al., 2003).

A partir do século XXI, os estudos moleculares avançaram muito. Com base em extrações virais de lesões foliares de CiLV-C pôde-se verificar padrão eletroforético de duas bandas de alto peso molecular, não sendo raro que vírus de RNA de fita simples (ssRNA), quando em fase de replicação, adquiram conformação de fita dupla (dsRNA), indicando a fase de infecção viral na planta (COLARICCIO et al., 2000; LOCALI, 2002; RODRIGUES et al., 2000; VALVERDE et al., 1990).

O padrão eletroforético de dsRNA de CiLV indica a presença de duas moléculas, uma entre 8 e 10 Kb e outra entre 4 e 5 Kb, além de outras poucas moléculas de pequeno tamanho, possivelmente RNAs subgenômicas (COLARICCIO et al., 2000; LOCALI et al., 2003; RODRIGUES, 2000). O genoma do CiLV-C é bipartido, constituído de duas moléculas de ssRNA de sentido positivo, sendo uma delas de aproximadamente 9 Kb, compreendendo duas ORFs e a outra, de 5Kb com 4 ORFs (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006).

Atualmente, a diagnose da leprose pode ser realizada através de RT-PCR, sendo que as seqüências de “primers” mais utilizadas referem-se a regiões codificadoras da helicase (Hel) e proteína de movimento (MP), sendo esta última a mais eficiente para a detecção viral (LOCALI et al., 2003).

LOCALI-FABRIS et al. (2006) sugeriram que o CiLV-C deve ser posicionado como o membro-tipo de um gênero novo de fitovírus, denominado *Cilevírus*. Assim, apesar da semelhança morfológica e dos efeitos citopáticos produzidos nas células afetadas pelo CiLV-C, outras características o divergem dos rhabdovírus, de maneira que, segundo instruções taxonômicas do "International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)", os vírus classificados nessa família devem ter ssRNA com senso negativo e ser monopartido. Em contrapartida a essas características, o CiLV-C ssRNA possui senso positivo e o genoma é bipartido, o que claramente o exclui da família Rhabdoviridae (LOCALI-FABRIS et al., 2006; PASCON et al., 2006).

RODRIGUES et al. (1997) e KITAJIMA et al. (2006), em observações em microscopia eletrônica de transmissão de cortes ultrafinos de regiões medianas do corpo de *B. phoenicis* alimentados em laranjas com sintomas de leprose, verificaram partículas semelhantes às aquelas encontradas em lesões foliares da doença, fato que evidência a característica circulativa do vírus no ácaro.

2.6 Estudos de transmissibilidade do vírus da leprose

Os estudos de transmissibilidade do CiLV-C pelo acesso alimentar do ácaro auxiliam na comprovação da relação vetora do ácaro (MUSUMECI & ROSSETI, 1963).

Vários trabalhos mostram a eficiência do vetor, tendo sido evidenciado que após apenas dois dias de acesso alimentar os ácaros são capazes de adquirir o vírus. Todas as fases móveis do desenvolvimento do ácaro, isto é, fases larval, ninfal e adulta, podem transmitir a doença (CHAGAS et al., 1983; CHIAVEGATO, 1986).

Através da inoculação mecânica do CiLV-C, COLARICCIO et al. (1995) atestaram a transmissibilidade do vírus para algumas espécies herbáceas, dentre as quais *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* e *Gomphrena globosa*. Os autores utilizaram extrato de folhas de *C. sinensis* lesionadas pelo CiLV como fonte de inóculo, e sendo que a comprovação da transmissibilidade ocorreu pela análise das lesões utilizando-se microscópio eletrônico de transmissão. A tentativa

destes autores foi frustrada ao se induzir uma infecção sistêmica a fim de se obter inóculo suficiente para purificação e produção de anti-soro contra a leprose. No entanto, apesar das plantas testadas não serem integrantes do agrossistema citrícola, os resultados alertaram para a possibilidade de outras plantas não rutáceas fazerem parte da epidemiologia da leprose.

Em outros trabalhos, já havia sido constatado que o ácaro vetor coloniza plantas integrantes do agrossistema citrícola, tais como, plantas invasoras, quebra-ventos e cercas-vivas, dentre as quais: Hibisco (*Hibiscus* sp.), malvavisco (*Malvaviscus mollis*), grevílea (*Grevillea robusta*), sansão-do-campo (*Mimosa caesalpinaefolia*), urucum (*Bixa orellana*), picão preto (*Bidens pilosa*), trapoeraba (*Commelina benghalensis*), guanxuma (*Sida cordifolia*) e mentrasto (*Ageratum conyzoides*) (ULIAN & OLIVEIRA, 2002; MAIA & OLIVEIRA, 2004).

A transmissibilidade do vírus, por acesso alimentar do ácaro, foi conseguida com sucesso para *Solanum violaeifolium* e para feijão (*Phaseolus vulgaris*) (RODRIGUES et al, 2005, GROOT et al., 2006). Para plantas pertencentes ao agrossistema citrícola, MAIA & OLIVEIRA (2005, 2006) verificaram lesões de leprose em plantas de laranjadoce infestadas com ácaros provenientes de mentrasto, trapoeraba e urucum, anteriormente colonizadas com ácaros criados em frutos de citros com lesões de leprose. Posteriormente, em estudos semelhantes, NUNES (2004) constatou com grevílea (*G. robusta*) e, também, trapoeraba.

2.7 Plantas hospedeiras de *Brevipalpus phoenicis* associadas a quebra-ventos, cercas vivas e plantas infestantes de pomares cítricos

B. phoenicis é uma espécie cosmopolita e polífaga, com ocorrência relatada em 486 espécies de plantas, muitas delas de importância agrícola, distribuídas em todo o mundo (CHILDERS et al., 2003b).

Atualmente, são conhecidas 47 espécies herbáceas invasoras ou daninhas de ocorrência no Brasil que hospedam ácaros *B. phoenicis* (Tabela 1).

Segundo PITELLI & DURIGAN (1995), a presença das plantas espontâneas nos agrossistemas cítricos devem ser consideradas sobre dois aspectos, como nicho para ácaros predadores e como hospedeiras alternativas de populações passíveis de reinfestações dos pomares.

A. conyzoides, segundo GRAVENA (1991), quando semeada entre as ruas nos pomares cítricos, aumenta os índices de nitrogênio, fósforo e potássio do solo e mantém a temperatura e umidade ideal para ácaros predadores, bem como fornece pólen como alimento alternativo para os mesmos; entretanto, constatou-se que esta planta é hospedeira do *B. phoenicis* (ULIAN & OLIVEIRA, 2001).

Algumas espécies utilizadas como cercas-vivas e quebra-ventos no agrossistema citrícola comportam-se como muito favoráveis para o crescimento populacional de *B. phoenicis*, tais como urucum, hibisco, malvaisco, grevílea e poncirus, enquanto jambolão, sansão-do-campo, primavera, podem servir de hospedeiras, porém, menos favoráveis ao crescimento populacional. Em outras espécies, como *Pinus* sp e coroa-de-cristo, os ácaros não se estabelecem (ULIAN & OLIVEIRA, 2002; MAIA & OLIVEIRA, 2004).

Tabela 1. Plantas infestantes de ocorrência no Brasil hospedeiras de *Brevipalpus*.

Família	Espécie	Nome comum	Referência
Acanthaceae	<i>Thumbergia alata</i>	Olho-negro	NAGESHA CHANDRA & CHANNABASAVANNA, 1974
Amaranthaceae	<i>Alternanthera tenella</i>	Periquito	TRINDADE, 1990
	<i>Amaranthus deflexus</i>	Caruru	TRINDADE, 1990
	<i>A. viridis</i>	Caruru-verde	CHILDERS et al., 2003b
Apocynaceae	<i>Peschiera fuchsifolia</i>	Leitera	TRINDADE, 1990
Asclepiadaceae	<i>Calotropis procera</i>	Paininha-de-seda	CHILDERS et al., 2003b
Balsaminaceae	<i>Impatiens</i> sp.	Maria-sem-vergonha	CHILDERS et al., 2003b
Bignoniaceae	<i>Pyrostegia venusta</i>	Cipó-de-são-joão	CHILDERS et al., 2003b
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium album</i>	Ançarinha-brava	CHILDERS et al., 2003b
	<i>C. ambrosioides</i>	Erva-de-santa-maria	CHILDERS et al., 2003b
Commelinaceae	<i>Commelina bengalensis</i>	Trapoeraba	MAIA, 2002
Compositae	<i>Acanthospermum australe</i>	Carrapicho-carneiro	TRINDADE, 1990
	<i>Agerantum conyzoides</i>	Mentrasto	Ehara (1966) citado por OLIVEIRA, 1986)
	<i>Baccharis trimera</i>	Carqueja	CHILDERS et al., 2003b
	<i>Bidens alba</i>	Picão	CHILDERS et al., 2003b

Tabela 1 (continuação).

Família	Espécie	Nome comum	Referência
	<i>B. pilosa</i>	Picão-preto	HARAMOTO, 1969
	<i>B. sulphurea</i>	Picão-amarelo	CHILDERS et al., 2003b
	<i>Conyza bonariensis</i>	Buva	CHILDERS et al., 2003b
	<i>Eclipta alva</i>	Agrião-do-brejo	CHILDERS et al., 2003b
	<i>Eupatorium pauciflorum</i>	Cambará	TRINDADE & CHIAVEGATO, 1994
	<i>Parthenium hysterophorus</i>	Losna-branca	CHILDERS et al., 2003b
	<i>Sonchus asper</i>	Dente-de-leão	CHILDERS et al., 2003b
	<i>Tagetes minuta</i>	Cravo-bravo	CHILDERS et al., 2003b
Convolvulaceae	<i>Ipomoeae cairica</i>	Corda-de-viola	CHILDERS et al., 2003b
	<i>I. purpurea</i>	Corda-de-viola-roxa	CHILDERS et al., 2003b
	<i>Merrenia umbellata</i>	Jiturana	OCHOA et al., 1994
Cruciferae	<i>Raphanus sativus</i>	Nabo-bravo	CHILDERS et al., 2003b
Curcubitaceae	<i>Luffa aegyptica</i>	Bucha	CHILDERS et al., 2003b
	<i>Momordica charantia</i>	Erva-de-são-caetano	HARAMOTO, 1969
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i>	Amendoim-bravo	CHILDERS et al., 2003b
	<i>Melinis minutiflora</i>	Capim gordura	OCHOA et al., 1994
Graminae	<i>Cenchrus echinatus</i>	Capim-carrapicho	TRINDADE, 1990
Labiataeae	<i>Leonotis nepetifolia</i>	Cordão-de-frade	TRINDADE, 1990
Leguminosae	<i>Mimosa pudica</i>	Dormideira	OCHOA et al., 1994
	<i>Senna obstusifolia</i>	Fedegoso	TRINDADE, 1990
Malvaceae	<i>Sida cordifolia</i>	Guanxuma	TRINDADE, 1990
	<i>S. rhombifolia</i>	Malva-guanxuma	TRINDADE, 1990
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca americana</i>	Caruru-bravo	CHILDERS et al., 2003b
Plantaginaceae	<i>Plantago major</i>	Tanchagem	CHILDERS et al., 2003b
Portulacaceae	<i>Portulacaria oleracea</i>	Beldroega	CHILDERS et al., 2003b
Rubiaceae	<i>Ricardia brasiliensis</i>	Poaia-branca	TRINDADE, 1990
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i>	Maria-pretinha	CHILDERS et al., 2003b
Sterculiaceae	<i>Solanum paniculatum</i>	Jurubeba	TRINDADE & CHIAVEGATO, 1994

Tabela 1 (continuação).

Família	Espécie	Nome comum	Referência
Verbenaceae	<i>Waltheria indica</i>	Malva-branca	TRINDADE & CHIAVEGATO, 1994
	<i>Lantana camara</i>	Lantana	HARAMOTO, 1969
	<i>Stachytarpheta</i>	Gervão	OCHOA et al., 1994
	<i>Verbena bonariensis</i>	Cambará-de-capoeira	CHILDERS et al., 2003b

III MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Criações de *Brevipalpus phoenicis*

Duas criações-estoque de *Brevipalpus phoenicis* foram conduzidas sobre frutos de laranjeira da variedade Pêra, mantidas em câmara dimatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $60 \pm 5\%$ e fotofase de 14 horas, acondicionadas em bandejas plásticas abertas para transporte de ovos. Em ambas as criações, adotou-se a metodologia preconizada por CHIAVEGATO (1986), na qual frutos verdes de laranja com sintomas de verrugose, que oferecem nicho de oviposição para o ácaro, são lavados, secos, imersos parcialmente em parafina fundente e circundados por barreira adesiva "Tanglefoot®".

Em uma das criações, foram utilizados frutos provenientes da Estação Experimental de Bebedouro-SP, colhidos em pomares isentos de sintomas de leprose. Essa criação iniciou-se a partir de ovos de *B. phoenicis*, por não ocorrer transmissão transovariana de vírus (CHIAVEGATO & MISCHAN, 1987), que foram transferidos aos frutos manualmente, com auxílio de um pincel com poucos pêlos sob microscópio estereoscópico. A outra criação foi iniciada com ácaros tidos como virulíferos, provenientes de pomares com alta incidência de leprose e criados também sobre frutos sintomáticos de leprose para assegurar aos descendentes a fonte de vírus para contaminarem-se.

3.2 Espécies vegetais

As mudas de laranjas das variedades Natal e Pêra foram fornecidas por viveirista certificada (Estação Experimental de Bebedouro), e as demais espécies: hibisco - *H. rosa-sinensis* L. (Malvaceae); malvavisco - *M. arboreus* DC. (Malvaceae); grevílea - *G. robusta* A. Cunn. (Proteaceae); sansão-do-campo - *M. caesalpinaefolia* Benth (Mimosaceae); urucum - *B. orellana* L. (Bixaceae); e trapoeraba - *C. benghalensis* L. (Commelinaceae), foram formadas no Horto Florestal da FCAV/UNESP, e utilizadas quando atingiram 50 cm de altura em média.

