



**Ministério
da Agricultura
e do Abastecimento**

Circular Técnica

ISSN 0103-6424

Número 06

Outubro, 2000

**COMO COLETAR, PRESERVAR E REMETER
CORRETAMENTE AMOSTRAS PARA EXAME
FITOPATOLÓGICO**



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Marcus Vinicius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Diretor-Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela B. Brito da Cunha

José Roberto Rodrigues Peres

Dante Daniel Giacomelli Scolari

Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical

Chefe-Geral

Francisco Férrer Bezerra

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Levi de Moura Barros

Chefe Adjunto de Administração

Paulo César Espíndola Frota

Circular Técnica Nº 06

ISSN 1413-8212
Setembro, 2000

**COMO COLETAR, PRESERVAR E REMETER
CORRETAMENTE AMOSTRAS PARA EXAME
FITOPATOLÓGICO**

Francisco das Chagas Oliveira Freire



© Embrapa Agroindústria Tropical, 2000

Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 06

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical

Rua Dra. Sara Mesquita 2270

Planalto Pici

Caixa Postal 3761

CEP 60511-110 Fortaleza, CE

Tel. (085) 299-1800

Fax: (085) 299-1803 / 299-1833

Endereço eletrônico: negocios@cnpat.embrapa.br

Tiragem: 300 exemplares

Comitê de Publicações

Presidente: Raimundo Braga Sobrinho

Secretário: Marco Aurélio da Rocha Melo

Membros: João Ribeiro Crisóstomo

José Carlos Machado Pimentel

José de Souza Neto

Oscarina Maria da Silva Andrade

Heloísa Almeida Cunha Filgueiras

Maria do Socorro Rocha Bastos

Coordenação editorial: Marco Aurélio da Rocha Melo

Acompanhamento gráfico: Arilo Nobre de Oliveira

Revisão: Maria Emília de Possídio Marques

Normalização bibliográfica: Rita de Cassia Costa Cid

FREIRE, F. das C.O. **Como coletar, preservar e remeter corretamente amostras para exame fitopatológico.** Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000. 15p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Circular Técnica, 06).

1. Exame fitopatológico; Coleta; Amostra; Preservação;
Phytopathological tests; Collection; Sample; Preservation.

CDD 581.2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
2	OBTENÇÃO DE INFORMAÇÕES	6
3	COLETA, PRESERVAÇÃO E REMESSA DO MATERIAL VEGETAL	9
4	COLETA, PRESERVAÇÃO E REMESSA DE AMOSTRAS DE SOLO E RAÍZES	11
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	14
6	REFERÊNCIAS	15

COMO COLETAR, PRESERVAR E REMETER CORRETAMENTE AMOSTRAS PARA EXAME FITOPATOLÓGICO

Francisco das Chagas Oliveira Freire¹

1 INTRODUÇÃO

O profissional em fitopatologia é freqüentemente requisitado a fornecer laudos e elaborar pareceres acerca de problemas supostamente causados por fitopatógenos. A rápida identificação do problema pelo fitopatologista e a solução adequada para resolvê-lo podem representar, para o produtor, a diferença entre o lucro e o prejuízo, máxime considerando-se os elevados custos atuais de produção. Evidentemente, o diagnóstico mais preciso é aquele realizado *in loco* pelo próprio especialista. Entretanto, em virtude do pequeno número de fitopatologistas, das distâncias geográficas dos plantios e da diversidade das culturas, amostras vegetais são freqüentemente remetidas para exame em laboratório.

Desse modo, a situação usualmente encontrada pelo fitopatologista é o exame de amostras coletadas por outras pessoas, em geral agrônomos de outras especialidades, extensionistas, líderes comunitários ou, ainda, pelos próprios produtores interessados. Assim, para a precisa identificação do organismo envolvido no processo infeccioso e, em última análise, para a elaboração adequada do diagnóstico e das medidas de controle, torna-se imprescindível a correta coleta de amostras que representem, o mais próximo possível, a situação observada no campo, na sementeira, no viveiro ou na casa-de-vegetação. Por outro lado, existem poucas informações específicas sobre os métodos para a coleta de amostras para exame fitopatológico. Ademais, as informações existentes encontram-se dispersas em livros e em outros textos especializados (Tuite, 1969; Strobel, 1970; Streets, 1975; Freire, 1986).

