



Foto: Michel Dollet

COMUNICADO
TÉCNICO

213

Aracaju, SE
Dezembro, 2018

Embrapa

Técnicas de amostragem para diagnose da murcha-de-phytomonas (hartrot) em coqueiro

Michel Dollet
Viviane Talamini
Leandro Eugenio Cardamone Diniz

Técnicas de amostragem para diagnose da murcha-de-*phytomonas* (hartrot) em coqueiro¹

¹ Biólogo, PhD em Biologia Molecular, pesquisador do CIRAD, Montpellier, França, pesquisador visitante especial CNPQ/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Engenheira Agrônoma, doutora em fitopatologia, pesquisadora da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE. Biólogo, doutorado em Genética e melhoramento, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

A murcha-de-*phytomonas*, também conhecida como “hartrot”, é uma doença letal que incide na cultura do coqueiro. Causada pelo protozoário flagelado *Phytophthora* sp., da família Trypanosomatidae, é transmitida por percevejos dos gêneros *Lincus* sp. e *Ochlerus* sp., família Pentatomidae (Figura 1) (Dollet, 1984; Dollet, 2001; Dollet et al. 2011; Dollet, 2016). No

Brasil, esta doença foi detectada nas regiões Norte e Nordeste onde o cultivo do coqueiro é predominante. Com a expansão da cultura para regiões não tradicionais como São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro, novos focos da murcha-de-*phytomonas* poderão ser detectados.

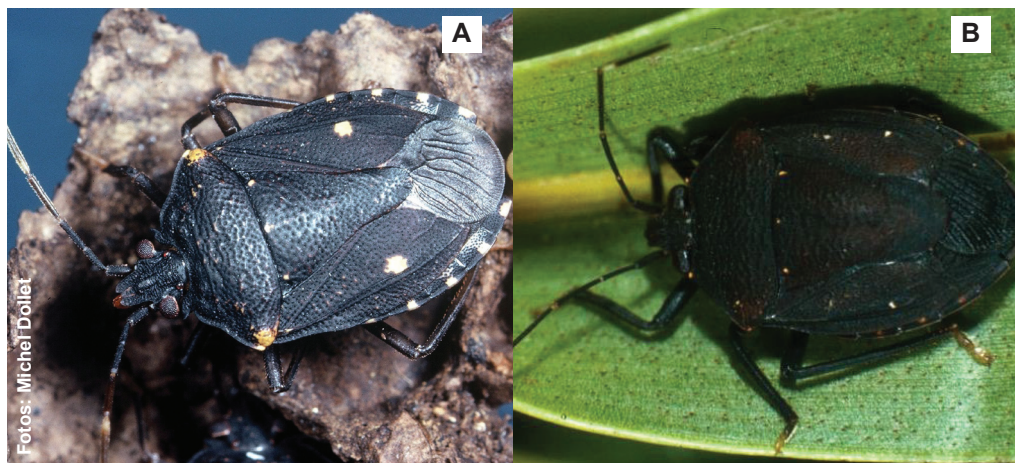


Figura 1. Percevejos do gênero *Lincus* (A) e *Ochlerus* (B), ambos da família Pentatomidae, insetos vetores da murcha-de-*phytomonas*.

Coqueirais em frutificação e em condições climáticas de alta umidade relativa (acima de 70%) podem apresentar como o primeiro sintoma da doença, a queda repentina dos frutos, seguida do amarelecimento e escurecimento das folhas inferiores da planta. Ao mesmo tempo se observa a necrose e o escurecimento da inflorescência da folha dez (recentemente aberta) bem como das espatas das folhas oito e nove. Em condições de umidade relativa abaixo de 70% o primeiro sintoma pode ser o amarelecimento e escurecimento das folhas com posterior queda dos frutos de forma mais lenta.

Nas variedades como o anão verde e o gigante do Pacífico, o escurecimento das folhas é bastante intenso, enquanto nas variedades anão amarelo e anão vermelho, geralmente, as folhas ficam em tons amarelados.

Os sintomas evoluem das folhas mais baixas até as mais altas, ocorrendo o escurecimento rápido (por volta de 4 a 6 semanas) e generalizado (Figuras 2A e 2B). Seguida da perda das folhas devido à quebra da ráquis, culminando com o apodrecimento do meristema apical e morte da planta.