3.3 Transmissibilidade de leprose para plantas alternativas em casa-de-vegetação

Cinco mudas de cada planta teste: hibisco; malvaisco; grevilea; sansão-do-campo; urucum e trapoeraba foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 5 litros, contendo partes iguais de terra, areia e esterco curtido, empregando-se as práticas usuais de cultivo. Posteriormente, foram podadas, a fim de reduzir suas áreas foliares, e desinfestadas de possíveis insetos e ácaros, utilizando algodão e pincel umedecidos, aplicados em toda a área foliar. Na base de cada folha a serem transferidos os ácaros, foi efetuada uma barreira com “Tanglefoot®” para impedir sua fuga, bem como a entrada de possíveis predadores.

Vinte ácaros virulíferos procedentes da criação-estoque sobre frutos de citros com sintomas de leprose foram transferidos para uma folha isolada por “Tanglefoot®” de cada uma das cinco mudas de cada espécie de plantas utilizadas como hospedeiras. As plantas infestadas foram mantidas em casa de vegetação por um período de 90 dias, pois admite-se que, após esse período, os ácaros presentes sejam apenas os descendentes dos anteriormente transferidos, uma vez que seu ciclo de vida é de, aproximadamente, 25 dias, e a longevidade máxima, de 44 dias, em diferentes plantas hospedeiras, a 25°C e 65-70% de U.R. (CHIAVEGATO, 1986; HARAMOTO, 1969; TRINDADE & CHIAVEGATO, 1994). Nesse período, os ácaros descendentes teriam a oportunidade de adquirir e transmitir vírus das plantas, caso essas fossem hospedeiras.

Ácaros avirulíferos foram transferidos para as plantas-testemunha nas mesmas proporções das plantas com ácaros virulíferos.

Decorridos 90 dias da colonização dos ácaros sobre as mudas, esses foram recuperados e transferidos para mudas de laranja Natal, as quais foram examinadas periodicamente, registrando-se o surgimento de sintomas de leprose.

A detecção do vírus nos tecidos vegetais foi realizada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise molecular por transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). As análises foram realizadas a partir de tecidos lesionados das plantas, nas quais foram inoculados

vírus por meio de ácaros viríferos e, no caso de possíveis plantas assintomáticas, em amostras de tecidos procedentes da área delimitada, onde o ácaro, preferencialmente, encontrava-se.

3.4 Métodos de análise

3.4.1 Microscopia eletrônica

Para os estudos citológicos visando à detecção do CiLV nos tecidos infectados, pequenos fragmentos de tecidos foliares (1mm x 3 mm) foram imersos em uma solução de Karnovsky modificada (glutaldeído 2,5%, paraformaldeído 2%, em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7, 2 e CaCl_2 0,001M) por 1-2 h. Em seguida, os fragmentos foram lavados em tampão cacodilato 0,05M e pós-fixados em solução de OsO_4 1% em tampão cacodilato 0,05M por 1h e depois em solução aquosa a 0,5% de acetato de uranila por 12 horas. Os tecidos fixados foram desidratados em série crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e, a seguir, infiltrados, emblocados na resina epóxica de baixa viscosidade Spurr® e desbastados, utilizando-se de um “trimmer” (Leica EM Trim). Os blocos foram então seccionados em um ultramicrótomo Leica UCT, equipado com navalhas de vidro. As seções ultrafinas foram coletadas em telinhas de cobre de 100 ou 200 mesh, cobertas com película de Formvar, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (KITAJIMA & NOME, 1999), e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900, instalado na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP.

Alíquotas das populações de ácaros, tidas como virulíferas, foram enviadas para serem analisadas por MET no mesmo laboratório.

3.4.2 Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

3.4.2.1 Extração de RNA total

Uma folha de cada planta-teste infestada com ácaros tidos como virulíferos, foi destacada e limpa com água destilada 15 dias após a infestação. Cada uma das folhas foi processada segundo o método para extração do RNA total descrito por GIBBS & MACKENZIE (1997), com pequena modificação. Cerca de 50-100mg das folhas de cada planta-teste, ainda frescas, foram trituradas com auxílio de um pistilo de polipropileno em um microtubo do tipo “eppendorf” em nitrogênio líquido, até que adquirissem consistência de pó fino para então adicionar a cada tubo 500 µl de tampão de lavagem (10mM de Tris-HCL pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0; 2 M NaCl; 0,05% de BSA). As amostras foram homogeneizadas com auxílio de um vórtex e centrifugadas em velocidade de 13.400 g por 5 minutos, sendo que, após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e 600µl de tampão de extração CTAB (2%CTAB; 1,4 M NaCl; 0,1 M de Tris-HCL, pH 8,0) com 0,5% de β mercaptanol foram adicionados. Após homogeneização com auxílio de um vórtex e incubação a 55°C, por 20 min, foram adicionados 400µl de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), que foram homogeneizados com auxílio de um vórtex e centrifugados em velocidade máxima por 10 minutos. A fase aquosa foi removida e colocada em um novo tubo com 1/10 do volume de 1,5 M de acetato de amônio e 1 volume de isopropanol. Posteriormente, as amostras foram incubadas a -20°C, por 15 minutos, e centrifugadas novamente a 13.400g, por 5 minutos, e, a seguir, por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com etanol 70% e seco em liofilizador. Para ressuspender o pellet, utilizaram-se 20µL de H₂O DEPC (Dimetil pirocarbonato), e, a seguir, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C.

3.4.2.2 Síntese do cDNA e RT-PCR

A síntese do cDNA foi realizada utilizando 3 µL do RNA total, 1 µL de 2,5 mM de dNTP, 1 µL de “random primers” (Invitrogen) e 7,5 µL de H₂O DEPC por amostra contida em um microtubo. Após a adição desses reagentes e a desnaturação a 70°C, por 5 minutos, os microtubos foram imediatamente refrigerados, colocando-os em recipiente contendo gelo triturado. A seguir, foram acrescentados 4 µL de tampão 5x para transcriptase reversa (Invitrogen), 2 µL de dTT 2mM (Invitrogen), 1 µL da transcriptase reversa (M-MLV-RT Invitrogen) e 0,5 µL do inibidor RNase (RNase out Invitrogen). A reação foi incubada a 37°C, por 1 hora e 30 minutos, sendo, posteriormente, armazenada em freezer a -20°C.

O RT-PCR foi preparado utilizando-se de oligonucleotídeos para amplificar parte do genoma do CiLV, conforme descrição de LOCALI et al. (2003): MP-F (5'-GCGTATTTGGCGTTGGTTTCTGAC-3') e MPR (5'-TGTTATACCAAGCCGCCTGTAAT-3') amplificam um fragmento de 344bp, correspondente a uma região de transcrição de proteína de movimento do CiLV. A reação consistiu de 2,5 mM de MgCl₂; 10 mM de dNTP mix (Invitrogen®); 0,5 µL de MP-F 10 mM; 0,5 µL de MPR 10 mM; 1 µL de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®) e H₂O destilada deionizada esterilizada para 25 µL de volume final. As amplificações foram realizadas em um termociclador PTC 100 (MJ Research, Waltham, MA), cujo programa consiste de um ciclo a 94°C, por 10 minutos e 35 ciclos a 94°C, por um minuto, 66°C por 30 segundos, e 72°C por 90 segundos. Oito µl do produto de cada amostra amplificada foram analisados em gel de agarose 1%, preparado em TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,001M EDTA) contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídio por meio de eletroforese.

3.4.2.3 Clonagem dos produtos de PCR

Utilizando Kit da “T.A. Cloning Kit” (Invitrogen®) e seguindo o protocolo do fabricante, 10µl do produto de cada amostra de PCR purificados foram acrescentados a 1µl de pGem-T (50ng/µl; Promega®); 1,3 µl de tampão de ligação 10x e 1 µL de T4 DNA ligase para a reação de ligação. Essa reação foi incubada por 16h, a 4°C.

A transformação foi executada acrescentando-se 13,3 μL da reação de ligação, 50 μL de *Escherichia coli* DH5 α competentes. A mistura foi então incubada em gelo por 1 hora, posteriormente em banho-maria a 42°C, por 1 minuto e 30 segundos, e então imediatamente transferida para ser resfriada sobre gelo, por 2 minutos. Cada tubo recebeu 1 mL do meio SOC (10 g de triptona bacteriana, 5 g de extrato de levedura; 0,585 g de NaCl, 186 mg de KCl; 10 mL e glicose 2 M; H₂O Milli-Q estéril para 1 L), e incubados em "shaker", a 37°C, por 1 hora, sob agitação de 300 rpm.

Em placas de Petri descartáveis, contendo meio de cultura LB sólido, preparado com 10 g/ L de triptona; 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; 7,5 g/L de ágar bacteriológico contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina; e sobre este 100 μL de IPTG (100 mM) e 20 μL de X-Gal (50 mg/mL) seco, um total de 100 μL da cultura de células transformadas foram espalhados e incubadas em estufa, a 37°C, por 16 horas.

Os clones selecionados para o seqüenciamento, de cor branca e sem colônias-satélite, foram coletados com palitos de madeira autoclavados e transferidos para microplacas de 96 poços contendo 400 μL de meio Circle Growth (SIGMA©), acrescido de ampicilina (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$). As microplacas foram seladas com adesivo e deixadas para a multiplicação dos clones, por período de 16 horas, a 37°C.

Dos clones foram extraídos os plasmídios transformados pela metodologia "Boiling Prep". As células foram sedimentadas nas placas após terem sido centrifugadas por 6 minutos, a 3.000 rpm. O adesivo foi removido, e o sobrenadante descartado, invertendo-se, posteriormente, as placas sobre papel absorvente, por 1 minuto.

O adesivo foi recolocado, e as placas foram levadas ao freezer, a -80°C, por 15 minutos, e logo após em estufa, a 37°C, por 10 minutos. Adicionaram-se 25 μL de água Milli-Q autoclavada e agitaram-se as placas no vórtex por 5 minutos; a seguir, foram adicionados 70 μL da solução de lise (STET-Tween 20), agitando-se novamente as placas no vórtex por, 1 minuto.

Incubaram-se as placas à temperatura ambiente, por 5 minutos, e a seguir foram colocadas no forno microondas sem adesivo, por 25 segundos. As placas foram viradas em 180° e repetiu-se o processo. Adicionaram-se mais 400 µL de água MilliQ autoclavada, e as placas foram seladas e submetidas ao vórtex, por 1 minuto.

As placas foram esfriadas em gelo, por 15 minutos, e centrifugadas por 40 minutos, a 3.000 rpm, e, posteriormente, 50 µL da solução foram transferidos para novas placas.

3.4.2.4 Seqüenciamento e estudo de homologia de seqüências

Os insertos dos clones recombinantes foram submetidos ao seqüenciador automático de DNA ABI Prism 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguindo as instruções do fabricante. Para a reação, foram utilizados 2µ do DNA, 2 µL do tampão “Save Money” (400 mM Tris-HCl pH 9,0; 10mM MgCl₂), 0,5 µL do “primer” do vetor de clonagem (SP6 5 pmols), 0,4 µL de Big Dye e 5,1 µL de H₂O Milli-Q estéril. A reação foi centrifugada por alguns segundos e colocada no termociclador (Eppendorf - Mastercycle Gradient), programado para 1 ciclo de 96°C por 2 minutos, 25 ciclos de 96°C, por 45 segundos; 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos, com o ciclo final de 4°C.

A precipitação foi realizada com 80 µL de isopropanol 65% à temperatura ambiente por 15 minutos, sendo em seguida, centrifugada a 3.000 rpm, por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi seca em papel absorvente antes da adição de 200 µL de etanol 60%. Foi realizada outra centrifugação a 3.000 rpm, por 10 minutos, e lavagem com etanol 60%, descartando a seguir o sobrenadante, sendo o “pellet” seco em temperatura ambiente.

As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos foram analisadas e comparadas a seqüências já depositadas no banco de dados GenBank acessado pelo *site* do National Center for Biotechnology Information (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando-se dos algoritmos BLASTX e BLASTN. Os eletroesferogramas das seqüências obtidas foram submetidos à análise pelo programa “Phred+Phrap+Consed” (EWING et al., 1998). Para a

verificação do alinhamento das seqüências, foi utilizado o programa CAP 3 (HUANG & MADAN, 1999). Através desses programas foram retiradas as seqüências das regiões correspondentes aos vetores empregados na clonagem e realizado o alinhamento das seqüências similares para a montagem de uma seqüência-consenso de cada amostra.

3.5 Transmissibilidade de leprose para plantas hospedeiras alternativas em campo

3.5.1 Plano experimental

O ensaio de campo foi instalado em área pertencente ao Departamento de Fitossanidade FCAV/UNESP, em Jaboticabal-SP.

O ensaio foi delineado em 4 blocos, que continham 7 tratamentos, perfazendo um total de 28 parcelas espaçadas 4 metros entre si.

Cada parcela constituiu-se de 12 plantas, posicionadas de forma a ter 4 centrais e 8 laterais, todas espaçadas 1 metro entre si (Figura1).

Foram estabelecidos os seguintes tratamentos:

1. Laranja Pêra (l) no centro das parcelas e de malvavisco (m) lateralmente: (mlm).
2. Laranja Pêra (l) no centro das parcelas e de sansão-do-campo (s) lateralmente: (sls).
3. Laranja Pêra (l) no centro das parcelas e de grevílea (g) lateralmente: (glg).
4. Laranja Pêra (l) no centro das parcelas e laranja Pêra (l) lateralmente: (lll).
5. Malvavisco (m) no centro das parcelas e laranja Pêra (l) lateralmente: (lml).
6. Sansão-do-campo (s) no centro das parcelas e laranja Pêra (l) lateralmente: (lsl).
7. Grevílea (g) no centro das parcelas e laranja Pêra (l) lateralmente: (lgl).

Os tratamentos de 1 a 7 foram destinados a ter suas plantas centrais infestadas com ácaros. Três parcelas iguais aos tratamentos 1, 2 e 3 não

receberam infestação artificial de ácaros com o intuito de avaliar a disseminação de ácaros entre as parcelas.



Figura 1. Vista de uma parcela experimental: laranjeira Pêra (l) no centro da parcela e de grevília (g) lateralmente (glg).

3.5.2 Infestações de *Brevipalpus phoenicis*

As mudas foram plantadas em 15 de novembro de 2005, e quando as plantas atingiram um tamanho suficiente para que as copas se tocassem, as plantas centrais foram infestadas com *B. phoenicis*. A infestação foi executada em duas etapas, para assegurar que a colonização obtivesse êxito, sendo a primeira no período de 10-17 de julho de 2006, e a segunda de 18-22 de dezembro de 2006.

