

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Arroz e Feijão
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 271

Recomendações para Coleta e Envio de Material ao Laboratório de Fitopatologia para Diagnóstico de Doenças em Plantas

*Lívia Teixeira Duarte
Murillo Lobo Junior
Márcio Vinícius de Carvalho Barros Cortes*

Embrapa Arroz e Feijão
Santo Antônio de Goiás, GO
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Arroz e Feijão

Rod. GO 462, Km 12

Caixa Postal 179

75375-000 Santo Antônio de Goiás, GO

Fone: (0xx62) 3533 2110

Fax: (0xx62) 3533 2123

www.cnpaf.embrapa.br

sac@cnpaf.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Roselene de Queiroz Chaves*

Secretário-Executivo: *Luiz Roberto Rocha da Silva*

Membros: *Flávia Aparecida de Alcântara*

Luís Fernando Stone

Ana Lúcia Delalibera de Faria

Heloísa Célis Breseghezzo

Camilla Souza de Oliveira

Fábio Fernandes Nolêto

Adriane Wendland

Supervisor editorial: *Camilla Souza de Oliveira*

Revisão de texto: *Camilla Souza de Oliveira*

Normalização bibliográfica: *Ana Lúcia D. de Faria*

Tratamento de ilustrações: *Fabiano Severino*

Editoração eletrônica: *Fabiano Severino*

1^a edição

Versão online (2013)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Arroz e Feijão

Duarte, Lívia Teixeira.

Recomendações para coleta e envio de material ao laboratório de fitopatologia para diagnóstico de doenças em plantas / Lívia Teixeira Duarte, Murillo Lobo Junior, Márcio Vinícius de Carvalho Barros Cortes. - Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2013.

20 p. - (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 271)

1. Doença de planta - análise. 2. Doença de planta - diagnóstico. I. Lobo Junior, Murillo. II. Cortes, Márcio Vinícius de Carvalho Barros. III. Título. IV. Embrapa Arroz e Feijão. V. Série.

CDD 632 (21. ed.)

©Embrapa 2013

Autores

Lívia Teixeira Duarte

Mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, livia.duarte@embrapa.br

Murillo Lobo Junior

Engenheiro agrônomo, Doutor em Fitopatologia, pesquisador da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, murillo.lobo@embrapa.br

Márcio Vinícius de Carvalho Barros Cortes

Farmacêutico, Mestre em Bioquímica, analista da Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, marcio.cortes@embrapa.br

Apresentação

Diversas doenças das plantas cultivadas podem ser diagnosticadas na própria lavoura, quando apresentam sintomas bem definidos ou sinais típicos dos seus agentes causais. No entanto, quando uma inspeção visual não é suficiente para o diagnóstico, o apoio de um laboratório de fitopatologia é bastante útil para a identificação correta da causa do problema observado em campo, e para a tomada de decisões.

O sucesso do diagnóstico depende principalmente do processo de amostragem e do envio adequado das amostras, sendo essencial que as amostras sejam representativas do problema. Da mesma forma, é igualmente importante que as mesmas cheguem ao laboratório em boas condições, de preferência frescas e recém-colhidas, ou então preservadas adequadamente. Com base em um diagnóstico correto, as recomendações para o manejo de doenças podem ser realizadas de forma adequada.

Tendo em vista que parte importante do sucesso das lavouras depende da combinação entre prevenção de problemas fitossanitários e solução rápida de problemas, este documento tem como objetivo principal apresentar algumas recomendações para a obtenção e o preparo da amostra a ser enviada para análise fitopatológica.

