Comunicado Técnico 210
ISSN 1678-1937
Dezembro, 2017

Foto: Michel Dollet

Coleta de Amostras para Análises Moleculares do Fitoplasma Causador do Amarelecimento Letal do Coqueiro

Michel Dollet[1]
Viviane Talamini[2]
Leandro Eugenio Cardamone Diniz[3]

O amarelecimento letal (AL) é a mais devastadora doença da cultura do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) no mundo (OROPEZA et al., 2011; MYRIE et al., 2012) e, uma vez introduzida em determinada área, altera rapidamente a paisagem, causando perda total das folhas das plantas (Figura 1). Até o presente não se conhece uma variedade de coqueiro com resistência ou tolerância aceitável e duradoura para essa doença. Na Jamaica, a introdução do amarelecimento letal provocou a destruição de mais de quatro milhões de coqueiros entre os anos de 1961 a 1983. Perdas similares ocorreram ao longo das costas atlânticas do sul do México e de Honduras.

A principal planta hospedeira do agente causal dessa doença é o coqueiro, porém mais de 40 espécies de palmeiras tais como *Phoenix dactylifera, P. canariensis, P. sylvestris, Livistona chinensis, Pritchardia pacifica, Syagrus schizophylla* e *Trachycarpus fortunei,* entre outras, também são suscetíveis (HARRISON et al., 2002; 2008).

Foto: Michel Dollet

Figura 1. Área com a cultura do coqueiro depois de uma epidemia de amarelecimento letal.

O AL identificado na América do Norte e no Caribe é causado pelo fitoplasma *Candidatus* Phytoplasma palmae. A variabilidade desse microrganismo é alta, inclusive com relatos de diferentes subgrupos de fitoplasmas associados aos diversos tipos de síndromes do tipo amarelecimento letal. Outras síndromes do tipo amarelecimento letal ocorrem em diferentes regiões do planeta, a exemplo

[1]Biólogo, PhD em Biologia Molecular, pesquisador Cirad, UMR IPME, Montpellier, França, pesquisador visitante especial CNPq/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.
[2]Engenheira-agrônoma, doutora em Fitopatologia, pesquisadora, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.
[3]Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

Embrapa

da África Ocidental e África Oriental e de Papua Nova Guiné. Os sintomas nas plantas ocorrem na seguinte sequência: i) queda prematura e repentina de todos os frutos; ii) amarelecimento das folhas de baixo para cima, ou seja, das mais velhas para as mais novas; iii) necrose das inflorescências; e, iv) morte da planta. O período de incubação do AL é, em média, de 8 a 9 meses e, do primeiro sintoma até a morte da planta o tempo é de 3 a 6 meses, totalizando o ciclo entre 11 e 15 meses (DOLLET et al., 2009). Na América do Norte, o AL ocorre nos Estados Unidos e México; no Caribe, nas Ilhas Cayman, Cuba, República Dominicana, Haiti, Jamaica, Saint Kitts e Nevis, Antígua e Barbuda e São Martinho; e na América Central, na Guatemala, Belize e Honduras.

Na África Ocidental as síndromes do tipo amarelecimento letal já foram encontradas em vários países como: Camarões, Nigéria, Gana, Togo e Costa do Marfim, e na África Oriental, Moçambique, Tanzânia e Quênia. Nesses casos, a exceção da Tanzânia, a espécie identificada é o *Candidatus* Phytoplasma palmicola (HARRISON et al., 2014).

O fitoplasma que ocorre na Tanzânia de outra espécie já identificada, permanece sem denominação.

O fitoplasma detectado recentemente em Papua Nova Guiné é um novo fitoplasma.

O AL ainda não ocorre no Brasil, sendo oficialmente considerada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa) uma praga quarentenária ausente (PQA), quando foi incluída oficialmente na lista de PQAs por meio da publicação da Instrução Normativa Mapa nº 52, de 21 de novembro de 2007, e identificada como *Palm lethal yellowing phytoplasma*. Recentemente, em uma ação institucional do Mapa e da Embrapa sobre priorização de pragas quarentenárias ausentes, o amarelecimento letal recebeu prioridade alta, estando entre as dez pragas com maior risco de introdução no Brasil e de provocar elevados prejuízos econômicos e sociais (BRASIL..., 2017). Diante disso, é prioritária a capacitação de técnicos da área de Defesa Vegetal, tanto federais quanto estaduais na retirada de amostras de pontos específicos da planta para que as análises moleculares tenham resultados confiáveis, evitando falsos negativos.