As infestações foram executadas com auxílio de discos foliares de laranja de 1,5 cm de diâmetro confeccionados com um vazador de metal. Para cada disco foram transferidas 10 fêmeas adultas com a ajuda de um pincel de poucos pêlos, sob microscópio estereoscópico. Os discos foliares contendo os ácaros foram acondicionados em placas de Petri sobre algodão, umedecidos para sua

conservação, levados ao campo e fixados com auxílio de alfinetes nas folhas das plantas centrais. Em cada planta, na primeira infestação, foram fixados 10 discos, num total de 100 ácaros por planta, e na segunda infestação, 5 discos, portanto 50 ácaros (Figuras 2 e 3).

Durante todo o período de condução do experimento, as plantas foram vistoriadas, a fim de se verificar a ocorrência de possíveis doenças, pragas e deficiências nutricionais, e efetuadas podas para manter as copas das plantas com porte semelhante, porém tocando-se.

Figura 2. Placa de Petri contendo discos de folha de laranja, sobre algodão umedecido, infestadas por *Brevipalpus phoenicis*.



Figura 3. Afixação de discos foliares infestados com ácaros nas folhas das plantas.



3.5.3 Avaliações

3.5.3.1 Eficiência do método de infestação de *Brevipalpus phoenicis*

Após a infestação, a população de ácaros nas plantas foi monitorada por visualização direta das folhas, com auxílio de lupa de bolso, com campo visual de 1cm e aumento de 10x.

A eficiência do método de infestação do ácaro *B. phoenicis* foi avaliada, também indiretamente, através da incidência de leprose nas plantas de laranja, uma vez que as condições oferecidas às demais espécies de plantas foram as mesmas, e a constatação dos sintomas de leprose nas plantas de laranja é distinguida mais rapidamente.

3.5.3.2 Dispersão de ácaros

A dispersão de ácaros das plantas centrais para as plantas laterais foi avaliada através da estimativa populacional de ácaros nas mesmas. Para isso, decorridos 90 dias da última infestação, um ramo com aproximadamente 15 cm de cada planta central, assim como de quatro plantas laterais de cada parcela, foram coletados aleatoriamente. E efetuou-se a contagem de ácaros nesses ramos, sendo considerados os indivíduos em qualquer fase de seu desenvolvimento.

Semelhantemente, nas parcelas em que não houve infestação artificial das plantas centrais com ácaros, também se avaliou sua população.

3.5.3.3 Distribuição temporal do *Brevipalpus phoenicis*

O nível populacional de *B. phoenicis* nas parcelas foi avaliado através de amostragem da população de ácaros nas quatro plantas centrais que foram infestadas e em quatro plantas laterais de cada parcela, em 20 de março e em 18 de junho de 2007, conforme a metodologia de amostragem citada no item anterior (3.5.3.2).

3.5.3.4 Incidência e severidade da leprose

As avaliações de incidência e de severidade da leprose nas plantas cítricas de cada parcela (centrais ou laterais) foram efetuadas em 20 de março e 18 de junho de 2007.

A incidência de leprose nas plantas cítricas foi avaliada com base no número de plantas com algum sintoma de leprose, e a severidade da leprose nas plantas cítricas foi avaliada de acordo com a escala visual de notas proposta por PATTARO (2006) (Tabela 2).

Tabela 2. Escala visual de notas para a avaliação de severidade de leprose em plantas de laranja.

Descrição dos sintomas	Nota
Ausência de lesões	0
Poucas lesões restritas a um órgão e setor da planta	1
Lesões em folhas e em ramos finos	2
Lesões abundantes em mais de um órgão, necrose de ramos	3
Lesões em mais de um setor da planta, em mais de um órgão, necrose de ramos e desfolha	4
Além das descritas no item anterior, seca e morte de ramos	5

A incidência e a severidade da leprose somente foram avaliadas nas plantas cítricas, uma vez que em campo, os sintomas de leprose em malvaisco, sansão-do-campo e grevílea no campo não se apresentam muito evidentes.

3.5.3.5. Análise estatística dos dados

Os dados obtidos das avaliações da dispersão de ácaros, ou seja, a contagem das populações nas plantas centrais, bem como nas laterais e a incidência da leprose foram transformados em arco-seno da raiz quadrada de $(x + 0,5)$ e submetidos à análise de variância, sendo considerado $\alpha = 0,05$ para o nível de significância, e teste Tukey para a comparação de médias.

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Transmissibilidade de CiLV para plantas hospedeiras alternativas em casa-de-vegetação

A diagnose efetuada através da verificação de sintomas em laranja e por análise molecular (RT-PCR) corroboraram-se (Tabela 3). Todavia, as ausências de inclusões virais nas amostras de urucum e grevilea por análise de microscopia não excluíram a possibilidade de essas plantas serem hospedeiras do vírus, pois nem sempre são possíveis de serem visualizadas, havendo para tanto a necessidade de essas estruturas encontrarem-se presentes, coincidentemente, nos cortes ultrafinos dos tecidos foliares efetuados para exame.

Tabela 3. Indicativo da presença de CiLV-C nas espécies de plantas hospedeiras por meio de diferentes técnicas de diagnose.

Espécie/nome comum	Técnicas empregadas ^a		
	SL	RT-PCR	MET
<i>B. orellana</i> (urucum)	^b 5/2	3/3	3/0
<i>C. benghalensis</i> (trapoeraba)	5/5	3/3	3/1
<i>C. sinensis</i> var. Pêra (laranja)	5/5	5/3	5/3
<i>G. robusta</i> (grevilea)	5/2	3/3	3/0
<i>H. rosa-sinensis</i> (hibisco)	5/3	3/2	3/1
<i>M. arboreus</i> (malvavisco)	5/3	3/2	3/2

^aSL= sintomas em laranjeira após transferência de ácaros virulíferos provenientes das diferentes plantas estudadas; RT-PCR = Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase; MET= Microscopia eletrônica de transmissão.

^bn/n = número de plantas testadas/número de plantas positivas

4.1.1 Análise de sintomas

Os sintomas do vírus nas folhas das diferentes plantas foram variados, ocorrendo lesões verdes em folhas senescentes, posteriormente pontuações necróticas em malvaisco; circulares, cloróticas e necróticas em hibisco, as lesões foliares apresentadas pelo CiLV-C em laranja; manchas cloróticas ao longo das nervuras nas folhas e necrose em ramos em trapoeraba; e não-específicos em urucum e grevílea (Figuras 4a, b, c, d, e, e f).

O conhecimento dos sintomas nessas diversas plantas auxilia no reconhecimento de focos da doença nos pomares e indica a necessidade de se fazerem levantamentos com base nesses sintomas quando essas plantas estão presentes no pomar.

Entende-se que a variação no número de plantas infectadas (Tabela 3) e a diversidade sintomatológica (Figura 4) podem ser decorrentes de reações diferentes das plantas frente ao vírus, demonstrando graus de suscetibilidade diferentes, principalmente no que se refere à variação de grau de infecção, fato também observado quando se compara com plantas cítricas (BITANCOURT, 1955b; RODRIGUES et al., 1995; ROESSING & SALIBE, 1967).

Considera-se, também, que o próprio ácaro se comporta diferentemente quando coloniza essas hospedeiras, como observado por ULIAN & OLIVEIRA (2002). Dessa forma, o crescimento populacional distinto interfere diretamente na disseminação da doença na planta e, por consequência, no pomar, pois a infecção da leprose é localizada, e o ácaro tem, necessariamente, de entrar em contato direto com o vírus no processo de alimentação, para tornar-se transmissor do mesmo, uma vez que não ocorre a transmissão transovariana do CiLV nos ácaros (BOARETTO et al., 1993; CHIAVEGATO & MISCHAN, 1987).

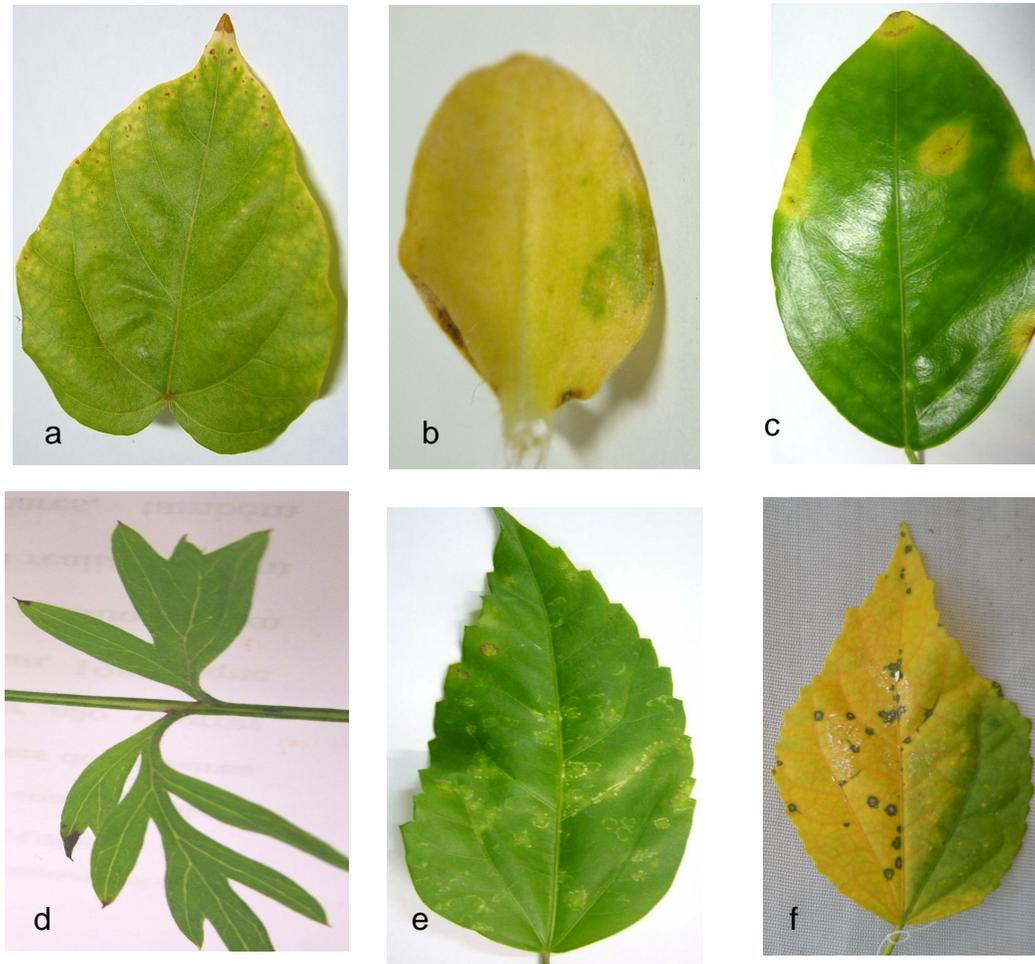


Figura 4. a) Lesões em folhas de diversas espécies vegetais infestadas com *Brevipalpus phoenicis* infectados com vírus da leprose: a) *Bixa orellana* (urucum); b) *Commelina Benghalensis* (trapoeraba); c) *Citrus sinensis* (laranjeira var. Pêra); d) sintomas em folha de *Grevilea robusta* (grevílea); e) *Hibiscus rosa-sinensis* (hibisco); f) *Malvaviscus arboreus* (malvavisco).

4.1.2 RT-PCR

A presença do vírus foi detectada pela amplificação de fragmentos com 344pb visualizados em gel de agarose submetidos a eletroforese em amostras de hibisco, malvavisco, grevílea, urucum, trapoeraba e laranjeira Pêra (Figura 5), o que corresponde ao tamanho esperado, conforme descrito por LOCALI et al. (2003).

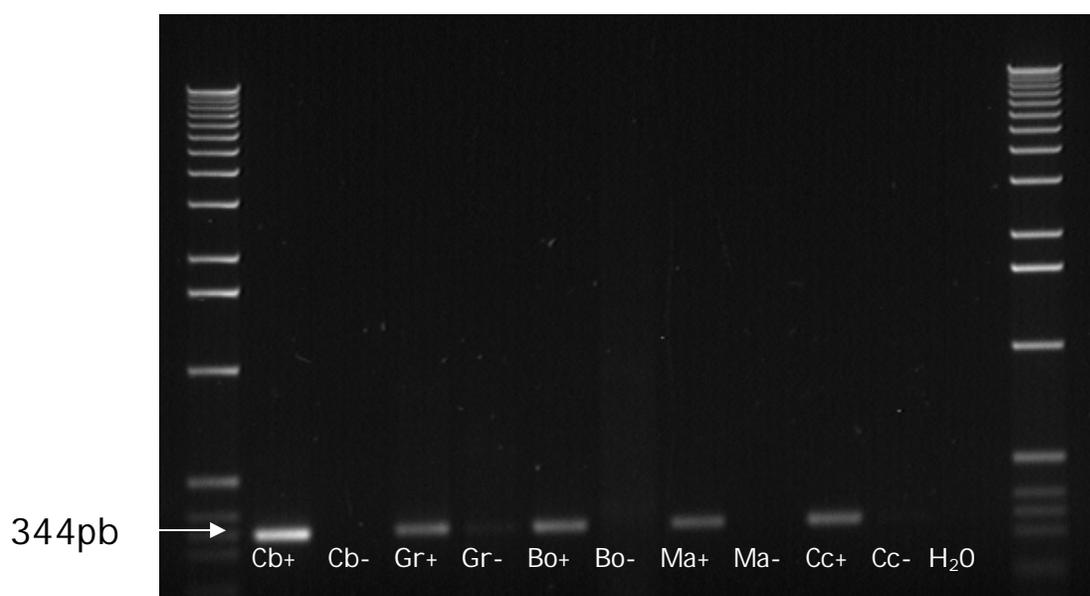


Figura 5. Imagem de eletroforese em gel de agarose 1% de produtos de RT-PCR utilizando *primers* específicos da região do gene que codifica a proteína de movimento de CiLV, extensão 1-kb Ladder (Invitrogen). + = plantas infectadas. - = controles negativos. **Cb**= *Commelina benghalensis* (trapoeraba); **Cc**= *Citrus sinensis* var. Pêra; **Gr**= *Grevilea robusta* (grevílea); **Bo**= *Bixa orellana* (urucum); **Ma**= *Malvaviscus arboreus* (malvavisco).