Os autores

Sumário

Introdução	9
Registro de informações no campo	10
Recomendações gerais	11
Amostragem de plantas	13
Folhas e plantas pequenas	14
Plantas murchas	14
Vagens	14
Raízes	14
Horário de amostragem	16
Informações adicionais	16
Recebimento de amostras e procedimentos no laboratório	17
<i>Observação direta em lupa e em microscópio</i>	17
<i>Isolamento de fungos fitopatogênicos</i>	18
<i>Extração de nematóides.....</i>	18
<i>Métodos moleculares</i>	19
Serviços disponíveis	20
Referências	20

Recomendações para Coleta e Envio de Material ao Laboratório de Fitopatologia para Diagnóstico de Doenças em Plantas

Lívia Teixeira Duarte

Murillo Lobo Junior

Márcio Vinícius de Carvalho Barros Cortes

Introdução

As doenças que incidem sobre as plantas cultivadas causam danos que levam a perdas na produção das lavouras, sendo uma ameaça constante à produção de alimentos. São o resultado da interação entre planta suscetível, patógeno virulento e ambiente favorável, que leva à expressão nas plantas de sintomas como manchas foliares, desfolha, tombamento de plântulas, murchas vasculares, podridões diversas, entre outras (Figura 1). Esses sintomas, por sua vez, são utilizados para o diagnóstico da doença em questão, que é essencial para seu manejo e prevenção de perdas.

Para identificar a causa de uma doença que afeta uma planta ou lavoura, é necessário determinar se ela é causada por um patógeno ou por fatores ambientais. Nos casos em que sintomas típicos ou sinais de um patógeno estão presentes, é relativamente fácil para um analista realizar essa determinação. Caso contrário, um exame mais detalhado dos sintomas é necessário para um diagnóstico correto (AGRIOS, 2005).

Em doenças causadas por patógenos (fungos, bactérias, nematóides, vírus, fitoplasmas e protozoários), um ou mais patógenos podem estar presentes na superfície das plantas ou em seu interior, nos tecidos vasculares, ou na parte inferior da planta, na superfície ou interior das

raízes (AGRIOS, 2005). A presença de tais patógenos nas plantas sugere que eles são os causadores da doença, mas é imprescindível a investigação de sintomas adicionais. Os patógenos frequentemente produzem estruturas microscópicas que, na maioria dos casos, não podem ser visualizadas na superfície de uma planta doente e, então, é necessária a busca por patógenos no interior da planta.

Fotos: Murillo Lobo Junior

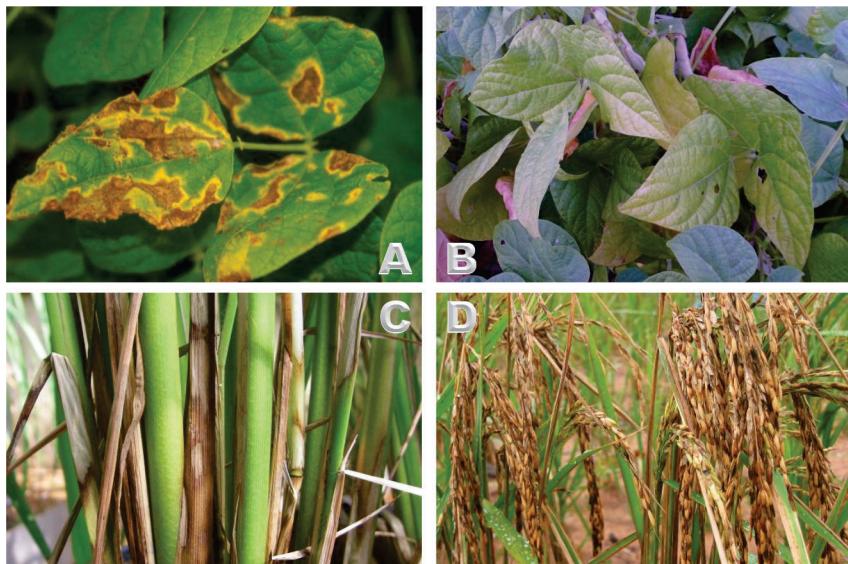


Figura 1. Plantas de feijão apresentando manchas foliares (crestamento bacteriano comum) (A), amarelecimento (murcha de *Fusarium*) (B). Plantas de arroz com sintomas de queima na bainha (C) e mancha de grãos (D).

