



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

**DESENVOLVIMENTO EMBRIOLÓGICO DE *Brevipalpus phoenicis* (ACARI: TENUIPALPIDAE):
VETOR DA LEPROSE DOS CITROS**

Thaís Elise **Sinico**¹; Maria Andréia **Nunes**²; Alex Junior **Soares**³; Valdenice Moreira **Novelli**⁴

Nº 14159

RESUMO – Ácaros do gênero *Brevipalpus* são de extrema importância econômica, devido ao fato de serem vetores de vírus de plantas. Dentro do gênero, destaca-se o ácaro *Brevipalpus phoenicis*, vetor do vírus *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), causador da leprose dos citros. Apesar de ser um vetor cosmopolita, a doença está restrita a América do Sul e Central e acarreta altos prejuízos ao agronegócio, em particular à citricultura paulista. Anualmente são investidos milhões de dólares no controle do vetor com uso de acaricidas; no entanto, há a constante preocupação de ocorrência de resistência nas populações de ácaros, devido ao seu uso intensivo, além dos danos ambientais. Atualmente, diversos trabalhos investigam o vetor do CiLV-C e o patossistema leprose como um todo; porém, estudos sobre sua embriologia e aspectos biológicos ainda são escassos. Sendo assim, este estudo teve como objetivo a caracterização do desenvolvimento embriológico do ácaro *B. phoenicis*, utilizando técnicas de microscopia de luz, o qual poderá contribuir para maior detalhamento acerca da biologia desse vetor e sua interação ao patossistema leprose.

Palavras-chave: ácaros fitófagos, CiLV-C, embriologia, vetores.

1 Autor, Bolsista FAPESP: Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, UFSCAR/CCA, Araras-SP; thais_sinico@hotmail.com

2 Colaborador, Pós-Doutoranda Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” – IAC, Cordeirópolis-SP.

3 Colaborador, Bolsista FAPESP: Graduação em Ciências Biológicas, FHO Uniararas, Araras-SP.

4 Orientador: Pesquisadora Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” – IAC, Cordeirópolis-SP; valdenice@centrodecitricultura.br



ABSTRACT- *Brevipalpus* mites have economic importance due to the fact that they are vectors of plant viruses. Within the genus, *Brevipalpus phoenicis* is vector of the Citrus leprosis virus C (CiLV-C), which causes citrus leprosis disease. Despite being a cosmopolitan vector, the disease is restricted to South and Central America and causes high losses to agribusiness, particularly the São Paulo state. Annually are invested millions of dollars in the vector control using acaricide; however, there is the constant worry of occurrence of resistance in populations of mites, due to their intensive use, and environmental damage. Currently, several studies investigating the vector CiLV-C and the pathosystem; but, studies of their embryology and biological aspects are still scarce. Thus, this study aimed to characterize the embryological development of *B. phoenicis* using light microscopy techniques, which may contribute to greater detail about the biology of this vector and its interaction to leprosis pathosystem.

Key-words: phytophagous mites, CiLV-C, embryology, vectors.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *B. phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) é praga em diversas culturas de importância econômica, como citros, mamão, maracujá, café, e plantas ornamentais; possui ampla distribuição geográfica, em regiões tropicais e subtropicais; e hábito fitófago e polífago (RODRIGUES & CHILDERS, 2013).

B. phoenicis possui o corpo achatado dorso-ventralmente, coloração avermelhada, quatro pares de pernas, como todos os membros da Classe Arachnida, e apresenta quatro estágios após a fase de ovo: larva, protoninfa, deutoninfa, e adulto, sendo que, dependendo das condições climáticas, o ciclo biológico completo de ovo a adulto pode variar de 14-40 dias (CHIAVEGATO, 1996). A temperatura também influencia em seu ciclo de vida e na oviposição, sendo que, em temperaturas baixas, o ciclo é mais longo e há menor postura. As fêmeas de *B. phoenicis* preferem locais protegidos, os quais servem de abrigo, por exemplo, depositando seus ovos em lesões de verrugose, comumente encontradas em frutos de citros.

Essa espécie possui algumas interessantes peculiaridades, como a feminilização, causada pela associação simbiótica com uma bactéria do gênero *Cardinium*. Os machos são raros na população e, experimentalmente, são possíveis de serem obtidos após tratamento com antibióticos, como por exemplo, com tetraciclina (GROOT & BREEUWER, 2006). Todavia, os machos não têm uma função conhecida, pois embora ocorra a cópula, aparentemente não há a fecundação das fêmeas e a formação de embriões. Outra peculiaridade é a presença de somente dois cromossomos não homólogos e o estado de haploidia (n) da espécie, única no mundo animal.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Sua reprodução ocorre por partenogênese, sendo do tipo telítoca, ou seja, os ovos não fertilizados geram somente fêmeas haplóides (WEEKS, 2001).