4.1.3 Análise de seqüenciamento dos “amplicons”

As amostras positivas pela amplificação por RT-PCR (item 4.1.2) tiveram seus produtos (*amplicons*) clonados, seqüenciados e comparados com outras seqüências armazenadas no GenBank, através dos algoritmos BlastX e BlastN acessados no *site* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

As amostras apresentaram amplicons com alta semelhança com a proteína de movimento do CiLV-C, com uma faixa de 86% a 99% de similaridade de nucleotídeos e 90 a 100% de aminoácidos deduzidos, o que, em última instância, é a expressão traduzida dos nucleotídeos e representa uma porção da própria proteína de movimento do CiLV-C (Tabela 4).

Tabela 4. Similaridade entre seqüências do CiLV das plantas-teste e seqüência de CiLV-C depositada no GenBank.

Hospedeira	Número de clones	Identidade nt (%) ^a com CiLV-C	Número de acesso GenBank	Identidade aa (%) ^b com CiLV-C	Acesso GenBank
<i>C. benghalensis</i>	9	88	AY289190.1	92	ABC75825.1
<i>C. sinensis</i>	3	86	AY289190.1	90	ABC75825.1
<i>H. rosa sinensis</i>	1	98	DQ388513.1	98	ABC75825.1
<i>M. arboreus</i> *	1	99	DQ272491.1	100	ABC75825.1

*Isolado de Cordeirópolis-SP; ^ant= nucleotídeos; ^baa = aminoácidos.

4.1.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise das micrografias eletrônicas de transmissão permitiu inferir que, tanto *H. rosa-sinensis*, quanto *M. arboreus*, *C. benghalensis* e *C. sinensis*, apresentavam inclusões tipicamente virais, semelhantes às apresentadas pelo CiLV-C em citros (Figuras 6a, b, c e d).

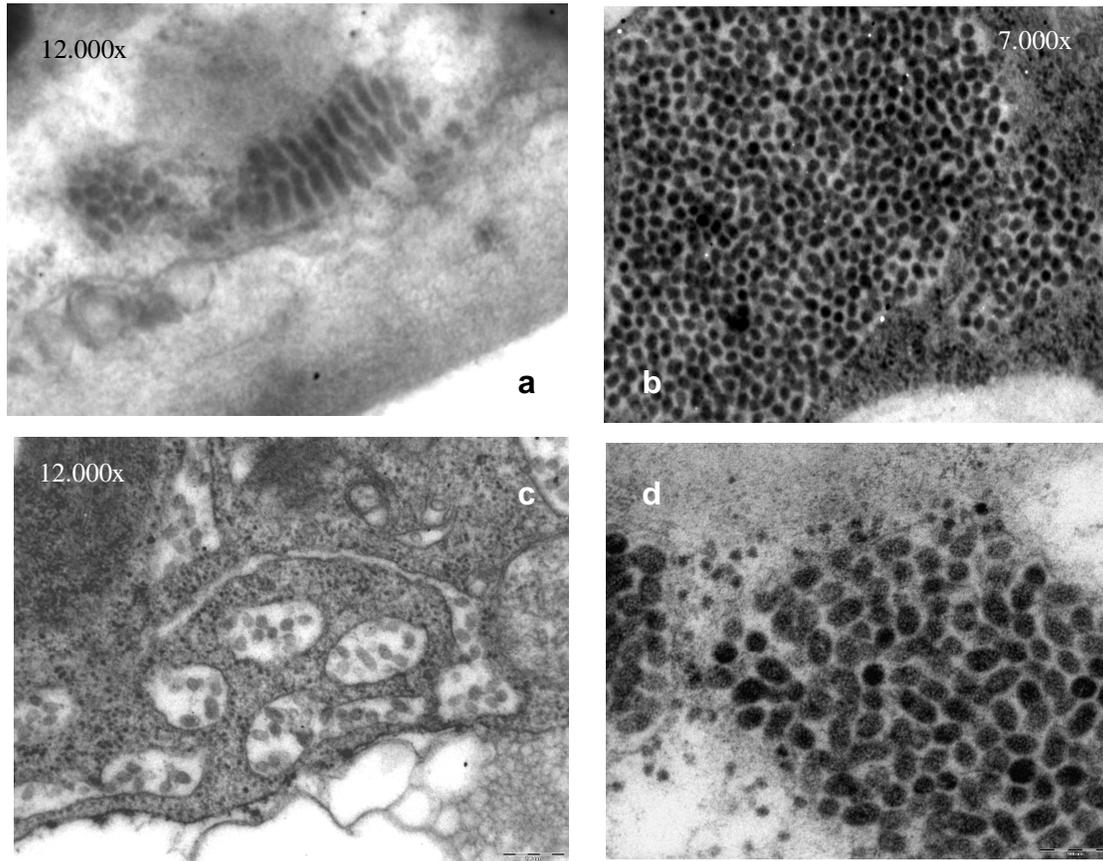


Figura 6. Eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão de cortes de tecidos foliares infectados pelo vírus da leprose dos citros (CiLV-C). **a)** Vista transversal e longitudinal do vírus em *Citrus sinensis*; Corte transversal em: **b)** *Commelina benghalensis*; **c)** *Malvaviscus arboreus*; **d)** *Hibiscus rosa-sinensis*.

G. robusta, *M. cesalpinaefolia* e *B. orellana* não lograram atestar o mesmo; entretanto, tal observação não as excluem da possibilidade de serem hospedeiras do vírus, uma vez que, através de outros métodos empregados, mostraram-se positivas para CiLV, e adicione-se a isso o fato de a infecção desse vírus ser localizada, o que torna difícil encontrar inclusões em plantas que não apresentam

lesões ou em que as lesões não sejam típicas das viroses transmitidas por *Brevipalpus* spp.

Nas amostras dos ácaros analisados por MET foram verificadas partículas no trato digestivo do acarino (Figura 7) (KITAJIMA, E. W.; comunicação pessoal*).

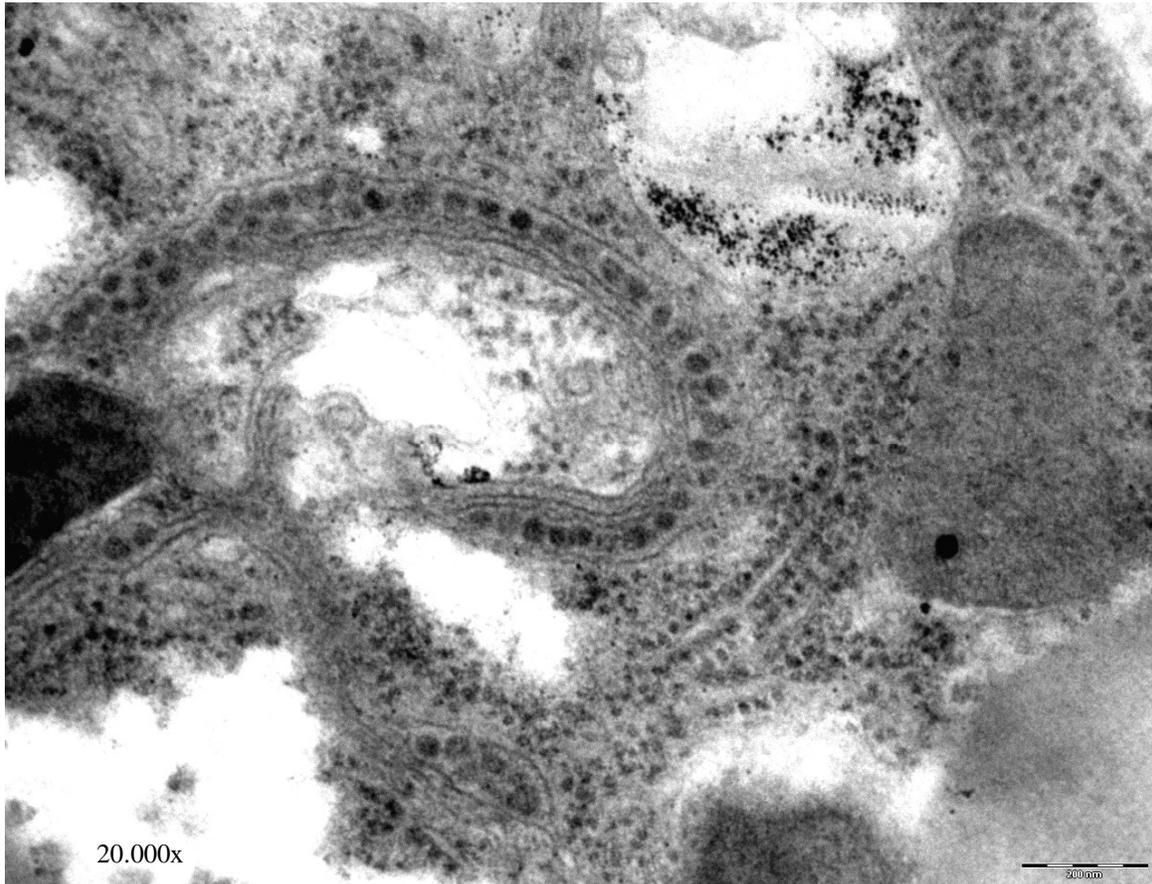


Figura 7. Eletromicrografia obtida em microscópio eletrônico de transmissão em corte mediano do corpo de *Brevipalpus phoenicis* (foto de Elliot Watanabe Kitajima).

* KITAJIMA, E.W. Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 9, CEP 13418-900, Piracicaba, SP, Brasil

O potencial de infecção, por infestação de ácaros virulíferos provenientes de plantas adjacentes às laranjeiras, não foi completamente explorado, no entanto procurou-se estudar plantas com alta expressividade nos pomares cítricos. Dentre as plantas estudadas, trapoeraba destaca-se como planta infestante de grande relevância, pois encontra-se praticamente na totalidade dos campos de cultivo de laranja no Brasil, além de ter sido relatada na América, Europa e Ásia (DONADIO et al., 1976; DUNCAN, 1967; WILSON, 1981). Essas características, acrescidas ao fato de os ácaros recuperados dessas plantas acarretarem 100% de infecção das mudas de laranjeira e mostarem-se incontestavelmente positivos para o CiLV, e nos demais testes de diagnose, RT-PCR e MET, colocam essa espécie em posição de risco máximo de fonte de inóculo do vírus.

Plantas, como hibisco e malvaiscoq ambas pertencentes à família Malvaceae, utilizadas como cercas-vivas, são muito empregadas em inúmeros países e representam um risco sério em virtude da possibilidade de atuarem como foco da leprose. Nessas plantas, observaram-se sintomas distintos de leprose, enquanto o CiLV-C em hibisco acarreta manchas cloróticas, em malvaiscoq apresenta-se na forma de pontos necróticos, evidenciando que plantas da mesma família podem mostrar reações diferentes perante o vírus.

Atualmente, sansão-do-campo é a cercaviva mais empregada na citricultura brasileira, em razão de possuir crescimento rápido, caule espinhoso e seus ramos formarem um emaranhado denso, que dificulta o acesso de pessoas e animais (RIBASKI et al., 2003). Segundo ULIAN & OLIVEIRA (2002), essa planta comporta-se como hospedeiro favorável ao *B. phoenicis*, servindo de refúgio para os ácaros, mesmo porque, na maioria das vezes, somente são tatadas com acaricidas as plantas cítricas. Os resultados obtidos mostram que o vírus pode estar presente nessa hospedeira; no entanto, até o momento, não se verificaram transmissões do CiLV-C com ácaros provenientes dessas plantas, porém não se excluiu essa possibilidade.

A grevílea é uma planta de origem australiana, introduzida em vários países subtropicais com a intenção de ser utilizada como quebra-ventos, em diversas culturas, devido a suas características ideais, como pereniflora, de rápido

crescimento, ereta e pouco agressiva na competição radicular (DURIGAN & SIMÕES, 1987; SANTOS et al., 2000). Urucum, *B. orellana*, também utilizado como cerca-viva, tem origem na América do Sul e distribuição restrita a esse continente.

Verificou-se que CiLV-C possui potencial de infecção não-exclusivo a rutáceas, fato esse anteriormente observado somente através de inoculações mecânicas, ainda assim com relativa dificuldade (COLARICCIO et al., 1995). Atesta-se a versatilidade do vírus ao observar infecção em uma gama de hospedeiros, compreendendo monocotiledôneas e dicotiledôneas, pertencentes a 5 famílias diferentes, entre as quais, Bixaceae, Commelinaceae, Malvaceae, Mimosaceae (dois gêneros), Proteaceae e Rutaceae. O fato de as inoculações ocorrerem a partir de infestações de ácaros virulíferos, levanta a possibilidade de que, nos pomares de laranja, possa haver fontes de inóculo do vírus em hospedeiras não-monitoradas, o que aumenta a preocupação com os cuidados fitossanitários na cultura.

Dentre todos os métodos empregados, a análise por RTPCR se apresentou o mais sensível, isso porque a baixa quantidade do vírus nas folhas não é um fator limitante, pois permite detectá-lo mesmo em plantas assintomáticas, como se averiguou.

A relação entre as plantas hospedeiras do ácaro e as cítricas, até o momento, não tinha sido alvo de estudos com relação ao CiLV, fato compreensível devido às limitações de dispersão do ácaro; mesmo assim, é inegável o risco que essas hospedeiras desempenham, visto constituírem-se em focos para reinfestação de ácaros nas plantas cítricas. Outro aspecto de suma importância é o fato de as plantas infestantes, bem como as plantas utilizadas como cercas-vivas e quebra-ventos, serem depositárias do CiLV e, portanto, com potencial de interferir decisivamente na epidemiologia da doença.

4.2 Transmissibilidade da leprose para plantas hospedeiras alternativas em campo

4.2.1 Eficiência do método de infestação de *Brevipalpus phoenicis*

O método de infestação do *B. phoenicis* avaliado indiretamente, 30 dias após a última infestação, através da porcentagem de plantas de laranja que ficaram doentes após a colonização de as mesmas com ácaros mostrou-se eficiente. Para isso, foram consideradas positivas todas as plantas com, pelo menos, uma lesão de leprose em qualquer órgão, ramo, folha ou fruto.

