

ARTIGO



AUTORES:

*Vicente Savonitti
Miranda*¹

*Michelle Martins do
Nascimento*¹

*Luiz Sebastião
Poltronieri*²

*Benedita Elenize
Gemaque Gomes*¹

¹ Instituto de Ciências Agrárias,
Universidade Federal Rural da
Amazônia, 66.077-530, Belém,
PA, Brasil.

² Embrapa Amazônia Oriental,
66095-100, Belém, PA, Brasil.

Recebido: 04/12/2009

Aprovado: 20/05/2010

AUTOR CORRESPONDENTE:

Vicente Savonitti Miranda
Email:
vicente.miranda@ufra.edu.br

PALAVRAS-CHAVE:

Fitopatógeno,
Agente etiológico,
Cocos nucifera L.

KEY WORDS:

Phytopathogen,
????????
Cocos nucifera L.

*Etiologia de *Bipolaris incurvata*, agente causal da mancha foliar do coqueiro*

*Etiology of *bipolaris incurvata*, the causal agent of coconut palm leaf spot*

Resumo: Na fazenda Sococo, localizada no município de Moju, Pará, entre os anos de 2000 a 2002, mais de 14.000 coqueiros morreram, devido à ocorrência de uma doença cognominada mancha foliar do coqueiro. Objetivando diagnosticar o agente etiológico dessa doença, foram coletadas nesta mesma propriedade, entre agosto de 2003 e abril de 2004, amostras no campo com os sintomas típicos da mancha e, em laboratório, foram procedidos isolamentos em meio de cultura BDA. Após análises morfológicas, em cultivos com sete dias de idade, três fungos foram identificados: *Cylindrocladium pteridis*, *Bipolaris incurvata* e *Pestalotiopsis* sp. Após testes de patogenicidade em folhas destacadas e mudas do híbrido PB121, verificou-se que somente o fungo *Bipolaris incurvata* foi capaz de incitar a doença. Em inoculações com ferimentos, os sintomas macroscópicos foram observados após dois dias, enquanto que, em inoculações feitas sem ferimentos os sintomas foram observados aos oito dias após a inoculação, comprovando que *Bipolaris incurvata* é o agente causal da mancha foliar do coqueiro.

Abstract: In Sococo farm in the county of Moju, in the State of Para, more than 14,000 coconut palms were killed, between 2000 and 2002, by epidemics of a new disease known as coconut palm leaf spot, at Sococo plantations alone. In order to identify the cause, samples with typical symptoms of the disease were collected at the same farm, between August 2003 and April 2004, for subsequent laboratory analysis. In a BDA medium three species of fungus were isolated-Cylindrocladium pteridis, Bipolaris incurvata and Pestalotiopsis sp. Pathogenicity tests on detached leaves and young palm leaves of hybrid PB 121 showed that only Bipolaris incurvata caused symptoms of the disease. In inoculated plants with damage, macroscopic symptoms appeared after two days, while, in inoculated plants without damage, symptoms were observed eight days after inoculation, thereby confirming that Bipolaris incurvata is the cause of coconut palm leaf spot.

1 Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira tropical de grande valor econômico que, quando explorado em agroecossistemas de monocultivo, pode ser infectado por variados microorganismos. Esse aspecto, aliado às condições climáticas do trópico úmido, favorecem o desenvolvimento de doenças bióticas causadas por patógenos já conhecidos e eventualmente por novos patógenos introduzidos e estabelecidos (NUNES, 2000).

Na fazenda Sococo, localizada no município de Moju, no Estado do Pará, vem se destacando uma doença conhecida como “mancha foliar”, que causou, somente em fase de desenvolvimento vegetativo, a destruição de aproximadamente 14.000 plantas, entre os anos de 2000 e 2002. O quadro sintomatológico das plantas afetadas pela mancha foliar caracteriza-se inicialmente por lesões escuras (Figura 1) que, posteriormente, progridem para formas arredondadas ou ovaladas, circundadas por halo amarelo ouro e centro de coloração marrom a cinza, que coalescem e formam grandes áreas necróticas (Figura 2).