O ácaro *B. phoenicis* tem grande destaque, por ser vetor do vírus *Citrus leprosis virus C* (CiLV-C), gênero *Cilevirus*, causador da leprose do citros (BASTIANEL et al., 2010; LOCALI-FABRIS et al., 2012). A aquisição do vírus pelo ácaro ocorre durante a alimentação em tecidos vegetais que já foram infectados anteriormente. Uma vez infectivo, o ácaro torna-se vetor da doença por toda sua vida, mas diversos estudos comprovaram que o vírus não é transmitido para as gerações futuras, ou seja, não ocorre passagem transovariana (BOARETTO et al., 1993; CHIAVEGATTO, 1996; NOVELLI et al., 2005).

O controle da doença é basicamente feito com aplicações de acaricidas, sendo que, dos US\$ 90 milhões gastos em acaricidas no Brasil, US\$ 75 milhões são para o controle do ácaro vetor da leprose (FUKUDA et al., 2012). Porém, devido aos problemas que podem surgir com a aplicação constante desses produtos químicos, como populações resistentes a essas substâncias, problemas ao meio ambiente e o elevado custo, tem se buscado formas alternativas de controle como, por exemplo, a poda (BASTIANEL et al., 2006; BASTIANEL et al., 2010).

Apesar das recentes informações e avanços obtidos através dos resultados de diversos trabalhos envolvendo o ácaro *B. phoenicis*: sua interação com o vírus CiLV-C, a bactéria simbiote, manejo e controle da leprose e outros, são poucos os estudos básicos sobre a biologia, genética e o desenvolvimento embrionário desse importante vetor.

Em geral os ovos de ácaros aderem facilmente às superfícies, mas a remoção destes em geral resulta no rompimento desses ovos. Além de serem impermeáveis a fixadores aquosos (LAUMANN, 2010), a coloração alaranjada dos ovos de *B. phoenicis* impossibilita a visualização de seu interior por microscopia de luz, a qual só é possível com a utilização do meio de Hoyer (HARAMOTO, 1969).

Não há pesquisas embriológicas sobre a espécie *B. phoenicis*, mas estudos realizados com outras espécies de ácaros descreveram uma clivagem do tipo interlecito (superficial). Esses estudos foram impossibilitados devido ao tamanho diminuto de seus embriões, mas o avanço das técnicas de microscopia pode superar essas dificuldades (THOMAS & TELFORD, 1999; LAUMANN, 2010) e fornecer informações adequadas para melhor entendimento sobre a espécie, seu desenvolvimento e relação com o patossistema leprose dos citros.



2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico: manutenção e obtenção de ovos de *B. phoenicis*

Foram utilizadas populações isolinhas de ácaros *B. phoenicis*, mantidas no laboratório de Acarologia, do Centro de Citricultura “Sylvio Moreira” – IAC, em sala climatizada com controle de temperatura (25°C +/- 5°C) e umidade (70% a 80%). A manutenção dessas populações foi realizada em frutos de laranja doce previamente preparados: lavados com água corrente, secos e parcialmente cobertos com parafina, tendo uma área isolada com cola entomológica, a qual foi pincelada com uma mistura de farinha, trigo e gesso para facilitar a oviposição.

Para obtenção dos ovos, as fêmeas isolinhas foram transferidas dos frutos para arenas de criação, as quais foram montadas em placas de Petri contendo folhas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* DC), com as bordas isoladas por algodão umedecido com água destilada, para evitar a fuga dos ácaros. Essa etapa foi realizada seis vezes, sendo que em cada etapa foram montadas seis placas contendo cada uma 50 ácaros fêmeas.

2.2 Estudo embriológico em microscopia de luz (ML)

Os ovos foram coletados após uma hora de oviposição e montados em lâmina contendo uma gota de meio Hoyer. Para montagem de lâminas com ovos com mais de uma hora de oviposição foi realizada a coleta e transferência para uma tampa de microtubo, guardada em sala climatizada, até sua montagem em lâmina para observação em ML.

2.3 Protocolos para embriogênese

Para realizar um estudo mais aprofundado dos embriões de *B. phoenicis*, foi necessária a retirada da membrana coriônica dos ovos, pois estes são impermeáveis e de coloração avermelhada. Desse modo, foi realizado experimentos com dois protocolos diferentes.