Os resultados mostraram na incidência de leprose nas plantas cítricas entre os blocos, sendo o bloco 1 a maior com 81,25%, e o bloco 4 com a menor média, 50% de plantas com sintomas, sendo a média geral de 62,5% (Figura 8).

Esses resultados indicaram que a infestação foi satisfatória, quanto ao número de ácaros utilizados e método adotado, e condizente com o que já havia sido verificado por RODRIGUES (2000), que observou que 50% das plantas de laranja da variedade Pêra apresentavam sintomas após 90 dias da infestação com ácaros.

A média de plantas de laranja com sintomas de leprose não ter atingido 100%, era esperada, uma vez que a transmissão do vírus pelo ácaro depende da quantidade de ácaros virulíferos na população, e até mesmo da quantidade de partículas virais no interior do ácaro, e da suscetibilidade do tecido em que o ácaro se alimenta (ramo, folha ou fruto) (RODRIGUES, 2000).

Esses dados evidenciam, indiretamente, que uma quantidade de ácaros provenientes das plantas centrais, de quaisquer das plantas consideradas, migraram, para plantas cítricas, pelo vento ou por movimentação própria, uma vez que, nas plantas centrais, foi permitido um crescimento que possibilitasse contato direto com as plantas laterais, permitindo então a dispersão do CiLV.

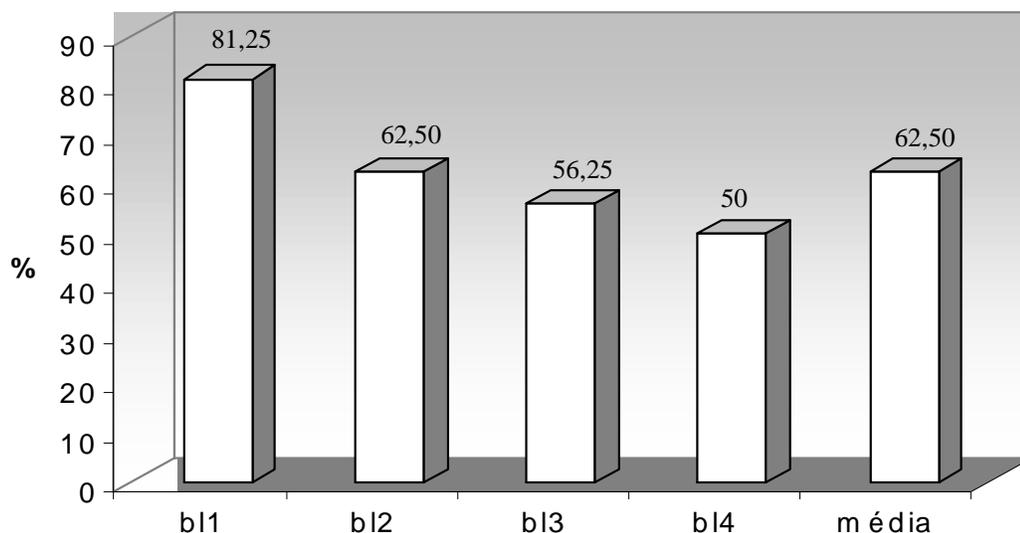


Figura 8. Porcentagens médias de plantas de laranja com sintomas de leprose nos blocos (b11, b12, b13, b14), e média dos blocos, independentemente dos tratamentos, 30 dias após a infestação.

4.2.2 Dispersão de ácaros

A avaliação da população de ácaros, realizada 90 dias após a infestação, indicou que o nível se encontrava semelhante nas plantas artificialmente infestadas ou não.

As maiores médias populacionais deram-se nas plantas de laranja e malvavisco, que apresentaram valores próximos entre si, seguido de sansão-do-campo e grevílea, com níveis de infestação mais próximos entre si (Figura 9).

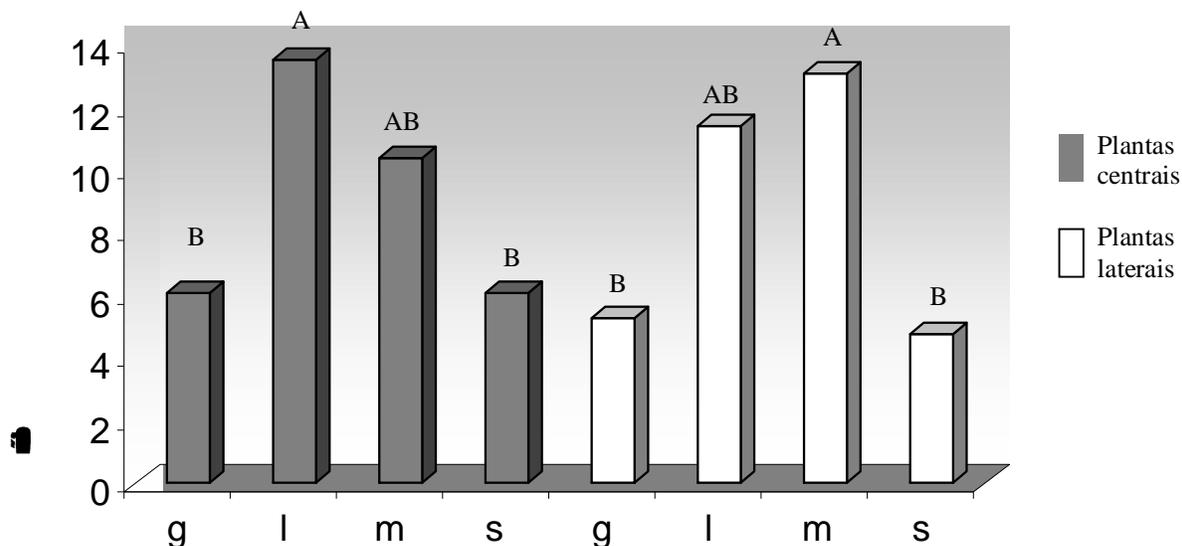


Figura 9. Número médio de *Brevipalpus phoenicis* transformado em arc-sen $(x + 0,5)^{1/2}$ nas plantas centrais e laterais, avaliado 90 dias após a infestação, g = grevílea; l = laranja; s = sarão-do-campo; m = malvavisco. Médias com as mesmas letras não diferem estatisticamente.

Mesmo tendo sido a população avaliada nos meses em que, geralmente, se encontrava em níveis mais baixos no campo (OLIVEIRA, 1986), foi importante que fosse realizada na mesma época das avaliações de incidência e severidade de leprose nas plantas, para que os dados pudessem ser comparados.

Segundo ALVES (2004), *B. phoenicis* consegue locomover-se em até $7,3 \text{ cm.dia}^{-1}$ sobre substrato de areia fina. Apesar de esta distância ser considerada pequena, uma fêmea adulta tem longevidade próxima a 19 dias, portanto pode locomover-se 1,33 metros no decorrer desse período.

Entretanto, a dispersão por caminhamento, nessa condição, é considerada secundária, a não ser que as plantas estejam em contato direto, possibilitando que os ácaros se locomovam mais rapidamente (ALVES, 2004; ALVES et al., 2005).

Em testes de laboratório, ALVES et al. (2005) verificaram que, mesmo em condições limitadas, ventos de 30 km.h¹ são capazes de arrastar ácaros da superfície de frutos e levá-los a distâncias maiores.

A dispersão dos ácaros nos pomares cítricos tende a ser mais efetiva nas linhas do que nas entrelinhas, sendo que os dois mecanismos de dispersão, vento e caminamento, podem ocorrer de modo a se somarem, facilitados pela proximidade das plantas nas linhas (RODRIGUES, 2002).

Uma fêmea adulta de *B. phoenicis* coloca, em média, 0,8 ovos por dia (TRINDADE & CHIAVEGATO, 1994), sendo o ciclo vital do ácaro de 30 dias; portanto, após 90 dias, poderão ocorrer 3 gerações. Como a infestação nas plantas centrais foi iniciada com 150 fêmeas adultas, resulta ao final desse período numa população a tal nível que aumenta em muito a dispersão.

Observou-se uma dispersão dos ácaros das plantas infestadas para as não-infestadas, dados que, somados às informações do nível de infecção das plantas de laranja infestadas, validam a hipótese de transmissibilidade de CiLV entre plantas de espécies diferentes por *B. phoenicis*.

A diferença de crescimento populacional do ácaro nas diferentes plantas observada por ULIAN & OLIVEIRA (2002) e MAIA & OLIVEIRA (2004), foi também verificada neste trabalho. O nível populacional mostrou-se baixo, o que era esperado para essa época do ano, pois OLIVEIRA (1996) em estudos realizados nesta região do Estado, havia constatado baixos níveis populacionais em janeiro e fevereiro, o que coincide com o período mais chuvoso do ano. Todavia os resultados sugerem a maior preferência de *B. phoenicis* pelas plantas de laranja e malvavisco.

4.2.3 Distribuição temporal de *Brevipalpus phoenicis*

Aos 90 dias da última infestação, o tratamento que continha somente plantas de laranja (III) e o que continha malvavisco na linha central (ImI) foram os que apresentaram maiores níveis populacionais (Figura 10).

Semelhantemente, ainda que com leve crescimento em número de indivíduos, após 180 dias da última infestação, os tratamentos que apresentaram

os maiores níveis populacionais foram os mesmos que aos 90 dias, situação observada também nos demais tratamentos, exceto naquele que, continha plantas de laranja no centro e malvavisco nas laterais (lml) (Figura11).

Há evidências de que as plantas de laranja e malvavisco proporcionam melhor crescimento populacional para *B. phoenicis*. No entanto, se compararmos os níveis populacionais em lml e mlm, aos 90 e 180 dias, verifica-se que o número de ácaros, em mlm, foi inferior ao lml, que se comportou de modo semelhante aos demais tratamentos. A predominância de plantas cítricas associadas a malvavisco parece ser o fator para maior nível populacional do ácaro, além do posicionamento das plantas nas parcelas.

Nas parcelas que não foram infestadas artificialmente, laranja-grevílea-laranja, laranja-malvavisco-laranja e laranja-sansão-do-campo-laranja, não foram observados ácaros, o que comprova sua baixa dispersão.

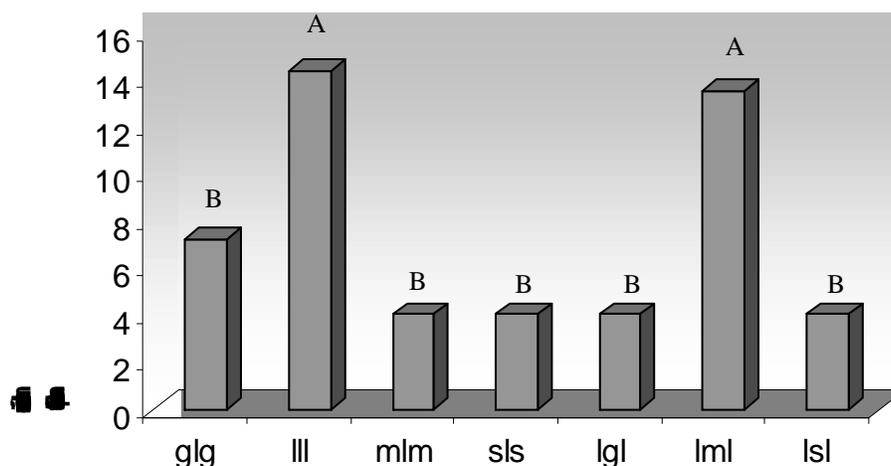


Figura 10. Número médio de ácaros *Brevipalpus phoenicis* transformados em arcsen $(x + 0,5)^{1/2}$ nos diversos tratamentos, avaliado 90 dias após a infestação em 15cm de ramo, de 8 plantas, nos tratamentos (glg=grevílea-laranja-grevílea; lll=laranja-laranja-laranja; mlm=malvavisco-laranja-malvavisco; sls=sansão-do-campo-laranja-sansão-do-campo; lgl=laranjagrevílea-laranja; lml=laranja malvavisco-laranja; lsl=laranja-sansão-do-campo-laranja). Médias com as mesmas letras não diferem estatisticamente.

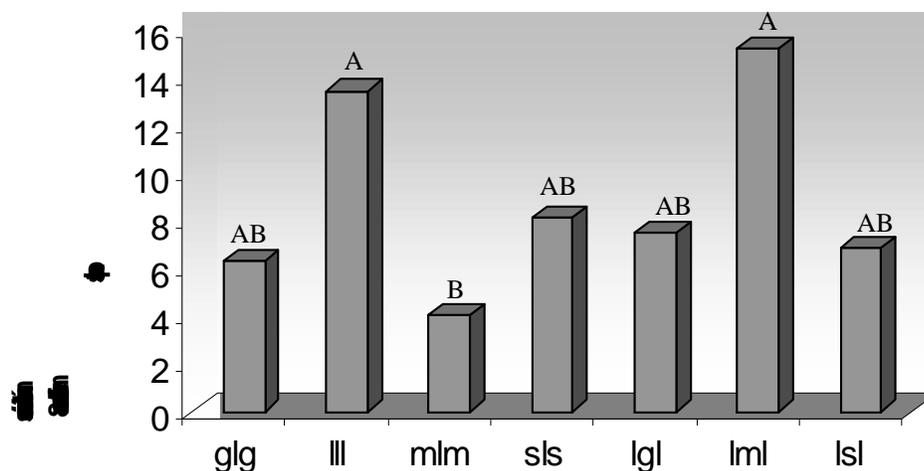


Figura 11. Número médio de ácaros *Brevipalpus phoenicis* transformados em arcsen $(x + 0,5)^{1/2}$ nos diversos tratamentos, avaliado 180 dias após a infestação em 15cm de ramo, de 8 plantas (glg=grevíle-laranja-grevílea; III=laranja-laranja-laranja; mlm=malvavisco-laranja-malvavisco; sls=sansão-do-campo-laranja-sansão-do-campo; lgl=laranja-grevílea-laranja; lml=laranja-malvavisco-laranja; lsl=laranja-sansão-do-campo-laranja). Médias com as mesmas letras não diferem estatisticamente.

4.2.4 Incidência de leprose nas plantas de laranja

4.2.4.1 Incidência de leprose nas plantas de laranja diretamente infestadas (plantas centrais)

Após 90 dias da última infestação artificial de ácaros, as plantas de laranja, em posição central nas parcelas, apresentaram altos níveis populacionais e incidência de leprose que variaram de 75 a 100%. O tratamento que continha malvavisco nas laterais apresentou 100% de plantas de laranja com leprose (Figura 12).