¹ Eng.-Agr., Ph.D., Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical. Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Planalto Pici, CEP 605115-110 Fortaleza, Ceará. End. eletrônico: freire@cnapat.embrapa.br

É por demais conhecida entre os fitopatologistas a dificuldade de se analisar amostras vegetais coletadas por pessoas não familiarizadas com a atividade fitopatológica. Em sua grande maioria, essas amostras chegam ao laboratório já deterioradas e sem condições para um diagnóstico preciso, quase sempre por terem sido imprópriamente coletadas e/ou acondicionadas de maneira incorreta.

O presente trabalho tem como objetivos básicos focar os métodos de coleta e preservação de amostras de interesse fitopatológico, enfatizando a adequada amostragem do material a ser remetido ao laboratório, de modo a facilitar, ao fitopatologista, a identificação do agente etiológico envolvido no parasitismo e, ao produtor, a indicação das medidas a serem adotadas para seu controle.

2 OBTENÇÃO DE INFORMAÇÕES

Antes do início da coleta e posterior diagnose de uma fitomoléstia, o passo principal é se obter uma visão realística da situação ocorrente no campo, na sementeira, no viveiro ou na casa-de-vegetação. Essa etapa envolve uma criteriosa inspeção das plantas, além de uma entrevista com o proprietário ou pessoa encarregada, com o intuito de se obterem informações básicas sobre o plantio. Caso o produtor seja também o responsável pela coleta do material, ele mesmo deverá prestar as informações pertinentes ao problema verificado em seu plantio. Como os produtores quase sempre desconhecem a importância dessas informações, cabe ao extensionista ou a qualquer outra pessoa encarregada da coleta das amostras, obtê-las de modo o mais correto possível.

Um aspecto importante é se atentar para a distribuição do problema na área examinada. Isto poderá oferecer importantes informações quanto às características do possível agente causal, indicando se é de hábito aéreo ou de solo. Caso o problema esteja espalhado regularmente em uma determinada área, isto pode sugerir tratar-se de um patógeno de hábito aéreo. Caso as plantas doentes se distribuam em pequenas áreas, mais ou menos circulares, poderá ser um indicativo de ataque por organismos de solo, como certos fungos, nematóides ou bactérias.

Uma diversidade enorme de fatores pode causar sintomas semelhantes, confundindo e dificultando a obtenção de informações. Algumas vezes, sintomas precipitadamente atribuídos a fitomoléstias são, na realidade, causados por outros fatores, tais como injúrias por implementos

agrícolas, aplicação errônea de defensivos, herbicidas ou, de modo bastante comum, por deficiência de macro e micronutrientes, presença de elementos tóxicos no solo ou mal drenagem do solo. Ataques de insetos podem, também, ser confundidos com fitomoléstias. Em qualquer circunstância, entretanto, a obtenção de informações de amostragens corretas serão decisivas para que o fitopatologista encontre a causa definitiva do problema (Heald, 1937; Gonzalez, 1976; Ayoub, 1980).

Nas partes 1 e 2 da Tabela 1, encontram-se sumariadas as perguntas indispensáveis, que deverão ser formuladas quando da coleta do material a ser examinado.

TABELA 1. Ficha de informações (partes 1 e 2) a ser preenchida durante a coleta de amostras de partes vegetais ou de solo.