Há uma grande discussão em relação ao agente causador da mancha foliar do coqueiro. Autores como: Kobayashi (1995); Anjos, Charchar e Ramos (2000); Cardoso, Barreto e Araújo (2003) relatam ser o fungo *Pestalotiopsis* sp. o principal responsável por essa doença. Entretanto, pesquisadores como Quillec e Renard (1975); Warwick (1997), Gazel Filho et al. (1999) e Gasparotto et al. (1999) relatam em seus trabalhos ser o fungo *Bipolaris incurvata*, enquanto que Silva e Souza (1981) e Trindade e Poltronieri (1998) reportam ser *Cylindrocladium pteridis* o agente causal da mancha foliar do coqueiro.

Gasparotto et al. (1999) relataram a ocorrência dessa doença em Manaus, causada por *B. incurvata*, destacando estar a mesma relacionada à deficiência de potássio. No Pará, os resultados divergem dos apresentados por Silva e Souza (1981) e por Trindade e Poltronieri (1998), que relataram ser o patógeno *C. pteridis* o causador da mancha foliar em coqueiro.

Quanto às divergências, Anjos, Charchar e Ramos (2000) relataram ser a mancha foliar do coqueiro causada por *Pestalotiopsis guepinii*; Kobayashi (1995) identificou o fungo *Pestalotiopsis palmarum* como o agente causal da doença e Cardoso, Barreto e Araújo (2003) verificaram ser o gênero *Pestalotiopsis* o agente causal dessa doença. As diversas espécies de fungos do gênero *Pestalotiopsis* que afetam as plantas da família Arecaceae são considerados patógenos fracos e ocorrem associados a

outros patógenos (RAM, 1989) ou a insetos (ARAÚJO, GASPAROTTO; GARCIA, 1991).

Na Costa do Marfim, em um estudo preliminar, onde o cultivo das variedades de origem polinésica é comum, por serem resistentes ao amarelecimento letal, a doença foi descrita como sendo causada por *Helminthosporium halodes* (Drechs) (QUILLEC; RENARD, 1975).

Esse quadro de diversidade sobre o agente etiológico da mancha foliar em coqueiro precisou ser melhor investigado, a fim de que se pudesse realizar um preciso diagnóstico do (s) agente (s) causal (is) nas condições do Município Paraense de Moju.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi efetuar testes de patogenicidade com os isolados dos fungos associados às lesões nas folhas de coqueiro, para diagnosticar e identificar o fitopatógeno responsável pela doença.



Figura 1 - Mancha foliar causada por *Bipolaris incurvata*, caracterizada por pequenas lesões escuras



Figura 2 - Progressão das lesões causadas por *Bipolaris incurvata* (forma ovalada, circundada por halo amarelo ouro e centro de coloração cinza coalescente, formando grandes áreas necróticas).

2 Material e Métodos

2.1 Isolamento dos Microorganismos Associados às Lesões Foliares

Para o isolamento dos agentes fitopatogênicos, folhas infectadas foram coletadas e levadas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Oriental, sendo o material submetido a um prévio processo de limpeza e seleção. Em uma capela de fluxo laminar modelo CCV Clean Bench (Hitachi), foram cortados pequenos pedaços da região de transição entre a parte sadia e lesionada, colocados por três minutos em solução de álcool etílico a 70%, em seguida tratados por três minutos em solução de hipoclorito de sódio (NaOH) a 1%, e posteriormente lavados, por cinco minutos, em água destilada esterilizada e colocados sobre papel filtro esterilizado.