Registro de informações no campo

Várias doenças das plantas cultivadas podem ser diagnosticadas na própria lavoura, por engenheiros agrônomos, técnicos e produtores rurais, quando apresentam sintomas ou sinais típicos. No entanto, essa identificação é dificultada por diversos fatores, como sintomas comuns a várias doenças; tecidos deteriorados devido ao estágio já avançado da infecção; sintomas em diferentes fases de expressão na planta; semelhança com danos causados por fatores abióticos, como deficiências nutricionais ou fitotoxidez após a aplicação de insumos

químicos; sintomas expressos sob diferentes condições climáticas ou cultivares com níveis diferentes de resistência. Nesses casos, o apoio de um laboratório de fitopatologia pode ser útil para a identificação correta da causa do problema observado em campo.

Informações sobre o histórico da lavoura podem auxiliar no diagnóstico, por isso, sempre que possível, o remetente deverá informar: espécie, cultivar ou híbrido, município de origem, localização da lavoura, data de plantio, tratos culturais incluindo controle químico, padrão de ocorrência da doença (em reboleiras ou distribuída ao acaso, em toda a lavoura), tipo de solo, área afetada (hectares), endereço, e-mail, telefone para contato, localização geográfica estimada por GPS, quando disponível, e outros dados que julgar pertinentes.

Recomendações gerais

O sucesso do diagnóstico depende principalmente da amostragem e do envio adequado das amostras, sendo necessário que as mesmas cheguem ao laboratório em boas condições, de preferência frescas e recém-colhidas, ou então preservadas adequadamente. A seguir, são apresentadas algumas recomendações sobre a obtenção e o preparo da amostra a ser enviada para análise fitopatológica:

1. As amostras enviadas ao laboratório devem mostrar desde os sintomas iniciais da doença até os mais avançados, quando presentes, evitando-se tecidos deteriorados.
2. O transporte até o laboratório deve ser o mais rápido possível, para que não ocorra murchamento ou apodrecimento das amostras. Não adicionar água ou embalar as amostras muito úmidas, para evitar o seu apodrecimento.
3. Amostras de folhas devem ser prensadas entre duas folhas de papelão. Caso contrário, as folhas murcham e ficam enrugadas, dificultando o diagnóstico de doenças foliares. Deve-se evitar a desidratação das amostras, ou seja, colocá-las dentro de folhas dobradas de jornal com um peso por cima, por exemplo.

4. Deve-se evitar o transporte das amostras expostas ao sol ou calor excessivo, como em carrocerias abertas ou porta-malas de carro (exceto quando embaladas em caixas de isopor com gelo).
5. Evite misturar amostras de diferentes partes da planta em uma mesma embalagem. A umidade das amostras de raízes pode acelerar a deterioração de folhas, se estiverem misturadas.
6. Em se tratando de amostras de raízes, elas devem ser enviadas com uma quantidade de solo que seja suficiente para manter a umidade natural do campo. O solo coletado deve ser obtido junto às raízes, caso precise ser utilizado para obter informações complementares. O solo pode ser utilizado também no diagnóstico de fungos, bactérias e nematóides.
7. Acondicionar as amostras preferencialmente em saco de papel até a chegada ao laboratório. Excepcionalmente, pode-se utilizar saco plástico, caso a remessa das plantas chegue rapidamente. Para amostras muito úmidas, pequenos furos podem ser feitos no saco plástico, para evitar o acúmulo de umidade. As amostras também podem ser mantidas refrigeradas (mas nunca congeladas). As amostras poderão ser entregues pessoalmente no laboratório ou enviadas pelos correios ou transportadoras. As amostras enviadas pelos correios devem ser postadas no início da semana para evitar que permaneçam em trânsito ou armazenadas durante o final de semana, o que aumenta o tempo de chegada ao laboratório.
8. As amostras despachadas devem ser colocadas em uma caixa de papelão reforçada ou caixa de isopor, para evitar que o material se danifique durante o transporte.
9. Os laboratórios de fitopatologia geralmente são especializados em determinadas espécies de plantas e/ou tipos de patógenos. Consulte previamente o laboratório de interesse para verificar a disponibilidade dos serviços de que necessita.