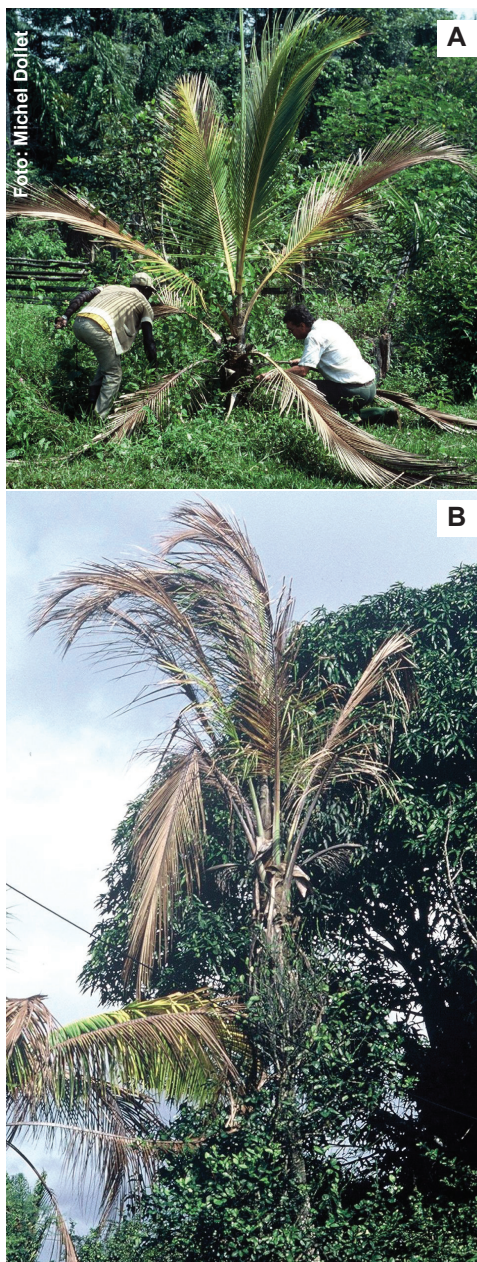


Figura 2. Sintomas da murcha-de-phytonomas em coqueiro jovem da variedade anão amarelo da Malásia (A); e em adulto de variedade gigante local da Guiana Francesa (B).

A murcha-de-*phytomonas* ocorre em plantas jovens, a partir de 2 anos de idade e também em plantas adultas. As primeiras plantas doentes geralmente estão localizadas na bordadura do coqueiral. A disseminação é rápida levando a perda quase total do plantio quando a população do inseto vetor é alta no plantio. Dessa forma, a detecção precoce da doença é fundamental para o seu manejo, pois plantas doentes devem ser eliminadas da propriedade com a máxima urgência para evitar o progresso da doença. O controle do inseto vetor também deve ser feito conforme instruções de profissional habilitado.

Os sintomas externos nas plantas infectadas podem ser confundidos com os de outras doenças como o amarelecimento letal e o anel vermelho e com deficiências nutricionais, sendo indispensável à visualização dos protozoários flagelados no floema para a diagnose da doença, principalmente em regiões onde a doença é pouco conhecida (Renard, 1989).

O objetivo desta publicação é apresentar, de forma prática, o passo a passo da coleta e envio de amostras a laboratórios para a detecção, por meio de análises microscópicas, do protozoário causador da murcha-de-*phytomonas* e assim possibilitar o diagnóstico preciso para essa doença. As metodologias para coleta de amostras são resultantes da experiência de vários anos de pesquisas relacionadas à murcha-de-*phytomonas* em coqueiros.

Metodologia 1

Amostragem das espatas/inflorescência

O protozoário causador da murcha-de-*phytomonas*, *Phytophthora* sp., pode ser visualizado na seiva da espata/inflorescência em microscópio ótico (Figura 3). Para tanto deve-se coletar a espata da folha nove ou de folhas mais jovens (oito e/ou sete e seis), no ponto de fixação desta ao estipe (caule) mantendo o pecíolo. Também é possível coletar para diagnóstico a inflorescência aberta, ou seja, a inflorescência da folha dez (Figura 4).