O objetivo deste trabalho é apresentar, de forma prática e ilustrada, o passo a passo da coleta de amostras no caso de suspeita de plantas com AL em território nacional. Além disso, a publicação informa quanto à forma correta de envio de amostras para laboratórios capacitados para a detecção, por meio de análises moleculares, do fitoplasma causador dessa importante doença do coqueiro.

Estas metodologias para coleta de amostras são resultantes da experiência de vários anos de pesquisas relacionadas a doenças do coqueiro de etiologia indefinida ou síndromes de tipo amarelecimento letal realizadas por um dos autores deste documento (1), em países do Caribe, África e Ásia.

Metodologia 1

Coleta de amostras do estipe

Utiliza-se essa metodologia em casos onde não se pode eliminar a planta ou não há tempo para dissecá-la totalmente para coleta adequada da inflorescência ou da zona meristemática e das folhas jovens.

Material:

- furadeira (preferencialmente, com bateria acoplada) ou “Arco de pua”;
- broca para madeira de 10 mm de diâmetro com comprimento útil de aproximadamente 15 cm;
- frasco spray com produto antimicrobiano, por exemplo, hipoclorito de sódio a 2%-2,5%;
- frasco com água limpa que pode ser mineral ou potável de torneira;
- facão com aproximadamente 35 cm de lâmina;
- canivete com aproximadamente 9 cm de lâmina;
- papel alumínio ou folha nova de papel sulfite;
- frascos coletores (capacidade de 80 mL) com saquinhos de sílica gel, de preferência, do tipo rubingel.

Procedimento:

Desinfetar a superfície do estipe com o produto antimicrobiano, em uma área de, aproximadamente, 15 cm x 15 cm e na altura de 1,5 m do solo (Figura 2).

Foto: Viviane Talamini

Figura 2. Aspersão de hipoclorito de sódio a 2%-2,5% na área do estipe do coqueiro.

Remover cerca de 2 mm a 3 mm da casca do estipe com facão limpo com produto antimicrobiano e enxaguado com água limpa (Figura 3).

Foto: Viviane Talamini

Figura 3. Remoção das camadas superficiais da casca do estipe do coqueiro.

Finalizar a retirada dos excessos de casca com o auxílio de canivete, que deverá ser previamente limpo conforme descrito anteriormente (Figura 4).

Fotos: Viviane Talamini

Figura 4. Limpeza do canivete com hipoclorito de sódio a 2%-2,5% e água limpa **(A)** e retirada dos excessos da casca do estipe do coqueiro **(B).**

A broca a ser utilizada deverá ser também previamente limpa (Figura 5A). Inicialmente, perfurar o estipe em 0,5 cm de profundidade, remover e desprezar as aparas desta etapa da perfuração (Figura 5B). Em seguida, continuar a perfuração e coletar as aparas (resíduo do estipe perfurado) em uma folha de alumínio ou de papel sulfite novo ou diretamente dentro do frasco de amostragem. Para facilitar a retirada das aparas, deve-se a cada 1,0 cm-1,5 cm retirar lentamente a broca do estipe e recolher o material (Figura 5C).

Fotos: Viviane Talamini

Figura 5. Limpeza da broca com produto antimicrobiano e água limpa **(A)**, perfuração do estipe do coqueiro com a broca **(B)** e coleta das aparas do estipe em papel alumínio **(C)**.

A quantidade das aparas do estipe deve preencher pelo menos 1/3 de um frasco coletor limpo, estéril e o frasco deve ser bem vedado com tampa de rosca. Dentro do frasco deve ser colocado um saquinho com sílica gel para manter amostra seca (Figura 6). Deve-se evitar contato manual com as aparas do estipe durante a coleta.

Fotos: Viviane Talamini

Figura 6. Acondicionamento das aparas do estipe do coqueiro e da sílica gel no frasco coletor **(A** e **B).**

As amostras, uma vez, acondicionadas deverão ser imediatamente enviadas ao laboratório responsável pela análise. No frasco com sílica gel as amostras poderão permanecer na parte baixa de uma geladeira (temperatura de 6 °C a 10 °C) por até 15 dias ou à temperatura ambiente (por volta de 24 °C) por uma semana, mas, nunca devem ser congeladas ou mantidas em locais muito quentes, principalmente, dentro de veículos ao sol, mesmo que por curtos períodos de tempo.