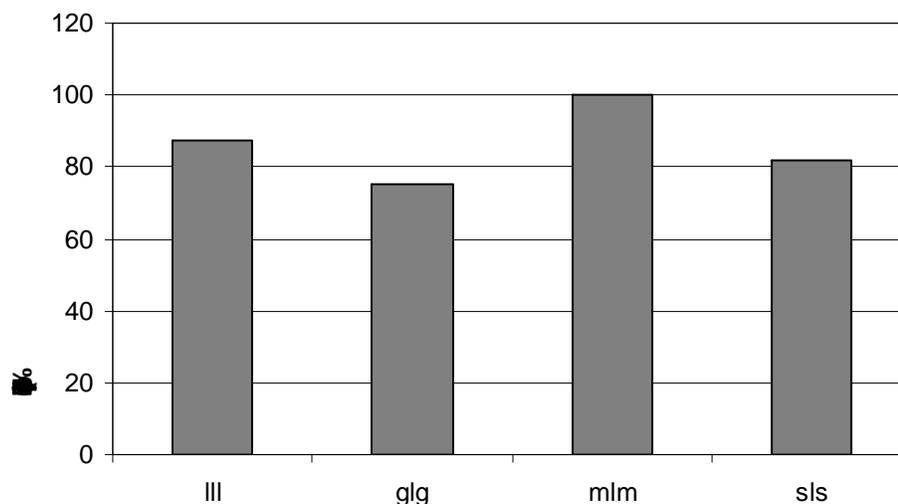


Figura 12. Porcentagem de plantas de laranjas infestadas com *Brevipalpus phoenicis* virulíferos com sintomas de leprose, nos tratamentos III=laranja-laranja-laranja; glg=grevílealaranja-grevílea; mlm=malvaviscolaranja-malvavisco; sls=sansão-do-campo-laranja-sansão-do-campo.

Os resultados observados, quanto ao percentual de incidência de leprose nas plantas cítricas, foram bem elevados, se comparados aos observados por RODRIGUES (2000), que observou 50% de plantas com leprose após 50 dias de infestação.

4.2.4.2 Incidência de leprose nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas diretamente infestadas

As duas avaliações de incidência de leprose nas plantas de laranja que estavam em posição lateral às plantas diretamente infestadas, 90 e 180 dias após infestação, mostram a evolução dos sintomas e também o aumento na incidência, na maioria dos tratamentos, de uma avaliação para outra (Figura 13).

O tratamento contendo apenas plantas de laranja foi o que obteve a maior incidência de leprose em ambas as avaliações, e também um maior crescimento, na ordem de 20% de uma avaliação para outra. Em contrapartida, o tratamento contendo plantas de sansão-do-campo manteve o mesmo nível (Figura 13).

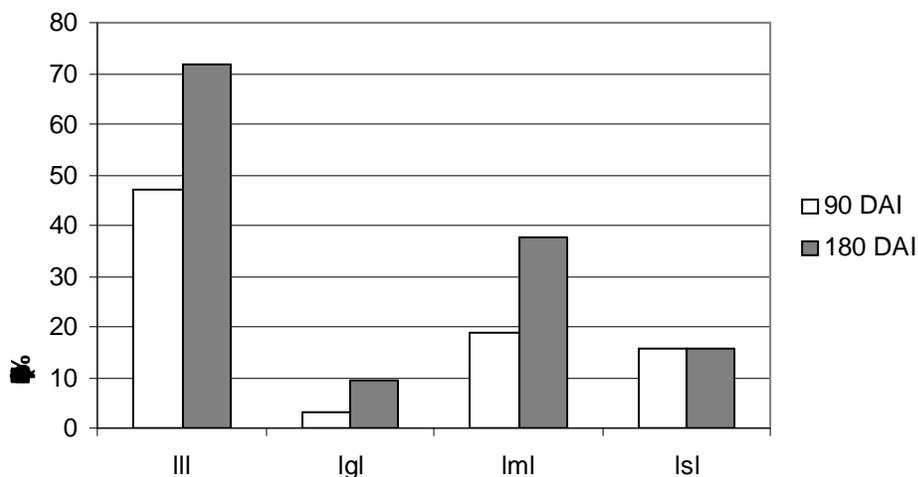


Figura 13. Incidência de leprose (%) nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas de grevílea (Igl), laranja (III), malvavisco (lml) e sansão-do-campo (Isl), 90 e 180 dias após serem infestadas artificialmente com *Brevipalpus phoenicis*.

Avaliações nas plantas de laranja efetuadas após 90 dias da última infestação mostraram até que aquele momento não havia diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5).

Esses resultados indicam que a incidência de leprose se encontrava baixa e achava dispersa; provavelmente, a causa de não apresentar, estatisticamente, diferenças entre os tratamentos, pode indicar, também, que a população de ácaros no campo não se infectou uniformemente, causando, como conseqüência, uma variação muito grande na incidência da leprose nas plantas.

Por outro lado, após 180 dias, as diferenças estatísticas ficaram mais evidentes, mostrando que o tratamento de maior incidência de sintomas de leprose foi o que possuía apenas plantas de laranja (III); em posição intermediária ficou o tratamento que possuía laranjeiras plantadas ao lado de malvavisco (lml); já os tratamentos com plantas de grevílea (Igl) e sansão-do-campo (Isl); obtiveram incidência igualmente inferior (Tabela 6).

Tabela 5. Incidência de leprose nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas de grevilea (Igl), laranja (III), malvavisco (ImI) e sansão-do-campo (IsI), 90 dias após serem infestadas artificialmente com *Brevipalpus phoenicis* virulíferos.

Tratamentos	Incidência de leprose
laranja-laranja-laranja (III)	11,16 A*
laranja-sansão-do-campo-laranja (IsI)	7,32 A
laranja-malvavisco-laranja (ImI)	7,18 A
laranja-grevilea-laranja (Igl)	4,80 A

* Dados transformados em $\text{arc-sen}(x + 0,5)^{1/2}$; médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey.

Tabela 6. Incidência de leprose nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas de grevilea (Igl), laranja (III), malvavisco (ImI) e sansão-do-campo (IsI), 180 dias após serem infestadas artificialmente com *Brevipalpus phoenicis* virulíferos.

Tratamentos	Incidência de leprose
laranja-laranja-laranja (III)	14,38 A *
laranja-malvavisco-laranja (ImI)	9,71 AB
laranja-sansão-do-campo-laranja (IsI)	7,55 B
laranja-grevilea-laranja (Igl)	6,29 B

* Dados transformados em $\text{arc-sen}(x + 0,5)^{1/2}$; médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey.

Os resultados apresentados de laranja e malvavisco foram coerentes com os dados observados nas análises do experimento em casa de vegetação, em que a contaminação de leprose nas plantas malvavisco e em laranja foi detectada por todos os métodos utilizados (Tabela 3).

O nível populacional de *B. phoenicis*, bem como a incidência de leprose foram altos no tratamento em que as plantas de malvavisco foram infestadas (ImI). Dessa forma, em condições de campo, assim como acontece em plantas de laranja, malvavisco pode comportar-se como fonte de inóculo do vírus e de ácaros aptos a se dispersarem para plantas de citros, motivo pelo qual deve ser evitada em pomares de citros, mostrando-se imprópria como cerca-viva.

Por outro lado, nos tratamentos que tiveram plantas de grevílea e sansão-do-campo infestadas com ácaros virulíferos, a incidência de leprose nas plantas de laranja, foi baixa, indicando que essas plantas, além de não se mostrarem favoráveis ao desenvolvimento dos ácaros, são menos importantes como fontes de inóculo do vírus, conseqüentemente apresentando menos risco para o pomar cítrico.

A incidência de leprose em plantas de laranja, relacionada com o número de ácaros, mostrou um baixo coeficiente de correlação (55%) (Figura 14), uma vez que em uma população de ácaros nem todos se contaminam, já que a leprose não é sistêmica e há necessidade de o ácaro se alimentar em locais lesionados BASSANESI & LARANJEIRA (2006), a população de ácaros virulífera neste caso pode estar em baixo número em malvavisco.

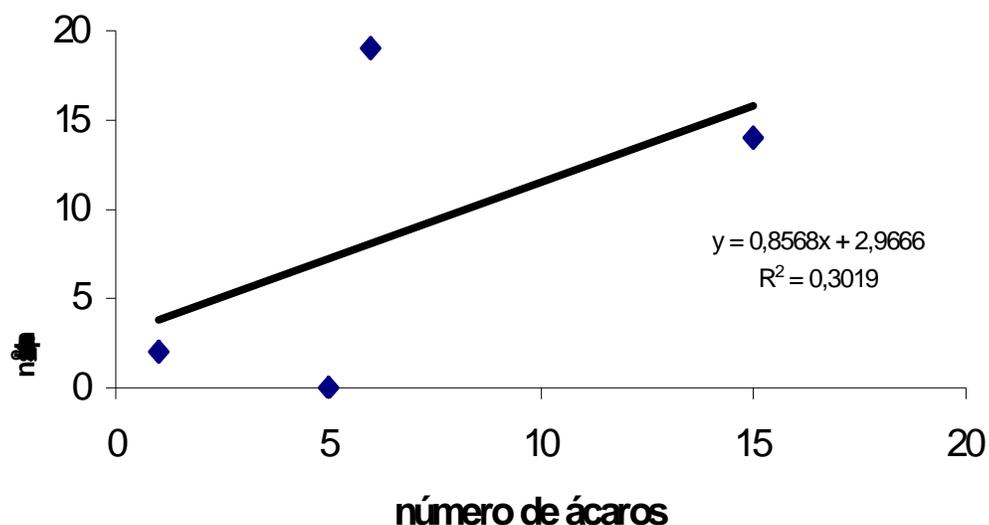


Figura 14. Relação entre a incidência de plantas de laranja com leprose e o número de *Brevipalpus phoenicis*.

4.2.5 Severidade de leprose

4.2.5.1 Severidade de leprose nas plantas de laranja diretamente infestadas

Aos 90 dias após a última infestação, todas as plantas de laranja centrais, diretamente infestadas, apresentaram avançado grau de severidade da doença, com desfolha intensa e morte de ramos (nota 5) (Figura 15).

A incidência (Figura 13) e a severidade de leprose (Figura 16) no tratamento lml foram semelhantes, pois apresentaram maior número de plantas com sintomas e maior grau de severidade. Por outro lado, os dados de incidência nos demais tratamentos foram muito próximos entre si, e a severidade foi distribuída em todas as notas.

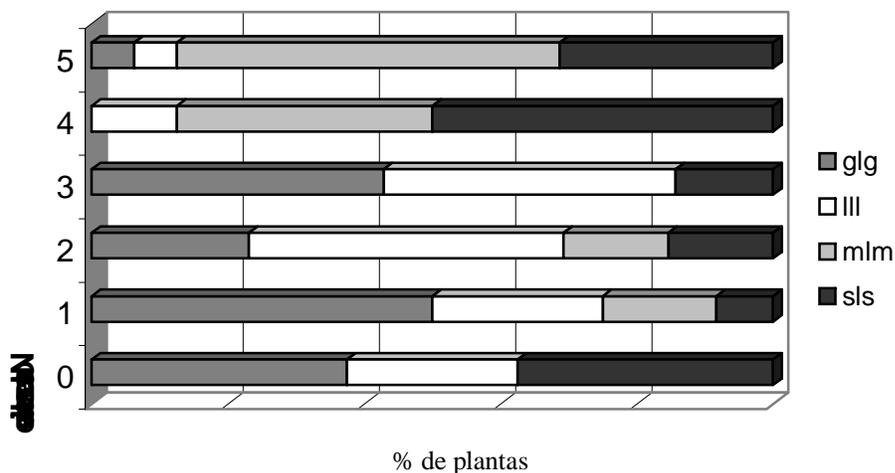


Figura 15. Severidade de leprose nas plantas de laranja infestadas com ácaros *Brevipalpus phoenicis* virulíferos, tendo, lateralmente, plantas de grevileas (glg), laranja (III), malvavisco (mlm) e sansão-de-campo (sls).

4.2.5.2 Severidade de leprose nas plantas de laranja não infestadas diretamente

Aos 90 dias após a última infestação, somente os tratamentos que constavam de plantas de laranja no centro da parcela (III), apresentaram lesões foliares e necrose nos ramos (nota 3), tendo sido a maior nota atribuída. O tratamento Igl, por outro lado, foi o que apresentou menor severidade da leprose nas plantas de laranja, tendo sido atribuído nota 1. Os demais tratamentos (Isl) e (Iml) apresentaram grau de severidade 2, por apresentarem plantas de laranja com lesões foliares e em ramos finos (Figura 16).

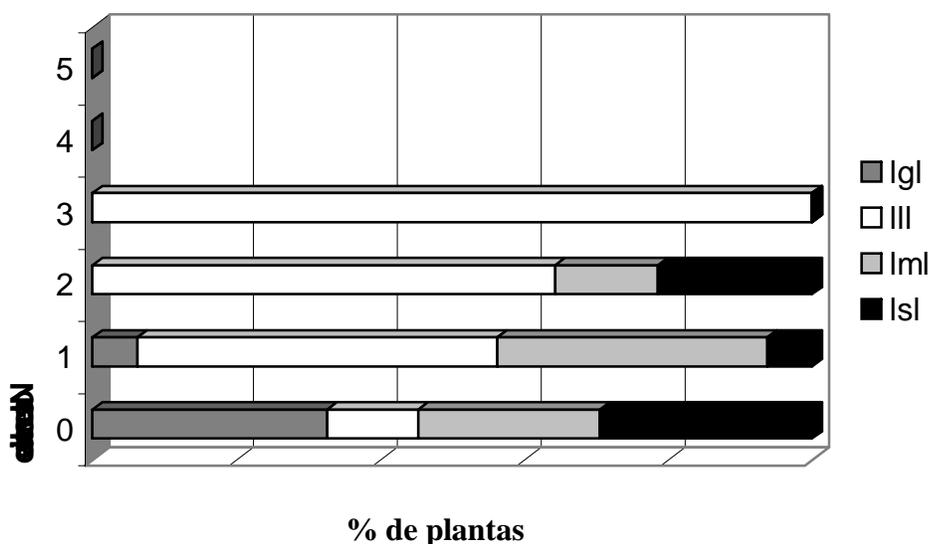


Figura 16. Severidade de leprose nas plantas de laranja plantadas ao lado de plantas de grevílea (Igl), laranja (III), malvavisco (Iml) e sansão-do-campo (Isl), 90 dias após serem infestadas artificialmente com *Brevipalpus phoenicis* virulíferos.