2.3.1 Retirada da membrana coriônica e vitelínica com heptano

Os ovos foram coletados das placas e transferidos para um microtubo com duas aberturas opostas, cobertas com malha de 200 mesh. Esse microtubo foi colocado dentro de um pequeno suporte de vidro e adicionado 10 mL de hipoclorito 50% para lavagem, por cinco minutos, sob agitação constante. Após, todo o hipoclorito foi retirado e, os ovos, foram lavados com água destilada, rapidamente por três vezes. Em seguida, o microtubo foi transferido para outro suporte



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014 12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

de vidro, e foi adicionado 10 mL de heptano 100% acrescido de fixador paraformaldeído (PFA) 4%, permanecendo nesta solução por 20 minutos, sob agitação constante. A solução foi retirada e, após, adicionado 10 mL de metanol 100%. O processo foi mantido sob agitação constante, por 20 minutos e, após, armazenado sob refrigeração até a montagem das lâminas. Este protocolo foi uma adaptação da metodologia de Telford e Thomas (1999).

2.3.2 Retirada dos envoltórios dos ovos com Carnoy

Os ovos foram coletados e transferidos na mesma forma que o protocolo anterior, sendo que o microtubo foi colocado em um suporte de vidro e adicionado 10 mL de Carnoy (ácido acético: clorofórmio: álcool 100%) para fixação dos ovos, por 30 minutos. Após, a solução Carnoy foi retirada e os ovos foram lavados em álcool 90%, duas vezes por 10 minutos. O microtubo foi transferido para outro suporte de vidro e mantido em 10 mL de solução tampão fosfato 0,1M pH 7,4. O protocolo utilizado foi uma adaptação da técnica usada por Okada (2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo embriológico em microscopia de luz (ML)

A montagem das lâminas para estudo em microscopia de luz foi feita utilizando meio Hoyer, o qual descoloriu o córion e facilitou as observações em contraste de fase.

Através da ML, foi possível observar eventos distintos da formação do embrião de *B. phoenicis*. Em um período entre zero e 18 horas pós-oviposição, foi observada a centralização do núcleo (Figura 1A), a primeira divisão mitótica, onde o núcleo se dividiu em dois blastômeros (Figura 1B e C), e as demais clivagens até a formação das blastoderme (Figura 1D e E). Ao completar 24 horas pós-oviposição, as células migraram para a periferia do ovo (Figura 1F), se aglomerando. A formação do corpo primitivo do ácaro inicia-se a partir do quarto dia (Figura 1G), sendo possível observar a formação dos apêndices. A formação dos ocelos foi observada no sexto dia (Figura 1H) e, com mais clareza no sétimo dia (Figura 1I).