Observações:

1) As ferramentas devem estar bem limpas e desinfetadas com produto antimicrobiano e enxaguadas com água limpa sempre que coletar uma nova amostra.
2) Repetir a limpeza das ferramentas a cada planta ou tecido diferente da mesma planta, para evitar contaminação cruzada.
3) Usar broca para madeira (diâmetro a depender da resistência do material, geralmente broca de 10 milímetros é a indicada).
4) Não utilizar a furadeira em velocidade elevada para a perfuração, a fim de evitar o aquecimento do material e comprometimento da qualidade da amostra.
5) Os ferimentos feitos na planta devem ser tratados com uma substância que forme uma barreira selante, como uso da pasta bordalesa, por exemplo.

Metodologia 2

Coleta das espatas

Material:

- motosserra e equipamento de proteção individual (óculos de proteção, luvas etc...);
- frasco spray com produto antimicrobiano, por exemplo, hipoclorito de sódio a 2%-2,5%;
- frasco com água limpa que pode ser mineral ou potável de torneira;
- facão com aproximadamente 35 cm de lâmina;
- canivete com aproximadamente 9 cm de lâmina;
- papel alumínio ou papel filme;
- sacos plásticos transparentes com capacidade para 5 litros nunca usados.

Procedimento:

Neste caso devem-se coletar as inflorescências ainda fechadas que são denominadas espatas (Figura 7) por meio de um corte no ponto de fixação desta ao estipe, mantendo todo o pecíolo. Em plantas ainda jovens e com porte baixo é possível obter as espatas sem destruição da planta, removendo algumas folhas ao redor da mesma até atingir a sua base. Segundo Patel (1938) e Perera et al. (2010) as espatas são classificadas em estágios e quando recém abertas recebem o número 10 e denomina-se estágio 0, a medida que as espatas vão ficando imaturas são denominadas de -1, -2, -3, -4 ..., chegando a -23, -24 (muito imaturas). Neste trabalho será utilizada a nomenclatura usual que denomina a espata recém-aberta como de número 10, por estar inserida na base da folha 10, e as demais como 9, 8, 7 e assim por diante, para as espatas mais jovens.

Foto: Michel Dollet

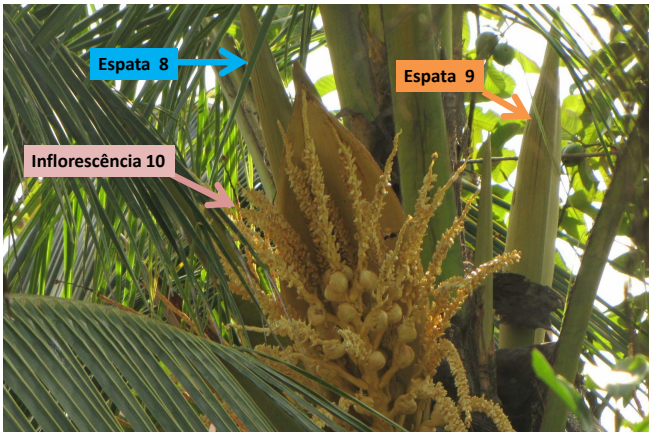

Figura 7. Espatas oito e nove do coqueiro e a inflorescência dez recém-aberta.

Na Figura 8 é possível verificar as espatas ainda fechadas (números um a oito) do coqueiro. As de números seis a oito, bem como a nove são as mais indicadas para análise do fitoplasma do AL.

Foto: Viviane Talamini

Figura 8. Espatas do coqueiro de número 1 a 8 conforme inserção na base de cada folha do coqueiro, ou de -2 a -9 conforme nomenclatura de Perera et al. (2010).

No caso de plantas de porte alto é necessário fazer o corte total do estipe na base. Essa etapa deverá ser feita por profissional treinado e com equipamentos de segurança para evitar risco de acidentes (Figura 9A). Após o corte da planta, devem-se remover com cuidado todas as folhas (Figura 9B) no sentido da espiral para não danificar as espatas a serem coletadas (Figura 9C).

Fotos: Viviane Talamini

Figura 9. Corte da planta de coqueiro **(A)** e remoção das folhas na base **(B)** e em espiral **(C)**.