O isolamento do patógeno foi feito utilizando-se o meio de cultura ágar - água (15 g L⁻¹ de H₂O) em placas de Petri com 9 cm de diâmetro. Em cada uma das dez placas contendo o meio de cultura foram colocados três pedaços do tecido foliar previamente desinfestados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 48 horas. Após este período foi feita a repicagem, retirando-se com estilete a extremidade do micélio do fungo e transferindo-o para os dez tubos de ensaios contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) (39 g L⁻¹). Os tubos de ensaio foram incubados sob luz contínua à distância de 40 cm da fonte e à temperatura ambiente de 26 °C ± 2 °C. Os isolados obtidos foram então submetidos à esporulação em placas de Petri contendo BDA, para produção do inóculo para os testes de patogenicidade.

2.2 Identificação dos Isolados

Após o crescimento micelial, efetuou-se a repicagem para tubos de ensaios com meio de cultura e, após sete dias, obteve-se a cultura pura de três fungos que, após estudos morfológicos dos micélios e esporos produzidos *in vitro*, foram identificados como: *Cylindrocladium pteridis*, *Bipolaris incurvata* e *Pestalotiopsis* sp. (QUILLEC; RENARD, 1975; ALEXOPOULOS; MINS, 1979; CROUS, 2002).

2.3 Produção do Inóculo

O isolado de *C. pteridis* foi cultivado em meio de cultura BDA sob luz contínua, durante 12 dias. Após o crescimento do fungo em toda a superfície do meio de cultura contido na placa de Petri, lavou-

se a superfície da colônia com água estéril e, com o auxílio de um pincel de cerdas macias, o micélio aéreo foi removido, sendo acrescentado à cultura 15 ml de água destilada esterilizada, mantendo-a submersa por dois dias. Em seguida, a água contida na placa foi descartada e a cultura foi mantida sob luz difusa por mais dois dias (ALFENAS; ZAUZA; MAFIA, 2004). Para a produção de inóculo de *B. incurvata* foi utilizado o meio de cultura Kzapec-Dox, mantendo-se as colônias em um regime de 12 horas no escuro e 12 horas sob luz ultravioleta, por um período de quatro a cinco dias. A produção do inóculo de *Pestalotiopsis* sp. foi obtida em meio de cultura BDA, sob luz difusa, por um período de sete dias de incubação.

2.4 Testes de Patogenicidade

Os testes de patogenicidade em folhas destacadas foram realizados em ambiente de laboratório, utilizando-se micélio dos isolados em meio BDA com sete dias de incubação. Oito folhas de coqueiro PB123, com oito meses de idade e isentas de manchas foliares foram submetidas às inoculações artificiais, com e sem ferimentos, utilizando-se discos de 0,5 cm de diâmetro dos diferentes isolados. Para o ensaio, foram estabelecidos dois grupos de quatro folhas: no primeiro, cinco folíolos receberam ferimentos com agulha esterilizada; o segundo sem ferimentos. Sobre os ferimentos e folíolos intactos foram colocados discos de micélio dos diferentes isolados em pontos distintos. Em cada grupo, uma folha foi tomada como testemunha, utilizando-se para as inoculações apenas discos de BDA. Em seguida, as folhas foram colocadas dentro de sacos plásticos transparentes e umedecidos, para formar uma câmara úmida com a base do pecíolo envolvida por algodão hidratado com água. Diariamente realizavam-se observações para registrar o período de incubação, caracterizado pelo espaço de tempo decorrido entre a inoculação e o aparecimento macroscópico dos sintomas.

Em mudas, o experimento foi conduzido no município de Moju-PA, na propriedade do grupo Sococo S/A, localizada nas margens da rodovia PA-252, km 38, que liga o município de Moju à cidade de Acará, nas coordenadas geográficas 02°07'00"S e 48 de longitude W, entre os rios Moju e Acará - PA, distando 80 km de Belém. A região apresenta clima quente e úmido, com pluviosidade anual em torno de 2.800 mm e solo do tipo latossolo amarelo. A cultura é manejada com alto padrão tecnológico

desde o preparo da área, muda, plantio, adubação balanceada, até o monitoramento de pragas e doenças.