2.1 Informações Gerais (Parte 1)

Nome do proprietário ou interessado _____

Local e data da coleta _____

Nome vulgar e/ou científico da planta _____

Idade da planta _____

Procedência das sementes ou mudas _____

Área cultivada _____

Porcentagem aproximada de ataque _____

Cultura plantada anteriormente _____

Tratamento fitossanitário

Fungicida (dose, intervalo de aplicação) _____

Outros (dose, intervalo de aplicação) _____

Adubação

Fórmula _____

Época de aplicação _____

Tipo de solo

Arenoso _____

Argiloso _____

Argilo-arenoso _____

Drenagem (ruim, razoável, boa, excelente) _____

Clima (atualmente)

Seco _____

Úmido _____

TABELA 1. (Continuação)

2.2 Sintomas Observados (Parte 2)

Na planta em geral

Murcha total ou parcial _____

Amarelecimento _____

Desfolhamento _____

Podridão _____

Morte _____

Nas folhas

Queima total ou parcial _____

Clorose total ou parcial _____

Manchas arredondas ou irregulares _____

Enrugamento _____

Cortadas ou perfuradas _____

No caule e nas raízes

Lesões deprimidas ou não _____

Lesões secas ou úmidas (resinas, gomas) _____

Galerias ou perfurações _____

Podridão _____

Nos frutos

Podridão seca ou úmida _____

Localização das lesões (apical, peduncular, generalizada) _____

Características das lesões (superficiais, profundas) _____

Queda precoce dos frutos _____

Fendilamentos ou rachaduras _____

Perfurações _____

3 COLETA, PRESERVAÇÃO E REMESSA DO MATERIAL VEGETAL

É sempre oportuno ressaltar a necessidade de se processar uma amostragem representativa do problema. Como fitopatógenos raramente atacam as plantas de modo uniforme, algumas estarão mortas e totalmente imprestáveis para o exame, enquanto outras estarão exibindo os sintomas ainda em seus estádios iniciais, ou mesmo sem sintomas, embora já infectadas. Sem dúvida, as amostras mais importantes são aquelas coletadas quando as plantas exibem os sintomas iniciais da doença ou das alterações supostamente consideradas como doença. Caso represente de fato uma enfermidade, as plantas coletadas com os sintomas iniciais contêm, quase sempre, apenas o organismo causal (patógeno), facilitando seu isolamento e identificação, quando necessários. Ao contrário, amostras coletadas a partir de plantas já completamente mortas (dessecadas ou apodrecidas) normalmente não possuem valor fitopatológico, tendo em vista mostrarem-se totalmente invadidas por organismos secundários (organismos sem qualquer relação com o quadro sintomatológico inicial) (Shurtleff, 1966; Horsfall, 1977).

O quadro sintomatológico observado deverá orientar o responsável pela coleta quanto à necessidade de serem obtidas plantas inteiras ou apenas partes destas. Se a doença mostrar-se localizada, na forma de manchas necróticas, a coleta de folhas, parte dos ramos ou frutos individuais é suficiente para um diagnóstico seguro. No caso de a doença mostrar-se amplamente disseminada por toda a planta, é conveniente coletarem-se secções consideráveis do caule e das raízes ou, até mesmo, a planta inteira. Logicamente, existem algumas particularidades que devem ser destacadas. Em se tratando de plantas hortícolas, mudas, plantas envasadas ou outras plantas herbáceas, não há nenhum inconveniente em se coletar plantas inteiras. Esse procedimento é até recomendável quando as plantas supostamente infectadas exibem sintomas de murcha ou quando não se tem certeza de que se trata, na realidade, de uma fitomoléstia. Claro que para plantas perenes ou árvores, a coleta e a remessa de plantas inteiras é praticamente inviável. Em tais situações, deverão ser coletadas apenas as partes onde se supõe que o patógeno possa estar localizado. Por exemplo, no caso de morte descendente, coletam-se ramos contendo a parte já necrosada e a parte ainda aparentemente sadia. É exatamente na zona de transição dos tecidos infectados e sadios onde se tem as melhores chances de isolar o patógeno. Se os sintomas principais são típicos de uma murcha, convém coletar raízes e uma secção do caule, próximo ao solo.