A espata a ser amostrada é a número nove que está inserida na base da folha nove. Na coleta, esta inflorescência deve ser retirada inteira, incluindo o pecíolo, e assim, cortada na região de inserção do pecíolo ao estipe (Figura 10). Se o pecíolo estiver com lesões de coloração marrom não deverá ser amostrado. Neste caso, procurar uma espata mais jovem e íntegra na região do pecíolo.

Fotos: Viviane Talamini

Figura 10. Retirada da espata nove da planta de coqueiro **(A)** ainda fechada e com o pecíolo protegido **(B)**.

É recomendado o envio, ao laboratório que fará o diagnóstico, da inflorescência inteira ainda dentro da espata para formar uma barreira natural contra agentes contaminantes externos. No caso do envio via postagem/encomenda ou quando há a necessidade de redução do volume pode-se proceder ao corte da inflorescência e enviar somente o pecíolo da mesma (Figura 11).

Fotos: Viviane Talamini

Figura 11. Corte da inflorescência **(A)** para retirada da porção do pecíolo **(B)** a ser enviado ao laboratório para análise.

O pecíolo deverá ser embalado em um saco plástico limpo, nunca usado, e mantido em ambiente entre 6 °C e 10 °C até a chegada ao laboratório. O material não deverá ser congelado ou deixado em locais muito quentes, principalmente, dentro de veículos ao sol, mesmo que por curtos períodos de tempo.
Recomenda-se que todo o material vegetal restante, após a derrubada da planta e a dissecação e para retirada das amostras, seja destruído seguindo as recomendações da legislação vigente.

Metodologia 3

Coleta da zona meristemática

Material:

- motosserra e equipamento de proteção individual (óculos de proteção, luvas etc...);
- frasco spray com produto antimicrobiano, por exemplo, por exemplo, hipoclorito de sódio a 2%-2,5%;
- frasco com água limpa que pode ser mineral ou potável de torneira;
- facão com aproximadamente 35 cm de lâmina;
- canivete com aproximadamente 9 cm de lâmina;
- papel alumínio ou papel filme;
- sacos plásticos para embalagens nunca usados.

Procedimento:

A amostragem da zona meristemática é uma coleta obrigatoriamente destrutiva para a planta. Para tanto, devem-se seguir os passos citados na "Metodologia 2. Coleta das espatas" derrubando-se a planta e removendo as folhas uma a uma até atingir o nível da zona meristemática (onde as folhas jovens são formadas). Após essa etapa, separa-se a região do meristema (Figura 12A-C) do restante da planta e faz-se a dissecação até chegar na região dos tecidos meristemáticos tenros das folhas novas em formação (que serão retiradas posteriormente) (Figura 12).

Fotos: Viviane Talamini

Figura 12. 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)**.

Imediatamente após o corte, deve-se envolver a amostra (tecidos tenros do meristema apical) em uma película de proteção que pode ser papel alumínio (Figura 13) ou filme plástico para envio ao laboratório. A amostra deverá ser mantida em uma temperatura entre 6° C e 10 °C até a chegada ao laboratório. O material não deverá ser congelado ou deixado em locais muito quentes, principalmente, dentro de veículos ao sol, mesmo que por curtos períodos de tempo.

Foto: Viviane Talamini

Figura 13. Proteção do meristema apical com papel alumínio.

Recomenda-se que todo o material vegetal restante, após a derrubada da planta e a dissecação e para retirada das amostras, seja destruído seguindo as recomendações da legislação vigente.

Metodologia 4

Análise das folhas novas

Depois de cortada a amostra da região meristemática, procurar na porção que corresponde à base das folhas novas, as folhas em formação, de tecidos tenros e de coloração ainda clara (creme/branco). Então, cortar o pecíolo das folhas, cerca de 20 cm, da base até o início dos folíolos (Figura 14A) e envolver a amostra em papel filme (Figura 14B). Manter a amostra em 6 °C-10 °C até a chegada ao laboratório. O material não deverá ser congelado ou deixado em locais muito quentes, principalmente, dentro de veículos ao sol, mesmo que por curtos períodos de tempo.

Fotos: Viviane Talamini

Figura 14. Corte das folhas novas e tenras do coqueiro **(A)** e proteção das amostras com papel filme **(B).**

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

Local da coleta:
Parte da planta:
Ponto 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.

Considerações finais

A etapa de coleta de amostras é uma das mais importantes no processo de diagnose molecular do fitoplasma causador do amarelecimento letal. Por esse motivo, o máximo rigor deverá ser considerado em todas as etapas, desde a correta seleção e limpeza das ferramentas a serem utilizadas, bem como do manuseio, embalagem e manutenção das amostras até a chegada ao laboratório.