Os testes de patogenicidade foram realizados através de inoculação por aspersão em mudas de coqueiro híbrido PB123 que apresentavam oito meses de idade e foram produzidas como se fossem para plantio comercial. Para cada tratamento foram utilizadas dez mudas, totalizando quarenta mudas, incluindo a testemunha. Das dez plantas, cinco foram mantidas sem ferimentos e cinco foram submetidas a ferimentos nos folíolos, com agulha esterilizada. O inóculo de cada fungo (*C. pteridis*, *B. incurvata* e *Pestalotiopsis* sp.) foi preparado na concentração de 1×10^8 conídios mL^{-1} e aplicado por aspersão sobre os folíolos das mudas. As mudas testemunhas receberam aspersão com água esterilizada. Após a inoculação e a aspersão com água nas testemunhas, as mudas foram cobertas com plástico transparente por 72 horas, para produzir a umidade necessária para as fases de germinação e penetração do fungo no tecido vegetal. As plantas inoculadas foram mantidas à distância de 50 cm uma das outras e submetidas a regime de nebulização por 72 horas, para manutenção da umidade no ambiente do telado. A avaliação foi realizada no décimo quarto dia após a inoculação.

3 Resultados e Discussão

3.1 Teste de Patogenicidade

A reação de folhas destacadas no campo e levadas para o laboratório e de folhas de mudas de coqueiro da variedade PB123 com oito meses de idade ao teste de patogenicidade realizado com os fungos *C. pteridis*, *B. incurvata* e *Pestalotiopsis* sp., em inoculações realizadas com e sem ferimentos, mostrou que somente o fungo *Bipolaris incurvata* causou infecção tanto nas folhas sem, quanto nas folhas com ferimento, após o período de incubação. O período de incubação foi de dois dias em folhas com ferimentos e de oito dias em folhas sem ferimentos.

Os sintomas produzidos nos testes de patogenicidade pelo fungo *B. incurvata* nas folhas coletadas no campo e nas mudas obtidas do viveiro (Figuras 3 e 4) caracterizaram-se por apresentar lesões semelhantes às observadas no campo (Figura 2).

No Brasil, Warwick et al. (1998) e Gazel Filho et al. (1999) relataram ser *B. incurvata* o agente causal da mancha foliar em coqueiro, concordando com o resultado deste trabalho.

As divergências encontradas entre os relatos do agente causal da mancha foliar do coqueiro são, provavelmente, devidas ao sinergismo provocado pela ocorrência desses três patógenos. O presente trabalho revela que apenas *B. incurvata* mostrou capacidade de iniciar o processo infeccioso, sugerindo que os outros fungos, *C. pteridis* e *Pestalotiopsis* sp., associados às lesões da mancha foliar, atuam como secundários ou oportunistas. Este é o primeiro relato de *B. incurvata* como o agente causal da mancha foliar do coqueiro no Estado do Pará. Nas condições ambientais da região Norte, *C. pteridis* e *Pestalotiopsis* sp. foram considerados fungos secundários ou oportunistas.



Figura 3 - Sintoma de mancha no viveiro

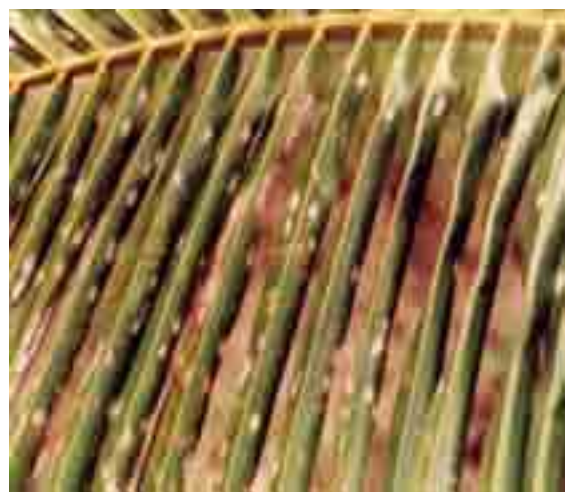


Figura 4 - Sintoma de mancha no campo provocado por *Bipolaris incurvata* provocado por *B. incurvata*

4 Conclusão

Nos testes realizados ficou comprovado que *Bipolaris incurvata* é o agente causal da mancha foliar do coqueiro nas condições ambientais, na Região Norte do Brasil.