Após a coleta representativa das amostras, o passo seguinte, e de importância fundamental, é preservá-las adequadamente para a remessa ao especialista.

Amostras de plantas hortícolas e de outras plantas herbáceas deverão ser colocadas em sacos de papel, fechados, devidamente etiquetados (identificados), e remetidas, o mais rápido possível, ao laboratório, acompanhadas da ficha de informações. A remessa em sacos plásticos deve ser evitada, em virtude de favorecer o acúmulo excessivo de umidade e, conseqüentemente, o desenvolvimento de organismos secundários, os quais não estão diretamente relacionados com o processo infeccioso. Caso se disponha apenas de sacos plásticos, algumas medidas poderão ser utilizadas para evitar a umidade excessiva. A fim de se reduzir os inconvenientes mencionados, diversos orifícios deverão ser feitos nos sacos, além de deixá-los abertos. O período máximo entre a coleta e a chegada do material ao laboratório não deverá exceder 48 horas. Caso contrário, as amostras tornar-se-ão imprestáveis para o exame fitopatológico e/ou isolamento, em virtude do secamento das amostras (no caso de folhas e ramos), de sua deterioração (órgãos suculentos) ou do excessivo crescimento de organismos secundários. No caso de as amostras não poderem ser enviadas para exame no mesmo dia da coleta, deverão ser mantidas em geladeira, fora do congelador, até que possam ser remetidas para exame. O ideal, entretanto, é coletá-las e enviá-las para o especialista no mesmo dia. Caso as amostras necessitem percorrer um longo caminho até o laboratório, poderão ser preservadas em boas condições para o exame, desde que acondicionadas em sacos plásticos (não perfurados) e mantidas dentro de uma caixa de isopor, com cubos de gelo.

Amostras coletadas de plantas perenes e árvores (troncos, secções de caule, de estipe ou raízes) poderão ser remetidas ao laboratório em caixas grandes de papelão ou mesmo em sacos novos de aniagem. O que define a melhor forma de acondicionar o material é o meio de transporte do local de coleta até o laboratório. Uma embalagem que proporcione maior proteção torna-se necessária quando as amostras são remetidas por transporte aéreo. Quando enviadas pelo serviço normal de correios, em virtude da demora freqüente de alguns dias, as amostras chegam ao laboratório, na maioria das vezes, sem condições para uma diagnose precisa. Contudo, independente do meio de transporte utilizado, o aspecto mais importante para o sucesso do diagnóstico é o período decorrido entre a coleta da amostra e sua chegada ao laboratório, o qual não deverá ultrapassar 48 horas.

4 COLETA, PRESERVAÇÃO E REMESSA DE AMOSTRAS DE SOLO E RAÍZES

A coleta de amostras de solo e raízes para exame fitopatológico justifica-se, principalmente, quando se suspeita de ataque por nematóides nas partes subterrâneas das plantas. No caso de nematóides das galhas (nematóides que causam tumores ou pipocas nas raízes), os sintomas podem ser facilmente reconhecidos. Para os demais grupos de nematóides (ectoparasitas, endoparasitas migradores e semi-endoparasitas), torna-se difícil diagnosticar suas presenças em campo. Muito embora os nematóides estejam infectando as plantas, os sintomas nem sempre são visíveis na parte aérea. Ademais, mesmo que as plantas estejam exibindo os sintomas na parte aérea, estes podem ser facilmente confundidos com sintomas causados por outros organismos, pela toxicidade de elementos no solo ou por deficiência de macro e micronutrientes. Em face da dificuldade de se diagnosticar os danos causados por nematóides, apenas com base nos sintomas visuais em campo é que as amostras de solo são processadas em laboratório, a fim de se determinar os nematóides presentes. Devido às pequenas dimensões dos nematóides, este método requer a utilização de exames microscópicos.