10. Não há como diagnosticar a ocorrência de doenças em amostras que já chegam deterioradas.

A diagnose de uma doença de planta pode ser rápida e simples, ou complexa e demorada, dependendo do caso. O tempo para o diagnóstico pode variar de poucos minutos a até mais de um mês, dependendo da complexidade do problema. Em geral, os fitopatógenos são identificados em nível de espécie ou de gênero, o que é suficiente para o diagnóstico e as recomendações técnicas para controle da doença. Conforme a infraestrutura do laboratório, também é possível determinar raças, patótipos, formas especiais, patovares e outras formas de variação intraespecífica.

Amostragem de plantas

Antes de iniciar a coleta, as plantas devem ser cuidadosamente examinadas, à procura de sintomas típicos da doença. Devem ser coletadas plantas apresentando manchas foliares, murcha, amarelecimento ou enfraquecimento geral, em estágio inicial ou intermediário. As plantas devem apresentar partes sadias e doentes, evitando-se plantas totalmente mortas ou em estágio avançado de deterioração. Os problemas de amostragem aumentam proporcionalmente ao tamanho da área cultivada. Procure caminhar em zigue-zague ou aleatoriamente e coletar um maior número de plantas, à medida que observe sintomas diferentes na área cultivada. Incluir plantas sadias junto às doentes também pode ser útil ao diagnóstico. Procure obter amostras que sejam representativas do problema. Caso a coleta das plantas seja feita em apenas um ponto da lavoura, há risco de se subestimar o problema em questão.

É possível que sintomas observados na parte aérea das plantas sejam causados por problemas no sistema vascular ou nas raízes. Esses sintomas são chamados de “reflexo”, e por isso é importante avaliar as plantas como um todo. No caso de patógenos habitantes do solo causando amarelecimento ou murcha nas folhas (exemplo de sintoma reflexo), é necessária uma avaliação de toda a planta, justamente para procurar a origem dos problemas observados no campo. Nesse caso, encaminhar

amostras somente de folhas caindo ou vagens sem enchimento adequado ao laboratório de fitopatologia não trará as respostas esperadas. Alguns cuidados importantes estão indicados a seguir.

Folhas e plantas pequenas

As folhas não devem ser amassadas ou dobradas. No caso de plantas muito jovens, deve-se coletar toda a planta, inclusive as raízes.

Para que não haja danos às raízes, as plantas devem ser retiradas cuidadosamente do solo, cavando ao seu redor para evitar que elas se quebrem. Quando não for possível enviar plantas adultas inteiras, cortar porções de todas as partes da planta: hastes (inclusive com flores com vagens ou cachos) e raízes.

Plantas murchas

É fundamental a coleta da parte inferior das plantas, incluindo suas raízes, principalmente no caso de plantas murchas, amareladas ou com crescimento reduzido. Nunca cole uma única planta ou apenas parte dela. Colete um número razoável de plantas (no mínimo 2 a 3 plantas para cada amostra), considerando, evidentemente, a embalagem já recomendada e o custo do transporte. Observe que os sintomas iniciais de murchas vasculares são observados nas horas mais quentes do dia, podendo regredir sob temperatura amena.

Vagens

Deve-se coletar, preferencialmente, vagens que não estejam molhadas. No caso de estarem molhadas, deve-se secá-las antes de serem acondicionadas em saco de papel identificado.

Raízes

As raízes devem ser obtidas na camada de 25-30 cm de solo e conter uma quantidade de solo, não encharcado, obtido bem próximo às plantas coletadas e em quantidade suficiente para manter a umidade natural do campo.