Os fungos *Cylindrocladium pteridis* e *Pestalotiopsis* sp. são agentes secundários ou oportunistas.

Referências

- ALEXOPOULOS, C.J.; MINS, C.W. *Introductory mycology*. 4th ed. New York: J. Wiley, 1979. 632p.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V.; MAFIA, R.G.A. *Clonagem e doenças do eucalipto*. Viçosa: Editora da UFV, 2004. 442p.
- ANJOS, J.R.N.; CHARCHAR, M.J.A.; RAMOS, V.H.V. Manchas foliares causadas por *Pestalotiopsis guepinii* em coqueiro no Distrito Federal. *Fitopatologia Brasileira*, v.25, n.2, p.203, 2000.
- ARAÚJO, J.C.A.; GASPAROTTO, L. de; GARCIA, M.V.B. Epidemiologia de *Pestalotiopsis* spp em dendezeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.16, n.2, p.33, 1991.
- CARDOSO, D.C.; BARRETO, L.; ARAÚJO, E. Etiologia e progresso de mancha de *Pestalotia* do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), em São Gonçalo, Paraíba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.25, n.2, 2003.
- CROUS, P.W. *Taxonomy and pathology of Cylindrocladium (calonectria) and Allied Genera*. St. Paul: APS Press, 2002. 278p.
- GASPAROTTO, L. et al. *Mancha foliar do coqueiro causada por Bipolaris incurvata*. Manaus: Embrapa, 1999. (Instruções Técnicas, 2).
- GAZEL FILHO, A.B.; POLTRONIERI, L.S.; MENEZES, A.J.E.A. de; LIMA, J.A. de S. *Ocorrência de Helminthosporiose (Dreschlera incurvata) em coqueiro (Cocos nucifera L) no Estado do Amapá*. Macapá: Embrapa Amapá, 1999. (Comunicado Técnico, 26).
- KOBAYASHI, T. Coconut palm diseases. In: TANAKA, H.; HIROYUKI, I.; TOKUJI, K. *Diseases of tropical fruit trees*. Tokio: Aicaf, 1995. p.79-82.
- NUNES, M.A.L. *Comportamento ecofisiológico de bananeiras (Musa spp) em solo artificialmente infestado com Fusarium oxysporum f. sp. cubense (E. F. Smith) Sn. & Hansen*. 2000. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – UFPA. Centro de Ciências Biológicas/ MPEG/Embrapa Amazônia Oriental, Belém, 2000.
- QUILLEC, G.; RENARD, J.L. L'helminthosporiose du cocotier: études préliminaires. *Oleagineaux*, v. 30, n.5, p.209-213, 1975.
- RAM, C.. Microflora associada à queima-das-folhas do coqueiro. *Fitopatologia Brasileira*, v.14, n.4, p.36-38, 1989.
- SILVA, G.S.; SOUZA, E.A.P. Mancha foliar do coqueiro causada por *Cylindrocladium pteridis* Wolf. *Fitopatologia Brasileira*, v.6, n.3, p.515-517, 1981.
- TRINDADE, D.R.; POLTRONIERI, L.S. Ocorrência de mancha foliar em coqueiro causada por *Cylindrocladium pteridis* no Estado do Pará. *Fitopatologia Brasileira*, v.1, n.3, p.412, 1998.
- WARWICK, D.R.N. Coco: (*Cocos nucifera* L.): controle de doenças. In: VALE, F.X.R. do; ZAMBOLIM, L. (Eds.). *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*. Viçosa: UFV; Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento, 1997. p.765-789.