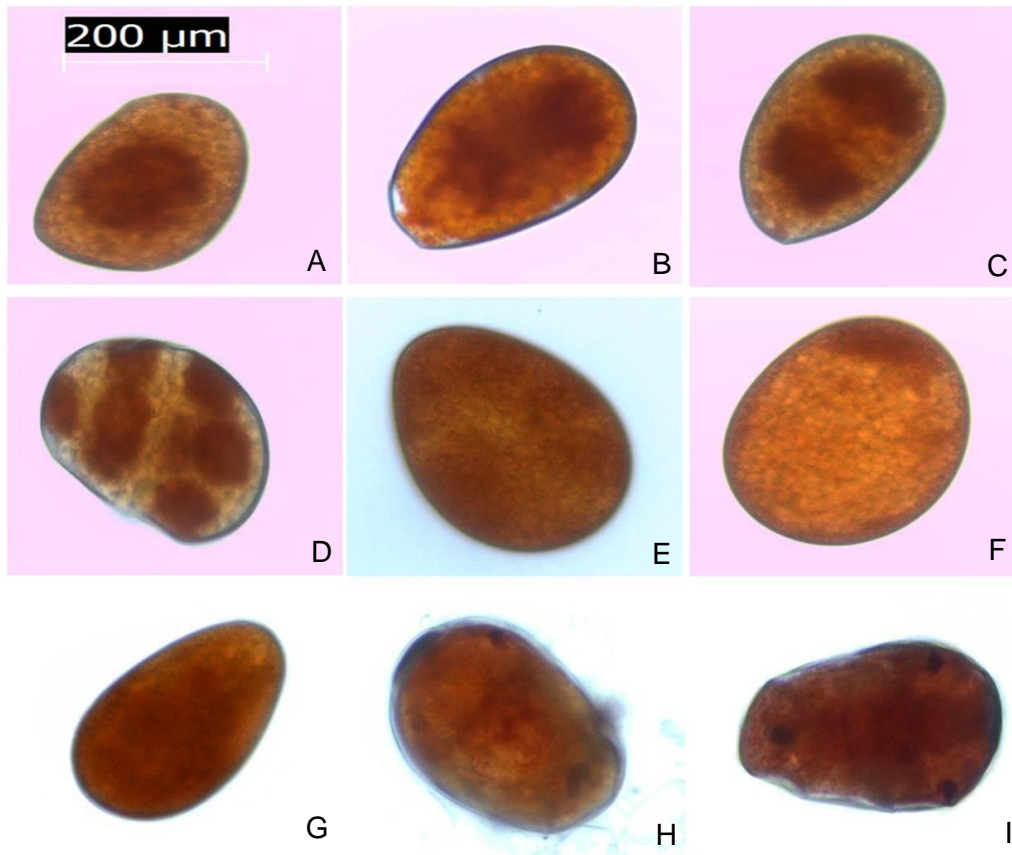


Figura 1. Caracterização do desenvolvimento embrionário de *B. phoenicis*. Aumento de 400x.

3.2 Protocolos para embriogênese

3.2.1 Retirada da membrana coriônica e vitelínica com heptano

O procedimento danificou uma grande parte dos embriões utilizados, porém possibilitou a observação de embrião de *B. phoenicis* sem o córion (Figura 2).

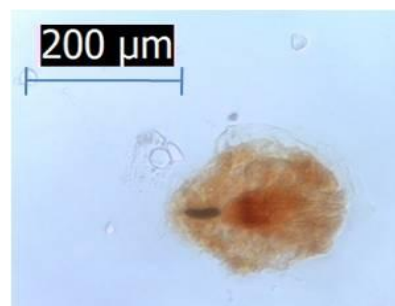


Figura 2. Embrião de *B. phoenicis*, sem membrana coriônica, visualizado em microscópio óptico (400x).

3.2.2 Retirada dos envoltórios dos ovos com Carnoy

A técnica com Carnoy foi menos eficiente para a retirada do córion, em comparação à técnica com heptano. Todavia, foi possível observar em maiores detalhes os ovos quando comparados aos ovos imersos em meio Hoyer (Figura 3).

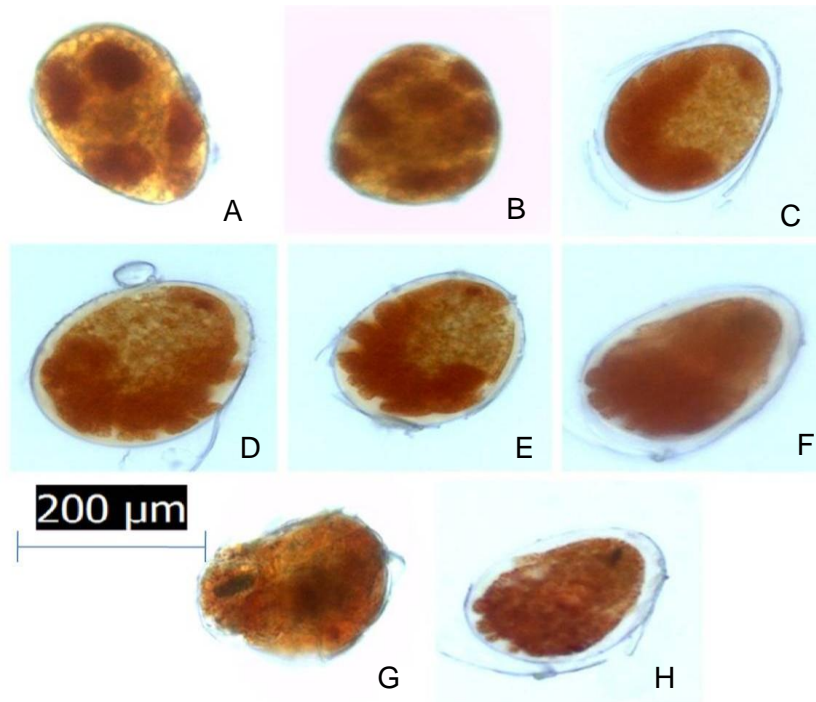


Figura 3. Ovos de *B. phoenicis* em tempos distintos, em diferentes estágios de desenvolvimento de seus embriões: clivagens (A e B), primórdio do idiossoma (C), morfogênese (D e E), estágios pré-emergentes (F-H).