Nos casos em que nematóides são suspeitos da causa de danos e perdas ocorrentes em uma área agrícola ou florestal, o passo inicial é a

coleta de amostras de solo e/ou raízes no local para envio subsequente ao laboratório; são as chamadas amostras nematológicas. Há algumas recomendações práticas relativas à coleta dessas amostras, conforme Tihohod (1993):

1. Coletar as amostras de solo com a umidade natural, evitando-se que elas cheguem secas ao laboratório. Evitar também que raízes e tecidos vegetais sequem, pois nematóides não sobrevivem em solos ou raízes secos. Evitar a coleta quando o solo estiver muito ressecado (durante estiagens) ou encharcado;
2. Utilizar amostradores especiais de solo, denominados trados, sempre que possível, pois conferem maior precisão à coleta. Não se dispondo de trados, o uso de enxadão ou enxada pode ser indicado em coletas de rotina, sem maiores problemas;
3. No caso de culturas anuais, tomar no mínimo dez subamostras de solo por hectare. Coletar na zona das raízes das plantas, incluindo sempre que possível, raízes na amostra. As subamostras de solo e/ou radicelas coletadas no balde devem ser muito bem misturadas, tomando-se uma amostra composta de, no mínimo, 500 g de solo e em torno de 10 g de radicelas. Logo, deve-se coletar uma amostra composta por hectare;
4. Quando a área for heterogênea, com parte dela sendo de solo arenoso e parte de solo argiloso, deve ser tomada uma amostra composta para cada uma delas, pois a textura do solo afeta muito a ocorrência de nematóides. Quando na parte arenosa, por exemplo, forem cultivadas duas diferentes variedades da cultura, cada uma delas deverá ser amostrada separadamente. Ainda, quando na área houver declividade acentuada, tirar amostras compostas tanto da parte mais alta como da baixada. Para a coleta das várias subamostras simples (solo e raízes) que irão compor uma amostra composta, o amostrador deve caminhar sempre em zigue-zague;

5. Quando houver reboleiras bem evidentes, será preferível coletar subamostras de plantas localizadas na sua periferia, evitando-se as plantas centrais.

Nesse caso específico de coleta de amostras para análise nematológica, o solo e as radicelas coletadas devem ser colocados em saco plástico, que deve ser amarrado para manter a umidade do solo. Assim como outras amostras, as raízes e solo devem chegar o mais rápido possível ao laboratório (FREITAS et al., 2007).

Horário de amostragem

Conforme informado anteriormente, os sintomas iniciais de murchas vasculares são observados nas horas mais quentes do dia, podendo regredir sob temperatura amena. De modo contrário, podridões diversas são mais facilmente observadas no início da manhã, e são mascaradas quando a umidade do ambiente é reduzida.

Informações adicionais

Fotografias de boa qualidade também podem ser úteis ao diagnóstico, por descrever o local e condições da lavoura afetada. Elas podem não resolver por si só o diagnóstico, mas podem agregar informações importantes e colaborar na identificação do problema. Algumas dicas importantes sobre fotos são:

1. Chegue perto. Fotos tiradas a mais de 1 m de distância geralmente são ineficientes para fornecer uma descrição representativa dos sintomas nas plantas. Procure tirar as fotos de altura próxima ao dossel das plantas.
2. Para fotografar lesões em partes específicas das plantas, use o recurso “macro”, presente na maioria das câmeras, para se obter fotos nítidas e bem detalhadas, que mostrem realmente os sintomas observados.
3. Os melhores horários para fotografar são o início da manhã e o final da tarde. Próximo ao meio dia, a luz solar provoca reflexos nas plantas que mascaram os sintomas das doenças. Procure fotografar sem a interferência de reflexos e sombras.