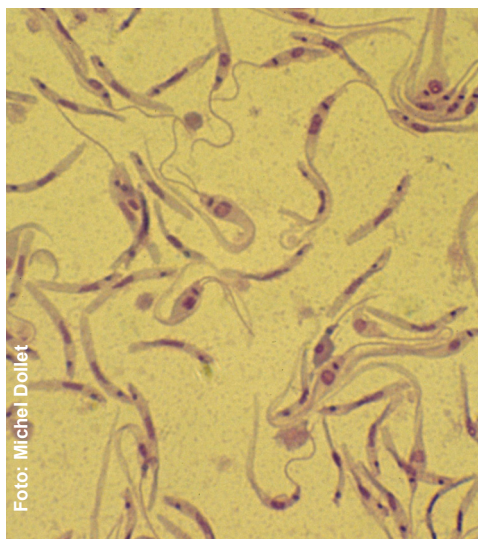


Foto: Michel Dollet

Figura 3. Visualização ao microscópio (400x) do protozoário flagelado *Phytophthora* sp. corado com Giemsa, na seiva extraída de coqueiro infectado.

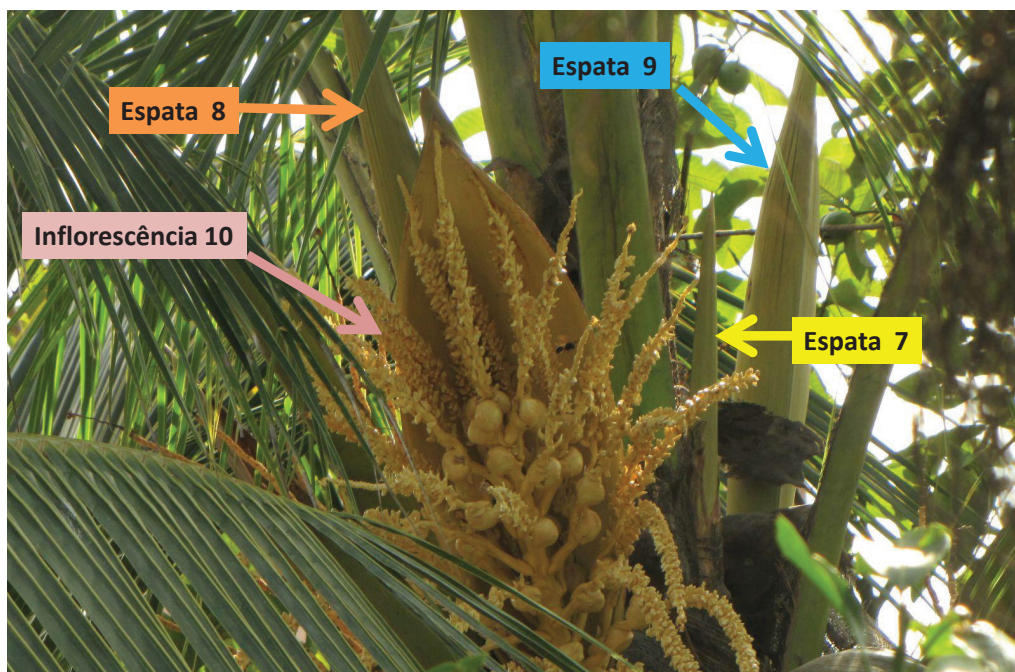


Figura 4. Espatas das folhas sete, oito e nove do coqueiro e a inflorescência da folha dez aberta recentemente.

Em plantas de porte baixo (até 3 m) é possível obter a inflorescência/espata sem eliminar a planta. Nesse caso, a precaução é remover as folhas mais velhas inseridas logo abaixo da espata até atingir a sua base ou ponto de fixação no caule como no exemplo demonstrado abaixo pela espata da folha nove (Figura 5A), para que essa seja retirada na íntegra (Figura 5B).



Figura 5. Espata da folha nove do coqueiro sendo possível sua visualização até a base após a remoção das folhas e cachos (A) e espata da folha nove retirada íntegra da planta do coqueiro (B).

Evite coletar as espatas se o pecíolo estiver danificado, com necrose, ou seja, com manchas de coloração marrom. O pecíolo deve estar íntegro e com a coloração creme (Figura 6).