4 CONCLUSÃO

Foi possível descrever as etapas do desenvolvimento embriológico de *B. phoenicis* e relacioná-las ao seu respectivo período pós-oviposição, como a centralização do núcleo após uma hora de oviposição e, ao completar duas horas têm-se o início da primeira divisão mitótica, separando-se em duas células, os blastômeros. Em seguida, a ocorrência de sucessivas divisões, até a formação da blastoderme. Com os protocolos, foi possível a visualização mais detalhada de estruturas do embrião, observando o primórdio do idiossoma, sendo que, através de lâminas com hoyer, foi observado que a formação do corpo primitivo se inicia a partir do quarto dia pós-oviposição.

5 AGRADECIMENTOS

A FAPESP pela bolsa concedida (Processo n. 2013/07369-0) e ao CNPq pela oportunidade.



8º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2014
12 a 14 de agosto de 2014 – Campinas, São Paulo

Ao Centro APTA Citros “Sylvio Moreira” – IAC pela oportunidade de estágio.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTIANEL, M; FREITAS-ASTÚA, J; KITAJIMA, E.W; MACHADO, M.A. **The citrus leprosis pathosystem.** Summa Phytopathologica 32(3): 211-220, 2006.

BASTIANEL, M; NOVELLI, V.M; KITAJIMA, E.W; KUBO, K.S; BASSANEZI, R.B; MACHADO, M.A. & FREITAS-ASTÚA, J. **Citrus Leprosis: Centennial of an unusual mite-virus pathosystem.** PlantDisease 94(3): 284-292, 2010.

BOARETTO, M.A.C; CHIAVEGATO, L.G & SILVA, C.A.D. **Transmissão da leprose através de fêmeas de *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) e de seus descendentes, em condições de laboratório.** Científica 21(2): 245-253, 1993.

CHIAVEGATO L.G. **Aspectos biológicos e transmissão de leprose pelo ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tenuipalpidae) em citros.** Laranja 17(1): 229-295, 1996.

FUKUDA, L.A; FRANCO, D; FACIO, S.L. & LIMA, R.S. **Balço fitossanitário de citros: O que mais pesa?** SFCitros – Simpósio sobre Fitossanidade em Citros, 3 de agosto de 2012. UNESP, Jaboticabal – SP. 60-61p. CDRoom.

GROOT, T.V.M. & BREEUWER, J.A.J. ***Cardinium* symbionts induce haploid thelytoky in most clones of three closely related *Brevipalpus* species.** Exp. Appl. Acarol. 39: 257-271, 2006.

HAMAROTO, F.H. **Biology and control of *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes) (Acarina: Tenuipalpidae).** Hawaii Agr. Exp. Sta, University of Hawaii, Tech. Bull, nº 68, 63 p., 1969.

LAUMANN, M; NORTON, R.A; HEETHOFF, M. **Acarine embryology: inconsistencies, artificial results and misinterpretations.** 82: 217-235, 2010.

LOCALI-FABRIS, E.C, FREITAS-ASTÚA, J, MACHADO, M.A. **Genus *Cilevirus*.** In: King AMQ, Adams MJ, Carstens EB LE, editor. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 9th ed. San Diego: Elsevier; 2012. p. 1139–1142.

NOVELLI, V.M; FREITAS-ASTÚA, J; ASTÚA-MONGE, G; CARVALHO, S.A; LOCALI, E.C; RODRIGUES, V; ARRIVABEM, F; HILF, M.E; GOTTWALD, T.R & MACHADO, M.A. **Detection of CLO (*Cytophaga-Like Organism*) endosymbionts in adults and eggs of citrus leprosis vectors, *B. phoenicis* and *B. obovatus*.** Summa Phytopathologica 31(Supl.): 65 (176), 2005.

OKADA, M.A. **Descrição morfológica do desenvolvimento embrionário da aranha marrom (*Loxosceles intermédia*).** 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RODRIGUES, J.C.V; CHILDERS, C.C. ***Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants.** Exp. Appl. Acarol. 59(1-2): 165-175, 2013.

THOMAS, R.H; TELFORD, M.J. **Appendage development in embryos of the oribatid mite *Archegozeles longisetosus* (Acare, Oribatei, Trhypochthoniidae).** Acta Zoologica, 80: 193-200, 1999.

WEEKS, A; MAREC, F; BREEUWER, J.A.J. **A mite species that consists entirely of haploid females.** Science. 292: 2479-2482, 2001.