4. Mesmo durante o dia, o uso de flash pode ser útil, por eliminar sombras que possam escurecer parte da foto, omitido então detalhes de interesse. Esse recurso pode ser usado desde que não ilumine excessivamente a imagem obtida.
5. É essencial que as fotos estejam nítidas, em foco correto, sem os borrões formados com a movimentação da câmera durante a foto. Fotos com qualidade aquém do esperado não devem ser enviadas como apoio ao diagnóstico, pois de nada ajudam.

Recebimento de amostras e procedimentos no laboratório

Logo após o recebimento, a amostra é registrada, recebendo uma identificação única. As plantas passam por uma inspeção inicial, sendo que as doenças mais importantes e comuns, por apresentarem sintomas bem típicos e únicos, podem ser identificadas logo após inspeção visual. Caso o diagnóstico não seja imediatamente resolvido, as amostras são submetidas a testes diferentes, conforme os sintomas observados, como indicado a seguir:

Observação direta em lupa e em microscópio

Manchas em folhas, hastes, grãos ou vagens podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus ou mesmo nematóides. No caso de sintomas causados por fungos, a observação direta em lupa das estruturas fúngicas poderá indicar o gênero ao qual o fungo pertence (Figura 2). Frequentemente essas estruturas não estão formadas nas amostras recebidas, e para observá-las é preciso manter o material em câmara úmida por período de tempo de pelo menos 24 horas para a produção das estruturas de reprodução dos fungos. Alguns fungos apresentam estruturas que permitem a sua identificação após a observação direta do micro-organismo em lupa. No entanto, no caso de outras espécies, a identificação deve ser complementada pela montagem de lâminas e observação ao microscópio óptico. Grupos de patógenos como bactérias, vírus e nematóides não produzem tais estruturas, e seu diagnóstico depende de outros métodos.

Fotos: Lívia Teixeira Duarte

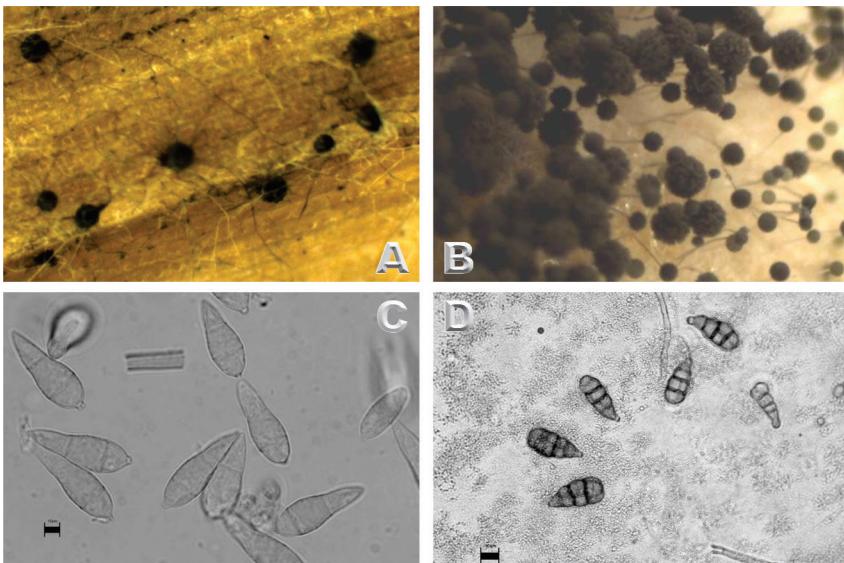


Figura 2. Estruturas fúngicas observadas em lupa: Picnídios de *Phoma* sp. em sementes de arroz (A); *Aspergillus* sp. em sementes de feijão (B). Esporos de fungos observados ao microscópio: *Pyricularia grisea* (C) e *Alternaria* spp. (D).