Amostras para exame nematológico devem ser coletadas sempre que as plantas exibam crescimento retardado, sintomas de deficiência nutricional, comumente formando reboleiras dentro do plantio, plantas com baixa produção e cloróticas. Plantas perenes e árvores, quando severamente infestadas, mostram sintomas de declínio. Em tais situações, um plano consistente para a coleta de amostras de solo e raízes deve ser estabelecido. As amostras deverão ser coletadas nas áreas onde as plantas exibam os sintomas suspeitos do ataque, bem como naquelas onde as plantas estão aparentemente saudáveis. Amostras de raízes, principalmente de raízes secundárias (mais finas), devem ser coletadas juntamente com o solo. Raízes com aparência sadia deverão ser, preferencialmente, coletadas considerando-se que naquelas já totalmente necrosadas quase sempre os nematóides já migraram ou foram destruídos. Contudo, uma amostra de raízes com sintomas de necrose deve ser também incluída. Para plantas como bananeira e gravioleira, nematóides fitopatogênicos podem ser facilmente isolados a partir de raízes com sintomas de necrose, mas não de raízes completamente apodrecidas.

Normalmente, as amostras de solo poderão ser coletadas com as raízes, sem que as plantas sejam destruídas ou arrancadas. Entretanto, não existe nenhum inconveniente em se coletar a planta inteira, da qual deverão ser aproveitados apenas o sistema radicular e o solo da rizosfera (solo em torno das raízes). A amostra de solo e raízes, quando representativamente coletada, é suficiente para fornecer um quadro realístico do nível populacional dos nematóides presentes na área plantada. Modelos matemáticos têm sido desenvolvidos para se determinar o melhor método e o mais adequado número de amostras e subamostras para a coleta e o exame de nematóides presentes no solo e nas raízes (Southey, 1970; Barker, 1985). Contudo, a mesma metodologia adotada para coleta de amostras para exame de fertilidade de solo é suficiente para um diagnóstico preciso (Fig. 1). Deste modo, em plantios com 1 a 2 hectares, um total de 20 a 30 amostras de solo e raízes, perfazendo um volume equivalente a 2 ou 3 kg, tem se mostrado adequado para exame desse tipo. Cinquenta gramas de raízes deverão ser coletados, por hectare. Ao final da coleta, o solo deverá ser misturado e uma subamostra de 500 g apenas deverá ser remetida ao laboratório para exame. Logicamente, o mesmo procedimento deverá ser tomado com relação às áreas do plantio onde as plantas se mostram aparentemente sadias.

Durante a coleta das amostras, o solo e as raízes superficiais devem ser rejeitados. A razão para tal procedimento é que, em virtude da rápida flutuação de temperatura e umidade nas camadas superficiais do solo, o número de nematóides varia enormemente. Após a limpeza da camada superficial as amostras deverão ser coletadas nos primeiros 20 cm do solo. Devido à dificuldade de se obter um trado, as amostras poderão ser coletadas com o auxílio de uma pá de transplântio ou até de um enxadeco. No caso de plantas de grande porte, além da coleta de raízes e solo, uma ou mais plantas inteiras poderão ser coletadas, enviando-se o sistema radicular completo, com o solo aderente.

Durante a coleta, as amostras poderão ser colocadas em um balde plástico ou em um saco plástico de 5 kg. Ao final da coleta, após a mistura das amostras, uma subamostra de 500 g deverá ser acondicionada em saco plástico, bem fechado para evitar dessecação, devidamente identificada e remetida o mais rápido possível ao laboratório, acompanhada da ficha de informações (Tabela 1). As amostras de raízes poderão ser enviadas junto com o solo ou separadas, em um saco plástico bem fechado. Do mesmo modo que as amostras de partes vegetais, as amostras de solo e raízes deverão chegar ao laboratório em um período