Após 180 dias da infestação, um maior número de tratamentos atingiram nota 3 (III, Iml e Isl), com exceção do tratamento Igl que continuou a apresentar somente nota 2 de severidade (Figura 17).

A ausência de sintomas esteve presente em todos os tratamentos e nas mesmas proporções apresentadas 90 dias após a infestação, indicando que o número de plantas infestadas não evoluiu, porém intensificou a gravidade dos sintomas das plantas, facilmente visualizada no tratamento Igl.

O tipo de tratamento parece influenciar na severidade dos sintomas apresentados nas laranjeiras, da mesma forma que a incidência, na seguinte ordem de severidade, do maior grau no tratamento III, seguido igualmente por Isl e Iml, e por Igl.

Apesar de as notas 4 e 5 não terem sido atribuídas a nenhum tratamento, acredita-se que a evolução dos sintomas prossiga para o aumento da gravidade desses sintomas (Figura 17).

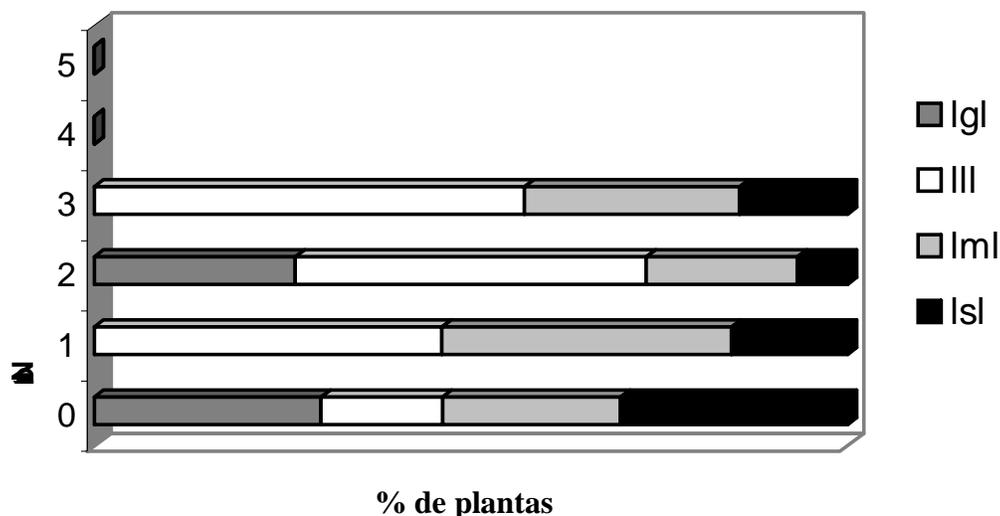


Figura 17. Severidade de leprose nas laranjeiras plantadas ao lado de plantas de grevilea (Igl), laranja (III), malvavisco (Iml) e sansão-do-campo (Isl), 180 dias após serem infestadas artificialmente com *Brevipalpus phoenicis* virulíferos.

Das espécies estudadas, malvavisco é considerada a planta que oferece maior risco ao pomar cítrico por apresentar como fonte de inóculo o vírus da leprose e mostrar-se muito favorável ao desenvolvimento populacional do ácaro, tal como a laranja Pêra. As laranjeiras plantadas ao lado de plantas de malvavisco infestadas com ácaros virulíferos apresentaram incidência de leprose similares aos níveis de incidência das plantas de laranja plantadas ao lado de laranjeiras infestadas com ácaros virulíferas.

Por outro lado, as plantas de grevilea e sansão-do-campo não mostraram o mesmo risco para o pomar cítrico, pois foram menos favoráveis ao ácaro, e a disseminação do vírus foi menor.

Os quebra-ventos são muito utilizados em pomares cítricos, principalmente para reduzir a disseminação de ácaros (GRAVENA, 1991), uma vez que estes têm mecanismos de disseminação limitados em comparação aos insetos, todavia a escolha da planta a ser utilizada como quebra-ventos deve recair naquela que não seja hospedeira do *B. phoenicis* (ULIAN & OLIVEIRA, 2002).

Dentre as cercas-vivas estudadas, o malvavisco é a que oferece maior risco, bem como a trapoeraba como planta infestante, motivo pelo qual elas devem ser evitadas nos pomares com o intuito de diminuir o risco de incidência de leprose.

IV CONCLUSÕES

1. O vírus da leprose dos citros (CiLV-C) é capaz de infectar *Bixa orellana* (urucum), *Commelina benghalensis*, *Citrus sinensis* (laranjeira Natal), *Grevilea robusta* (grevílea), *Hibisco rosa-sinensis* (hibisco) e *Malvavisco arboreus* (malvavisco).
2. *B. phoenicis* é capaz de transmitir CiLV-C de hibisco; malvavisco; grevílea;; urucum; e trapoeraba para os citros e vice-versa.
3. A técnica de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi a mais sensível dentre as estudadas (visualização de sintomas, a microscopia eletrônica de transmissão e RT-PCR) para a detecção do vírus da leprose.
4. Os sintomas atribuídos à leprose em *H. rosa-sinensis* caracterizam-se por apresentarem manchas circulares cloróticas e necróticas nas folhas; em *M. arboreus*, pontuações verdes em folhas senescentes; em *C. benghalensis*, manchas verdes em tecidos senescentes; em *B. orellana* e *G. robusta* não foram bem definidos.
5. O ácaro da leprose *B. phoenicis* coloniza com a mesma eficiência plantas de laranja e *M. arboreus*.
6. Laranjeiras plantadas próximas a plantas de laranja ou de malvavisco infestadas com ácaros virulíferos apresentam incidência similar de leprose, sugerindo que a transmissão do CiLV-C de malvavisco para laranjeira seja tão eficiente quanto de laranjeira para laranjeira

VI REFÊRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRECITRUS. **A história da laranja** Disponível em <www.abecitrus.com.br>
Acesso: 20, nov. 2007

AGRIANUAL, 2006: anuário de agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2006. p. 241-268.

ALBUQUERQUE, F. A. de; OLIVEIRA C. A. L. de; BARRETO, M. Comportamento do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari:Tenuipalpidae) em frutos de citros. In: OLIVEIRA, C. A. L. de; DONADIO, L. C. (Ed.). **Leprose dos citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p. 77-90.

ALVES, E. B. **Dinâmica da resistência de *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari:Tenuipalpidae) ao acaricida dicifol**. 2004. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ALVES, E. B.; CASARIS, N. F. B; OMOTO, C. Mecanismos de dispersão de *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari:Tenuipalpidae) em pomares cítricos **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n.1, p. 89-96, 2005

ARAYA GONZÁLES, J. **Informe sobre la prospección de la “leprosis de los cítricos” en la zona fronteriza sur (Costa Rica – Panamá)**. Costa Rica, Ministério de Agricultura y Ganadería, 2000, 5 p.

BASSANEZI, R. B.; SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T. Adeus a leprose. **Revista cultivar**, v. 10, n. 1, p. 37, 2002.

BASSANEZI, R. B.; LARANJEIRA, F. F. Spatial patterns of leprosis and its mite vector in commercial citrus groves in Brazil. **Plant Pathology**, Online Early, v. 56, n. 1, p. 97-106, 2006.

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W.; MACHADO, M. A. The citrus leprosis pathosystem. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 211-220, 2006a.

BASTIANEL, M.; OLIVEIRA, A. C.; CRISTOFANI, M.; GUERREIRO FILHO, O.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, V.; MONGE, G. A.; MACHADO, M. A. Inheritance and heritability of resistance to citrus leprosis. **Phytopatology**, Cordeirópolis, v. 96, n. 10, p. 1092-1096, 2006b.

BASTIANEL, M.; FREITAS-ASTÚA, J.; RODRIGUES, V.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; ARRIVABEM, F.; MACHADO, M. A. Resposta do tangor 'murcott' à inoculação do vírus da leprose dos citros em campo e em casa de vegetação. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 25, n. 2, p. 337-348, 2004.

BITANCOURT, A. A. A leprose e a próxima colheita. **O Biológico**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 37-40, 1937.

BITANCOURT, A. A. A leprose dos Citrus. **O Biológico**, São Paulo, v. 6, n.1, p. 39-45, 1955a.

BITANCOURT, A. A. Estudos sobre a leprose dos citros. I- Distribuição geográfica e sintomatologia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 161-184, 1955b.

BITANCOURT, A. A. Estudos sobre a leprose dos citros. III- Transmissão natural às folhas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 205-218, 1955c.

BOARETO, 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**, v. 21, n. 2, p.245-253, 1993.

BORGES, R. de S.; ALMEIDA, F. J. Câmbios en la producción de plantones cítricos em Brasil. **Todo Citrus**, Barcelona, v. 3, n. 8, p. 5-12, 2000.

CHAGAS, C. M. ; ROSSETTI, V. Transmissão experimental da leprose dos citros por meio de implantação de tecido foliar no caule. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 5, n. 2, p. 392, 1980

CHAGAS, C. M.; ROSSETI, V.; CHIAVEGATO, L. G. Influence of the biological cycle of *Brevipalpus phoenicis* Geijskes on leprosis transmission. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 9, 1983, Riverside. **Annals...**, Riverside. IOCV, 1983. p. 69.

CHIAVEGATO, L. G. Biologia de *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n.8, p. 813-816, 1986.

CHIAVEGATO, L. G. Aspectos biológicos e transmissão de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 17, n. 1, p. 229-235, 1996.

CHIAVEGATO, L. G.; KHARFAN, P. R. Comportamento do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citrus. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 355-359, 1993.

CHIAVEGATO, L. G.; MISCHAN, M. M. Comportamento do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari:Tenuipalpidae) em frutos de diferentes variedades cítricas. **Científica**, São Paulo, v. 15, n. 1-2, p. 17-22, 1987.

CHIGIRA, A.; MIURA, K. Detection of '*Candidatus Cardinium*' bacteria from the haploid host *Brevipalpus californicus* (Acari:Tenuipalpidae) and effects on the host. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 37, n. 1-2, p. 107-116, 2005.

CHILDERS, C. C.; FRENCH, J. V.; RODRIGUES, J. C. V. *Brevipalpus californicus*, *B. obovatus*, *B. phoenicis* and *B. lewisi* (Acari:Tenuipalpidae): a review of their biology, feeding injury and economic importance. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-3, p. 5-28, 2003a.

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**, Dordrecht, v. 30, n. 1-3, p. 29-105, 2003b.

COLARICIO, A.; LOVISOLO, O.; CHAGAS, C. M.; GALLETI, S. R.; ROSSETI, V.; KITAJIMA, E. W. Mechanical transmission and ultrastructural aspects of citrus leprosis disease. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 208-213, 1995.

COLARICCIO, A.; LOVISOLO, O.; BOCCARDO, G.; CHAGAS, C. M.; ALQUILO, M.; ROSSETTI, V. Preliminary purification and double stranded RNA analysis of *citrus leprosis virus*. In: CONFERENCE IOCV, 14th, 2000, IOCV, Riverside, C. A., **Proceedings...**, p. 159-163.

DOI, Y.; CHANG, M. U.; YORA, K. Orchid fleck virus. **Description of plant viruses**, CMI/AAB, Kew; v. 183. p. 1-3, 1977.

DOMINGUEZ, F. S.; BERNAL, A.; CHILDERS, C. C.; KITAJIMA, E. W. First report of citrus leprosis on Panama. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 85, n. 2, p. 228, 2001.

DONADIO, L. C.; LEITÃO FILHO, H. F.; ARANHA, C.; FIGUEIREDO, J. O. de. **Plantas infestantes de pomares cítricos no Estado de São Paulo**, Campinas: Instituto Agrônômico, 1976. 44 p. (Boletim Técnico,32).

DUNCAN, W. H. *Commelina benghalensis*, a species new to the United States. **Brittania**, New York, v. 19, n. 1, p. 282, 1967.

DURIGAN, G.; SIMÕES, J.W. Quebra-ventos de *Grevilea robusta* A. Cunn. – efeitos sobre a velocidade dos ventos, umidade do solo e produção do café. **IPEF**. v. 36, v. 1, p. 27-34, 1987.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 75-185, 1998.

FAWCETT, H. S. **Citrus Disease and their control**, 2. ed., New York, McGraw-Hill, 1936, 656p.

FERREIRA, P. T. O. **Caracterização de vírus baciliforme causadores de sintomas localizados em *Solanum violaefolium* transmitidos pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae) e estudos sobre possíveis relações com o vírus da leprose dos citros**. 2005. 85f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

GIBBS, A.; MACKENZIE, A. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, London, v. 63, n. 1-2, p. 9-16, 1997.

GRAVENA, S. Manejo ambiental de pragas dos citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 2, n. 1, p. 247-288,1991.

GROOT, T. V. M.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W. *Brevipalpus phoenicis* transmits Citrus leprosis virus, cytoplasmic type (CiLV-C) to common bean (*Phaseolus vulgaris*) under experimental conditions. In: XVII Encontro Nacional de Virologia, 2006, Campos do Jordão, SP. **Virus Reviews & Research**, 2006. v. 11, n. 1, p. 67-68.

HARAMOTO, F. H. **Biology and control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acarina: Tenuipalpidae)**. Hawaii: Agricultural Experimental Station, 1969. p. 1-63 (Technical Bulletin).

HELLE, W.; BOLLAND, H. R.; HEITMANS, W. R. B. Chromosomes and types of parthenogenesis in false spider mites (Acari: Tenuipalpidae). **Genetica**, New York, v. 54, n.1, p. 45-50, 1980.

HUANG, X.; MADAN, A. A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, New York, v. 9, n.9, p. 868-877, 1999.

KENNEDY, J. S.; IMPE, G. VAN; HANCE, T.; LEBRUN, P. Demecology of the false spider mite, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari, Tenuipalpidae). **Journal of Applied Entomology**, Amsterdam, v. 120, n. 8, p. 493-499, 1996.