Isolamento de fungos fitopatogênicos

O isolamento de fungos fitopatogênicos consiste na obtenção de cultura pura a partir de tecidos doentes do hospedeiro, solo ou substrato (Figura 3). As operações de isolamento são executadas sob rigorosa assepsia, em ambiente próprio, usando-se ferramentas e materiais desinfestados ou esterilizados. Nesse procedimento, fungos e bactérias podem ser cultivados em diferentes meios de cultura, conforme as exigências nutricionais do organismo (ALFENAS; MAFIA, 2007).

Extração de nematóides

Há vários métodos para se extrair nematóides de raízes. O método de Coolen e D’Herde (1972) é um dos mais conhecidos. Neste método, as raízes são separadas da porção de solo da amostra, logo após são lavadas cuidadosamente para a retirada do solo aderido às raízes, e cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm. Esses fragmentos são em seguida homogeneizados, pesados (pode-se utilizar 5 g ou qualquer outra quantidade desejada) e triturados em liquidificador com

250 mL de água, em alta rotação por 15 segundos. Em seguida, a solução triturada é vertida em peneira de 100 mesh acoplada à outra de 400 mesh. A peneira de malha mais fina é, então, lavada com jato de água de pisseta e os nematóides com os resíduos de raiz macerada são submetidos ao método de flotação em centrífuga, em solução de sacarose (TIHOHOD, 1993). Após a morte e conservação dos nematóides em uma solução apropriada (Golden 2X), as observações são feitas em lâmina de Peters, com a utilização de microscópio óptico, para contagem e identificação de nematóides fitoparasitas e, eventualmente, os de vida livre presentes na amostra.

Fotos: Daniel Diego



Figura 3. Etapas para isolamento indireto de fungos fitopatogênicos. Plantas de feijoeiro apresentando murcha e amarelecimento (A); Tecido vegetal apresentando sintomas de infecção fúngica (B); Isolamento de *Fusarium oxysporum* em meio de cultura a partir de fragmento vegetal (C).

Métodos moleculares

Métodos moleculares, em especial a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), permitem a detecção específica de um organismo, sem a necessidade de cultivo tradicional. A reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste basicamente na extração e amplificação (aumento do número de cópias) de fragmentos de DNA em uma reação bioquímica utilizando enzimas termoestáveis que ajudam à formação de novas cópias de DNA. Um pedaço específico do DNA é amplificado nessa reação, com a ajuda de um conjunto de reagentes específicos (dois oligonucleotídeos iniciadores ou “primers”), cada um complementar e com afinidade a uma das fitas de DNA-molde do patógeno que se deseja identificar (ALFENAS; MAFIA, 2007). Com o uso de primers específicos, torna-se possível a amplificação seletiva de sequências

nucleotídeas da espécie alvo, mesmo que ela se encontre em baixas concentrações e na presença de outros organismos (AGRIOS, 2005). Os métodos de diagnóstico por reação de PCR são mais complexos, porém de grande precisão, e podem ser extremamente úteis no diagnóstico de patógenos do feijão comum como *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*.

Serviços disponíveis

Antes de enviar amostras de plantas ou sementes para diagnóstico de doenças, consulte o Laboratório de Fitopatologia quanto à disponibilidade de serviços e seus custos. Na Embrapa Arroz e Feijão, amostras podem ser encaminhadas para:

Laboratório de Fitopatologia - Embrapa Arroz e Feijão
Rodovia GO-462 km 12, Zona Rural
CEP: 75375-000 - Santo Antônio de Goiás, GO
Telefone: (62) 3533-2173
Fax: (62) 3533-2100

Referências

AGRIOS, G. N. **Plant pathology.** 5th ed. Amsterdam: Academic Press, 2005. 922 p.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia.** Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007. 382 p.

COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. **A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue.** Ghent: State Agricultural Research Centre, 1972. 77 p.

FREITAS, L. G.; NEVES, W. S.; OLIVEIRA, R. D. L. Métodos em nematologia vegetal. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia.** Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007. p. 253-291.

TIHOHOD, D. **Nematologia agrícola aplicada.** Jaboticabal: FUNEP, 1993. 372 p.