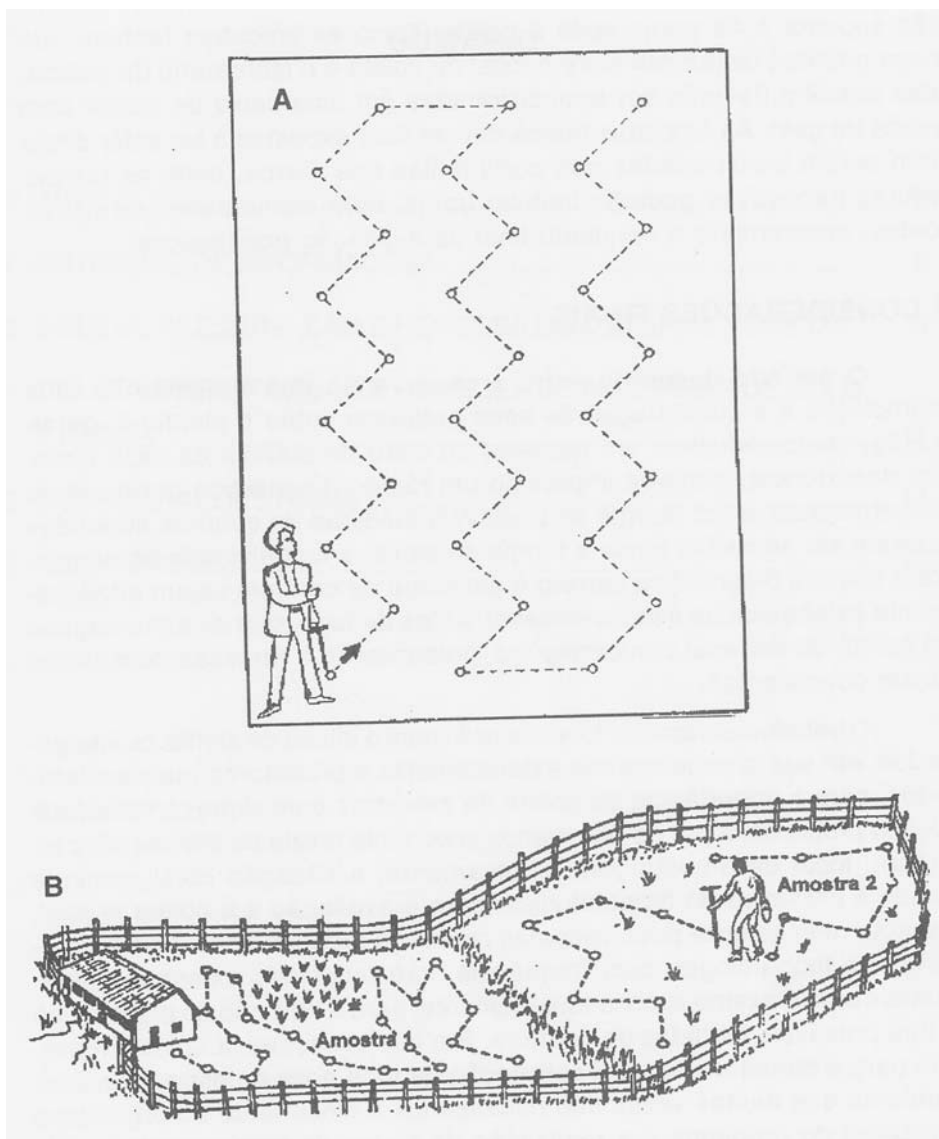


FIG. 1. Representação esquemática (A e B) para a coleta de amostras de solo e raízes para exame nematológico.

não superior a 48 horas após a coleta. Caso as amostras tenham que viajar grandes distâncias entre o local de coleta e o laboratório de exame, elas também deverão ser acondicionadas em uma caixa de isopor com cubos de gelo. As amostras nunca devem ficar expostas à luz solar direta nem serem transportadas nos porta-malas dos carros, onde as temperaturas excessivas poderão inativar um número considerável de nematóides, mascarando o resultado final da avaliação populacional.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O período decorrido entre a observação dos sintomas de uma fitomoléstia e a constatação de seus prejuízos sobre o plantio é, geralmente, muito reduzido, em especial no caso de plantas de ciclo curto. Em decorrência, torna-se imperioso um rápido diagnóstico por parte do fitopatologista, a fim de que as possíveis medidas de controle sugeridas possam ser adotadas ainda a tempo de salvar a lucratividade do plantio. Para que um diagnóstico correto e um plano de controle sejam eficientemente estabelecidos é indispensável, antes de tudo, que as amostragens de coleta de material e informações, preservação e remessa do material sejam consistentes.