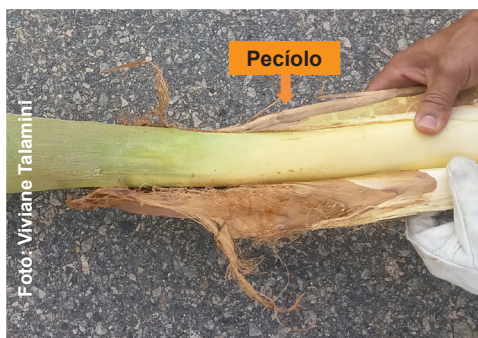


Figura 6. Espata da folha nove do coqueiro e com pecíolo de coloração normal ideal para amostragem.

No caso de coqueiro com altura superior a 3 m, o acesso às inflorescências é mais difícil. Nesse caso, na ausência de escadas seguras ou plataformas que permitam acesso às espatas, a planta deverá ser cortada para amostragem. Uma vez a copa da planta estando no solo, deve-se proceder ao corte das folhas a dois terços do seu comprimento para detectar a base das espatas; e, em seguida, o corte do caule no nível das folhas baixas/intermediárias. Retire as folhas uma a uma; das folhas mais baixas (velhas) para as mais novas, tendo o cuidado de cortá-las na sua base (no nível em que estão presas no caule). Quando chegar ao nível da folha nove, cortar o pecíolo no seu ponto de fixação ao tronco. Assim, será possível a remoção da inflorescência inteira conforme demonstrado anteriormente.

Se não for possível enviar para análise a inflorescência inteira, devido ao seu volume, cortar com um facão limpo (desinfetado com produto antimicrobiano como hipoclorito de sódio a 2% e, posteriormente, enxaguado com água limpa) o pecíolo localizado no primeiro terço desta, ou seja, na base da inflorescência que está inserida na planta (Figura 7). Imediatamente após o corte, envolver o fragmento com papel filme ou papel alumínio (Figura 8A) e embalar com um saco plástico (Figura 8B) e etiquetar a amostra antes do envio. Recomenda-se armazenar a amostra em temperatura inferior a 25 °C caso a análise seja feita em até 12 horas. Se o período de envio da amostra para o laboratório for superior a 12 horas, recomenda-se mantê-la entre 8 °C e 10 °C. É importante ressaltar que as amostras nunca deverão ser congeladas.



Figura 7. Corte da espata para retirada da porção do pecíolo a aproximadamente um terço da espata para ser enviado ao laboratório para análise.



Figura 8. Preparo do pecíolo antes do envio para a análise. Em papel filme (A); e em saco plástico limpo (B).

Metodologia 2

Amostragem da zona meristemática

No caso de plantas que ainda não produziram espatas/inflorescências ou se essas estiverem com manchas e/ou necrose, a zona meristemática também poderá ser amostrada. Nesse caso, a amostragem é obrigatoriamente destrutiva e somente pode ser realizada após

o corte da planta. Assim, uma vez a copa da planta estando no solo, corta-se o tronco no nível das folhas baixas, retirando-se as folhas, uma a uma, até o nível da zona meristemática (onde as primeiras folhas jovens são produzidas).

Se o amostrador conhecer muito bem a anatomia do coqueiro, ela poderá cortar diretamente o tronco com uma motosserra no nível logo abaixo da zona meristemática (Figura 9A) e dissecar os tecidos até atingir o ponto

de crescimento da planta (Figuras 9B e 9C). Em seguida, corta-se com uma faca ou canivete limpo um fragmento de cerca de 15 cm x 15 cm x 15 cm ou 20 cm x 20 cm x 20 cm, logo abaixo o ponto de crescimento (meristema) da planta (Figura 9D). Imediatamente após o

corde, envolver o material em papel filme para proteção e embalar em saco plástico limpo e etiquetado. Recomenda-se armazenar a amostra de acordo com o descrito no item anterior.



Figura 9. Coleta do meristema apical. Separação da região do meristema do restante da planta (A) e dissecação criteriosa dessa região para coleta dos tecidos amostrais de interesse (B, C e D).

Todos os materiais coletados deverão conter uma etiqueta com as seguintes informações:

Local da coleta:
Parte da planta:
Pontos de GPS:
Responsável pela coleta:
Data e hora da coleta:
Laboratório a ser enviado:

Escrever as informações na etiqueta a lápis para evitar que a umidade prejudique a clareza das informações ali descritas. As amostras podem ser enviadas para laboratórios que prestem serviço de diagnose de doenças de plantas, e quem tenham experiência com a cultura do coqueiro.