KITAJIMA, E. W.; NOME, C. F. Microscopia eletrônica en virologia vegetal. In: do CAMPO, D.M; LENARDON, S. L. (Eds.). **Métodos para detectar patógenos sistêmicos**. Córdoba: INTA, 1999, p. 59-87.

KITAJIMA, E. W.; CHAGAS, C. M.; RODRIGUES, J. C. V. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and viruslike diseases: cytopathology and some recent cases. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-3, p. 135-160, 2003.

KITAJIMA, E. W. ; FERREIRA, P. T. O. ; FREITAS-ASTUA, J. ; MACHADO, M. A. Ocorrência da leprose dos citros do tipo nuclear (CiLV-N) nos municípios paulistas de Monte Alegre do Sul e Amparo. In: Congresso Paulista de Fitopatologia, 2004, Campinas, SP. **Summa Phytopathologica**. Botucatu, v. 30, n. 2, p. 68-68, 2004.

KITAJIMA, E. W.; MÜELLER, G. W.; COSTA, A. S.; YUKI, V. Short rodlike particles associated with citrus leprosis. **Virology**, New York, v. 50, n. 2, p. 254-258, 1972.

KITAJIMA, E. W.; ROSILLO, M. A; PORTILLO, M. M.; MÜLLER, G. W. & COSTA, A.S. Microscopia eletrônica de tecidos foliares de laranjeiras infectadas pela lepra explosiva da Argentina. **Fitopatologia**, Lima, v. 9, p. 55-56, 1974.

KITAJIMA, E. W.; NOVAES, Q. S; REZENDE, J. A. M.; MORAES, G. J. Short rhabdovirus-like particles and a caulimovirus in *Hibiscus rosa-sinensis* with green spot. In: SCANDEM, 51., 1999, Bergem, **Proceedings...1999**. Bergem. Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences, 1999, p. 63-64.

KITAJIMA, E. W.; MORAES, G. J; CALEGÁRIO, R. F.; SALAROLI, R. B. Detecção eletrono-microscópica de vírus transmitidos por *Brevipalpus* (Acari:Tenuipalpidae) nos tecidos do ácaro vetor. In: SIMPOSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 1., 2006, Viçosa. **Anais...**, Viçosa: UFV, 2006, p. 248.

KNORR, L. C. Studies on the etiology of leprosis in citrus. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF CITRUS VIROLOGISTS, 4., 1968, Gainesville. **Proceedings...**, Gainesville: IOCV, 1968. p. 332-341.

LAL, L. Biology of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Tenuipalpidae:Acarina). **Acarologia**, Paris, v. 20, n. 1, p. 97-101, 1978.

LEON, G A ; REALPE, C e ; GARZON, P A ; RODRIGUEZ, J A ; MORENO, M G ; CHILDERS, C C ; ACHOR, D. ; FREITAS-ASTÚA, J. ; ANTONIOLI-LUIZON, R. ; SALAROLI, S B ; COBO, N C M ; KITAJIMA, e W . Occurrence of citrus leprosis virus in Llanos Orientales, Colombia. **Plant Disease**, St Paul, v. 90, n. 5, p. 682-682, 2006.

LOCALI, E. C. **Seqüenciamento de regiões genômicas do vírus da leprose dos citros**. 2002. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2002.

LOCALI, E. C.; FREITAS-ASTÚA, J.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; BOARI, A. J.; MACHADO, M.A. Diagnose da mancha anular do cafeeiro através do RT-PCR. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, suplemento, p.185, 2005.

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 citrus production in the Americas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 1, p. 1317-1321, 2003.

LOCALI-FABRIS, E. C.; FREITAS-ASTÚA, J.; SOUZA, A. A; TAKITA, M. A.; ASTÚA-MONGE, G.; ANTONIOLI-LUIZON, R.; RODRIGUES, V.; TARGON, M. L. N.; MACHADO, M. A. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of citrus leprosis virus cytoplasmic type (CiLV-C). **Journal of General Virology**, London, v. 87, n. 1, p. 2721-2729, 2006.

MAIA, O. M. de **Transmissibilidade de leprose das cercas-vivas, quebra-ventos e plantas daninhas para citros através de *Brevipalpus phoenicis* (Geijkes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae)**, 2002, 73f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabá, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2002.

MAIA, O. M. de; OLIVEIRA, C. A. L. de. Comportamento do ácaro da leprose dos citros *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) em cercas-vivas, quebra-ventos e plantas invasoras. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 625-629, 2004.

MAIA, O. M. de; OLIVEIRA, C. A. L. de. Transmissibilidade do vírus da leprose de cercas-vivas, quebra-ventos e plantas invasoras para laranjeiras através de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes). **Brangantia**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 417-422, 2005.

MAIA, O. M. de; OLIVEIRA, C. A. L. de. Suscetibilidade de cercas-vivas, quebra-ventos e plantas invasoras ao vírus da leprose e sua transmissão para laranjeiras por *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acari:Tenuipalpidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 2, p. 209-213, 2006.

MARQUES, J. P. R.; FREITAS-ASTÚA, J.; KITAJIMA, E. W.; APPEZZATO-DAGLÓRIA, B. Lesões foliares e de ramos de laranjeira-doce causadas pela leprose dos-citros. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.42, n.11, p.1531-1536, nov. 2007

MARTINELLI, N. M.; OLIVEIRA C. A. L. de; PERECIN, D. Conhecimentos básicos para estudos que envolvam levantamentos da população do ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) na cultura dos citros. **Científica**, Jaboticabal, v. 4, n. 3, p. 242-253, 1976.

MURAYAMA, D.; AGRAWAL, H. O.; INOUE, T.; KIMURA, I.; SHIKATA, E.; TOMARU, K.; TSUCHIZAKI, T.; TRHARSO (Ed.). **Plant Viruses in Asia** Bulaskumur: Gadjah Mada University Press, 2000, 1263p.

MUSUMECI, M. R.; ROSSETI, V. Transmissão dos sintomas da leprose dos citros pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis*. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 15, n. 3, p. 228, 1963.

NAKANO, O.; SANCHES, G. A.; ISHIDA, A. Redução da infestação do ácaro da leprose *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) em citros através do controle da verrugose. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 8, n. 1, p.1 9-34, 1987.

NAGESHA CHANDRA, B. K. N. CHANNABASAVANNA, G. P. Biology of guava scarlet mite, *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae), In: International Congress of Acarology, 1974, **Proceedings...**, p. 167-176, 1974.

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 (CLV-C) através de RT-PCR em diferentes fases de desenvolvimento do ácaro vetor (*Brevipalpus phoenicis*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 1, p.183, 2005.

NUNES, M. A. **Constatação da transmissibilidade do vírus da leprose dos citros por *Brevipalpus phoenicis* (Geijkes, 1939) em cercas-vivas, quebra-ventos e plantas daninhas através de microscopia eletrônica de transmissão**, 2004, 46f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2004.

OCHOA, R.; AGUILAR, H.; VARGAS, C. Phytophagous mites of Central America: An illustrated guide, Teurrialba, **CATIE**. 1994, 234p.

OLIVEIRA, C. A. L. de. Flutuação populacional e medidas de controle do ácaro *Brevipalpus phoenicis* em citros. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 6, n.1, p. 1-32, 1986.

OLIVEIRA, C. A. L. de; SANTOS Jr., J. E.; SALA, I. **Ácaro da leprose dos citros: resultados de 104 ensaios de campo visando seu controle 1985-1990**. Jaboticabal. FUNEP. 1991. 56 p.

PASCON, R. C.; KITAJIMA, J. P.; BRETON, M. C.; ASUMPÇÃO, L.; GREGGIO, C.; ZANCA, A.; OKURA, V. K.; ALEGRIA, M. C.; CAMARGO, M. E.; SILVA, G. G. CARDOZO, J. C.; VALLIM, M. A.; RANÇO, S. F.; SILVA, V. H.; JORDÃO, J. R.; H., OLIVEIRA, F.; GIACHETTO, P. F.; FERRAZ, F.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; FRANCHISCINI, F. J. B.; SILVA, J. M. F.; ARRUDA, P.; FERRO, J. A.; REINACH, F.; SILVA, A. C. R. The complete nucleotide sequence and genomic organization of Citrus leprosis associated virus (CiLV). **Viral Gene**, Tel Aviv, v. 32, n.1, p. 289-298, 2006.

PATTARO, F. C. **Aspectos técnicos e econômicos da poda e do controle químico no manejo da leprose dos citros**. 2006. 140f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2006.

PINJNACKER, L. P.; FERWERDA, M. A.; HELLE, W. Citological investigations on the female and male reproductive system of the parthenogenetic privet mite *Brevipalpus obovatus* (Phytotipalpidae, Acari). **Acarologia**, Montpellier, v. 22, p. 157-163, 1981.

PINJNACKER, L. P.; FERWERDA, M. A.; BOLLAND, H. R.; HELLE, W. Haploid female parthenogenesis in the false spider mite *Brevipalpus obovatus* (Acari: Tenuipalpidae). **Genetica**. New York, v. 51, p. 221-214, 1980.

PITELLI, R. A. DURIGAN, J. C. Manejo de plantas daninhas e controle do ácaro da leprose. In: OLIVEIRA, C. A. L. de; DONADIO, L. C. (Ed.) **Leprose dos citros**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. p. 171-178.

RIBASKI, J.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, V. R.; DRUMOND, M. A. **Sabiá (*Mimosa cesaelpinaefolia*) árvore de múltiplo uso no Brasil**. EMBRAPA, 2003 4p. (Comunicado Técnico, 104).

RODRIGUES, J. C. V. **Leptose dos citros: cito-patologia, transmissibilidade e relação com o vetor *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae)**. 1995. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo Piracicaba, Piracicaba, 1995.

RODRIGUES, J. C. V. **Relações patógeno-vetor-plantas no sistema leptose dos citros**, 2000. 168f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

RODRIGUES, J.C.V. Programa de redução do inóculo da leptose dos citros. **Laranja**. Cordeirópolis, v.23, n. 2, p.321-332, 2002.

RODRIGUES, J. C. V.; LOCALI, E. C.; FREITAS-ASTUA, J.; KITAJIMA, E. W. Transmissibility of *Citrus leprosis virus* by *Brevipalpus phoenicis* to *Solanum violaeifolium*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, p.911, 2005.

RODRIGUES, J.C.V.; MACHADO, M.A. Virus-*Brevipalpus*-plant relationship of the citrus pathosystem. In: International Society of Citriculture, 9., 2000. **Proceedings...** p.768-770.

RODRIGUES, J. C. V.; MACHADO, M. A.; KITAJIMA, E. W.; MULLER, G. W. Transmission of citrus leprosis virus to mandarins by *Brevipalpus phoenicis* (Acari:Tenuipalpidae). **Proc. Conf. Int. Org. Citrus Virol.** v. 14, p. 174-178, 2000.

RODRIGUES, J. C. V.; NOGUEIRA, N. L.; FREITAS, D. S.; PRATES, H. Virus-like particles associated with *Brevipalpus phoenicis* Geijskes (Acari: Tenuipalpidae), vector of citrus leprosis virus. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 391-395, 1997.

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**. Amsterdam, v. 30, n. 1-3, p. 161–179, 2003b.

ROESSING, C.; SALIBRE, A. A. Incidência da leprose em variedades cítricas. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 19, p. 303, 1967.

SANTOS, A. J. dos; LEAL, A. C.; GARCIA, L. R.; CARMO, A. P. C. do. Viabilidade econômica do sistema agroflorestal grevílea x café na região norte do Paraná. **Cerne**, v. 6, n.1, p. 89-100, 2000.

SILVA, M. Z. da. **Potencialidade do *Neoseiulus californicus* (McGregor) (Acari:Phytoseiidae) na predação de ácaros fitófagos na cultura dos citros no Estado de São Paulo**. 2005. 90f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Entomologia Agrícola Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2005.

SPEGAZZINI, C. Sobre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de “agrios” en el Paraguay. **Annales de la Sociedad Científica Argentina**, Buenos Aires, v. 90, n. 1, p. 155-188, 1920.

TRINDADE, M. L. B. **Caracterização biológica dos ácaros, *Brevipalpus obovatus* (Donnadieu, 1875), *B. californicus* (Banks, 1904) e *B. phoenicis* (Geijkes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae no Estado de São Paulo** 1990, 108f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1990.

TRINDADE, M. L. B.;CHIAVEGATO, L. G. Colonização por *Brevipalpus obovatus* Donnadieu, 1875, *Brevipalpus californicus* (Banks, 1904) e *Brevipalpus phoenicis*

(Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em variedades cítricas. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 11, n. 1, p. 227-240, 1990.

TRINDADE, M.L.B. ; CHIAVEGATO, L.G. Caracterização biológica dos ácaros *Brevipalpus obovatus* Donnadieu, 1875, *Brevipalpus californicus* (Banks, 1904) e *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 189-195, 1994.

ULIAN L. F.; OLIVEIRA, C. A. L. de. Proteção integrada. **Revista da Fundecitrus**, Araraquara, v.105, n. 1, p.12, 2001.

ULIAN L. F.; OLIVEIRA, C. A. L. de. Comportamento do ácaro da leprose dos citros em diferentes cercas-vivas e quebra-ventos utilizados em pomares cítricos na região de Bebedouro-SP. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 77, n. 1, p. 103-111, 2002.

VALVERDE, R. A.; NAMETH, S. T.; JORDAN, R. L. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnostic. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 74, n. 3, p. 255-258, 1990.

VERGANI, A. R. **Transmission y naturaleza de la “lepra explosiva” del naranjo**. Buenos Aires: Instituto de Sanidad Vegetal. 1945. 11p.

WEEKS, A.; MAREK, F.; BREEUWE, J. A. J. A mite species that consists entirely of haploid females. **Science**, Washington, v. 292, p. 2479-2482, 2001.

WELBORN, W. C.; OCHOA, R.; KANE, E. C.; ERBE, E. F. Morphological observations on *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) including comparisons with *B. californicus* and *B. obovatus*. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 30, n. 1-3, p. 107-133, 2003.

WILSON, A. K. Commelinacea – A review of the distribution biology and control the important weeds belonging to this family. **Tropical Pest Management**. Oxford, v. 27, n. 3, p. 405-418. 1981.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)