O trabalho em apreço foi elaborado com o intuito de alertar os interessados, em sua grande maioria extensionistas e produtores mais esclarecidos, para a importância da coleta de amostras com representatividade real do problema, a par da não menos importante coleta de informações no próprio local de amostragem. Logicamente, a situação ideal continua sendo a presença do fitopatologista para a avaliação e a coleta *in loco*, aspecto nem sempre possível pelas razões já mencionadas. Nos laboratórios de fitopatologia, com frequência, são recebidas amostras inadequadas para o exame e, conseqüentemente, para a emissão do diagnóstico e das prováveis medidas de controle. Em tais situações, a única alternativa para o fitopatologista é a solicitação de uma nova amostra. Considerando-se que muitas vezes são necessários o isolamento do organismo causador do problema e a realização de testes de patogenicidade, um período mais ou menos longo deve ser permitido entre o exame do material e o diagnóstico final. O envio de amostras impróprias, ocasionando a necessidade de uma nova coleta, concorre para o atraso do diagnóstico do especialista, tornando, muitas vezes, sem qualquer utilidade todo o esforço do fitopatologista em analisar o material e propor medidas de controle.

Cabe, portanto, antes de se exigir a elaboração de um diagnóstico rápido e correto, a realização da coleta de informações e amostras representativas, bem como a remessa das informações e amostras em condições satisfatórias para um exame acurado e em tempo hábil.

6 REFERÊNCIAS

- AYOUB, S.M. **Plant nematology**: an agricultural training aid. Sacramento: NemaAid Publication, 1980. 195p.
- BARKER, K.R. Sampling nematode communities. In: BARKER, K.R.; CARTER, C.C.; SASSER, J.N., eds. **An advanced treatise on *Meloidogyne***. North Carolina: North Carolina State Graphics, 1985. v.2. p.3-17.
- GONZALEZ, L.C. **Introducción a la fitopatología**. San José: IICA, 1976. 148p. (IICA. Libros y materiales educativos, 29).
- FREIRE, F. das C.O. **Considerações sobre a coleta de amostras para exame fitopatológico**. Belém: Embrapa-CPATU, 1986. 16p. (Embrapa-CPATU. Documentos, 37).
- HEALD, F.D. **Introduction to plant pathology**. New York:: McGraw-Hill, 1937. 579p.
- HORSFALL, J.G.; COWLING, E.B. **Plant disease**: an advanced treatise. New York: Academic Press, 1977. v.1. 465p.
- SHURTLEFF, M.C. **How to control plant disease in home and garden**. 2.ed. Ames: Iowa State University, 1966. 649p.
- SOUTHEY, J.F. **Laboratory methods for work with plant and soil nematodes**. London: Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Her Majesty's Stationery Office, 1970. 148p. (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Her Majesty's Stationery Office. Technical Bulletin, 2).
- STREETS, R.B. **The diagnosis of plant diseases**: a field and laboratory manual emphasizing the most practical methods for rapid identification. Tucson: University of Arizona, 1975. 130p.
- STROBEL, G.A.; MATHRE, D.E. **Outlines of plant pathology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1970. 485p.
- TUITE, J. **Plant pathological methods**. Minnesota: Burgess, 1969. 239p.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270 Pici 60511-110 Fortaleza - Ceará
Telefone (0--85) 299.1800 Fax (0--85) 299.1833
www.cnpat.embrapa.br

**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO ABASTECIMENTO**

**GOVERNO
FEDERAL**
Trabalhando em todo o Brasil