Na impossibilidade da amostragem destrutiva (com corte da base do estipe), recomenda-se, se possível, além da coleta da amostra do estipe a obtenção de pelo menos uma espata (oito ou nove) para complementar a análise (método não destrutivo).

A experiência com diferentes síndromes do tipo amarelecimento letal mostra que no coqueiro, os locais mais adequados para a detecção de fitoplasmas, são: i) as espatas do coqueiro de números sete, oito e nove, no caso de coqueiros da variedade anão. Esse tipo de amostragem pode ser "não destrutiva" se for possível o alcance das mesmas, ou seja, não há necessidade de derrubar as plantas; ii) a zona meristemática e folhas novas, como foi comprovado por amostragens de plantas doentes provenientes do Caribe, embora seja destrutiva e demorada; e, iii) a amostra obtida do estipe, que é a maneira mais rápida e simples de amostrar, mas, pode gerar resultados falso negativos nas análises para o fitoplasma.

Para obtenção de um resultado confiável, em caso de suspeita de primeiro caso de amarelecimento letal no Brasil, a recomendação é coletar e enviar ao laboratório os quatro tipos de amostras apresentados: espatas (sete, oito e nove), zona meristemática, folhas jovens (novas e tenras), e estipe.

Referências

BRASIL lista 20 pragas agrícolas mais importantes que ainda não chegaram ao país. **Agência Embrapa de Notícias**, 3 out. 2017. **Disponível** em: <https://www.embrapa.br/web/mobile/noticias/-/noticia/28666392/brasil-lista-20-pragas-agricolas-mais-importantes-que-ainda-nao-chegaram-ao-pais> Acesso em: 9 nov. 2017.

DOLLET, M.; QUAICOE, R.; PILET, F. Review of coconut "Lethal Yellowing" type diseases diversity, variability and diagnosis. **Oléagineux**, Paris, v. 16, n.1, p. 97-101, mar./abr. 2009.

HARRISON, N.; HELMINCK, E. E.; ELLIOTT, M. L. Lethal yellowing-type diseases of palms associated with phytoplasmas newly identified in Florida, USA. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 153, n. 1, p. 85-94, abr. 2008.

HARRISON, N. A.; WOMACK, M.; CARPIO, M. L. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 676-681, jun. 2002.

HARRISON, N. A.; DAVIS, R. E.; OROPEZA, C.; HELMICK; E. E.; NARVAEZ, M.; EDEN-GREEN, S.; DOLLET, M.; DICKINSON, M. '*Candidatus* Phytoplasma palmicola', associated with a lethal yellowing-type disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 64, p. 1890-1899, 2014.

MYRIE, W. A.; DOUGLAS, L.; HARRISON, N. A.; MCLAUGHLIN, W.; JAMES, M. First report of lethal yellowing disease associated with subgroup 16SrIV, a phytoplasma on St. Kitts in the Lesser Antilles. **New Disease Reports**, London, v. 26, p.25, 2012.

OROPEZA, C.; CORDOVA, I.; CHUMBA, A.; NARVAEZ, M.; SAENZ, L.; ASHBURNER, R.; HARRISON, N. Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 159, p. 109-117, 2011.

PATEL, J. S. **The Coconut**: a monograph. [São Paulo]: Government Press; Madras, 1938.

PERERA, P. I. P.; HOCHER, V.; WEERAKOON, L. K.; YAKANDAWALA, D. M. D.; FERNANDO, S. C.; VERDEIL, J. L. Early inflorescence and floral development in *Cocos nucifera* L.(Arecaceae: Arecoideae). **South African Journal of Botany**, Stellenbosch, v. 76, n. 3, p. 482-492, 2010.

Comunicado Técnico, 210

Embrapa Tabuleiros Costeiros
Endereço: Avenida Beira Mar, 3250, CEP 49025-040, Aracaju, SE
Fone: (79) 4009-1344
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

1ª edição
On-line (2017)

Comitê de publicações

Presidente: **Marcelo Ferreira Fernandes**
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 e Viviane Talamini*

Expediente

Supervisora editorial: *Flaviana Barbosa Sales*
Normalização bibliográfica: *Josete Cunha Melo*
Editoração eletrônica: *Beatriz Ferreira da Cruz*