Análise das amostras

A partir das amostras coletadas serão retirados pequenos fragmentos do pecíolo ou do meristema (por volta de $1,5 \text{ cm}^3$) e estes devem ser espremidos com auxílio de um alicate limpo até a seiva sair do fragmento formando uma gota sobre uma lâmina de microscopia (Figura 10).

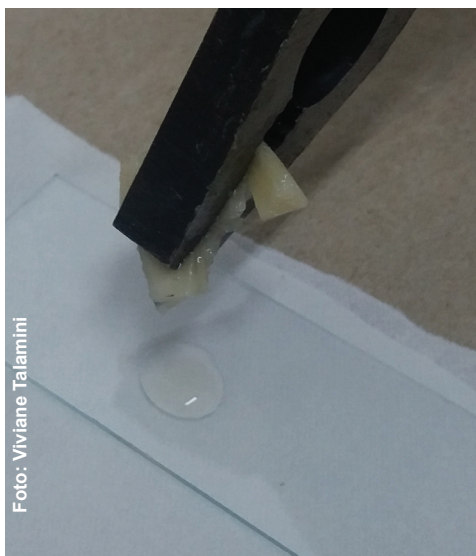


Foto: Viviane Talamini

Figura 10. Forma de extração da seiva de fragmento do pecíolo da espata do coqueiro para análise ao microscópio ótico.

Após a obtenção do líquido deve-se depositar uma lamínula sobre a gota (Figura 11A) e analisar ao microscópio ótico com auxílio da objetiva de 40x (aumento de 400x) (Figura 11B). No caso das amostras estarem contaminadas com fitomonas será possível ver as estruturas desses ao microscópio. Quando a doença estiver em estágio inicial é possível visualizar, no microscópio, as fitomonas se movendo sendo assim mais fácil o diagnóstico. Uma figura demons-

trando a forma das fitomonas foi inserida no início deste documento. Caso as fitomonas não apresentem movimento ou em caso de dúvidas será necessário fazer um esfregaço e colorir com corantes (tipo Giemsa) indicados para colorações de tripanossomatídeos como, por exemplo, os utilizados para visualização do *Trypanosoma cruzi* em microscopia.

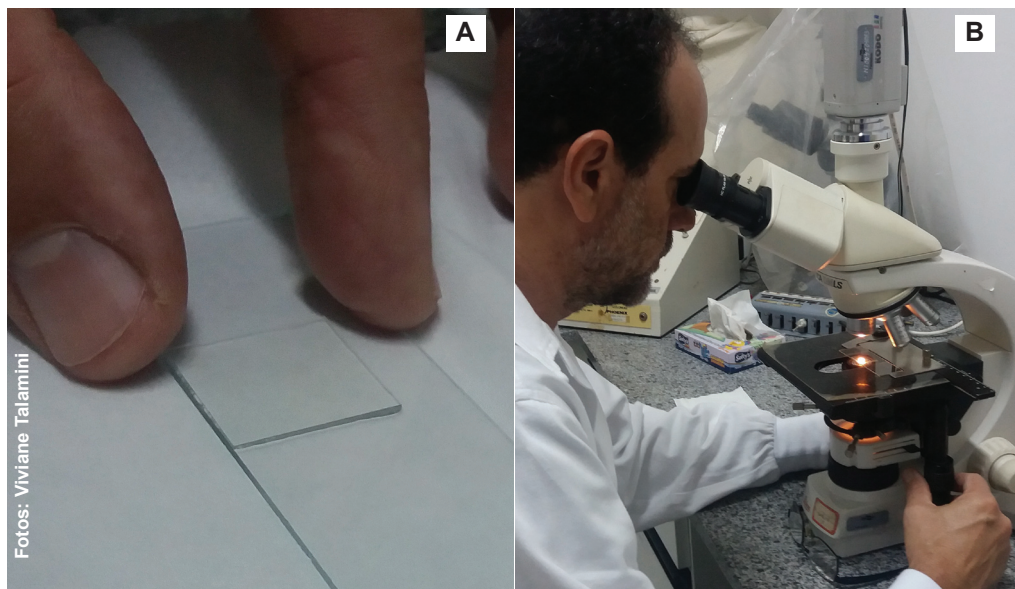


Figura 11. Análise da seiva de fragmento do pecíolo da espata do coqueiro ao microscópio ótico. Lâmina com gota da seiva coberta pela lamínula (A); e visualização ao microscópio ótico em objetiva de 40x (aumento de 400x) (B).

Considerações finais

A planta que será amostrada não poderá estar em estágio avançado da doença, como por exemplo, plantas com apenas quatro a cinco folhas remanescentes, pois a visualização do agente causal da murcha-de-*Phytophthora* poderá ser muito prejudicada pela presença de outros microrganismos contaminantes. O primeiro estágio da sintomatologia da doença é o melhor para a amostragem. As amostras deverão chegar ao laboratório em menos de cinco dias após a coleta do material vegetal. Deve-se evitar a coleta bem como a postagem das amostras na quinta ou sexta-feira (maior dificuldade para entrega no fim de semana), e preferencialmente optar pelo envio mais rápido.

É importante ressaltar que, paralelo à coleta de amostras, deve-se verificar a ocorrência dos insetos vetores no local. A presença dos pentatomídeos (percevejos) dos gêneros *Lincus* ou *Ochlerus* é sinal de que a murcha-de-*Phytophthora* pode estar ocorrendo na região (Louise et al., 1986; Dollet 2001). Se possível esses insetos deverão ser coletados e armazenados em frascos com etanol 70% e enviados para um entomologista para a correta identificação.

Por se tratar de uma doença causada por um protozoário que invade o sistema vascular e é transmitida por insetos vetores, é primordial a detecção precoce da murcha-de-*Phytophthora* nas áreas de produção. Haja vista que o método de

controle dessa doença é baseado principalmente na erradicação das plantas infectadas. Diante do exposto, as informações contidas neste documento servirão de apoio a técnicos, produtores rurais e demais profissionais que trabalham com a cultura do coqueiro contendo os métodos adequados de coleta de amostras para auxiliar na diagnose precisa da murcha-de-*Phytophthora*.

Referências

- DOLLET, M. Plant Diseases caused by flagellate protozoa. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, p. 115 -132, 1984.
- DOLLET, M. Phloem-restricted trypanosomatids form a clearly characterized monophyletic group among trypanosomatids from plants. **International Journal of Parasitology**, v. 31, p. 459-467, 2001.
- DOLLET, M. Heteroptera and plant trypanosomatids (*Phytophthora spp.*). In: "**Vector-mediated transmission of plant pathogens**". J. Brown Editor. APS Press. 510 p. 2016.
- DOLLET, M.; STURM, N. R., CAMPBELL, D. A. The internal transcribed spacer of ribosomal RNA genes in plant trypanosomes (*Phytophthora spp.*) resolves ten groups. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 299-308, 2011.

LOUISE, C.; DOLLET, M.; MARIAU, D. Research into Hartrot of the coconut, a disease caused by *Phytomonas* (Trypanosomatidae), and into its vector *Lincus* sp. (Pentatomidae) in Guiana. **Oléagineux**, v. 41, n. 10, fas. 441, p. 437-449, oct. 1986.

RENARD, J. L. Le Hartrot du cocotier: caracterisation et moyens de lutte. **Oléagineux**, v. 44, n. 10, fas. 474, p. 475-484, oct. 1989.

Unidade responsável
pelo conteúdo e edição:

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Av. Beira Mar, 3250
CEP 49025-040, Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1300
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
Publicação digitalizada (2018)



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Tabuleiros Costeiros

Presidente
Ronaldo Souza Resende
Secretário-Executivo
Marcus Aurélio Soares Cruz

Membros
*Amaury da Silva dos Santos, Ana da Silva
Lédo, Anderson Carlos Marafon, Joézio Luiz
dos Anjos, Julio Roberto Araújo de Amorim,
Lizz Kezzy de Moraes, Luciana Marques de
Carvalho, Tânia Valeska Medeiros Dantas,
Viviane Talamini*

Supervisão editorial
Flaviana Barbosa Sales
Normalização bibliográfica
Josete Cunha Melo

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Beatriz Ferreira da Cruz

Foto da capa
Michel Dollet