

## MATERIAL DE APOIO À DISCIPLINA FITOPATOLOGIA

Departamento de Fitopatologia, ESALQ-USP

### SINTOMATOLOGIA E DIAGNOSE DE DOENÇAS DE PLANTAS

Sintomatologia é o estudo dos sintomas de doenças, de grande utilidade na diagnose. Qualquer manifestação das reações da planta a um agente nocivo pode ser considerada **sintoma**. Estruturas do patógeno, quando exteriorizadas no tecido doente, recebem o nome genérico de **sinal**. Deste modo, uma lesão na folha do cafeeiro, exibindo urediniósporos do fungo *Hemileia vastatrix*, é o sintoma da ferrugem do cafeeiro, onde estão presentes sinais (esporos) do agente causal. Durante o desenvolvimento de uma doença, diferentes sintomas sucedem-se em uma determinada sequência. Voltando à ferrugem do cafeeiro, o primeiro sintoma da infecção por *H. vastatrix* manifesta-se como uma pequena mancha amarelada, de 1 a 2 mm de diâmetro, denominada “fleck”, na face inferior da folha, que corresponde ao início da colonização dos tecidos do hospedeiro. Gradativamente, esta mancha aumenta de tamanho, apresentando-se circular, até atingir 1 a 2 cm. Neste ponto, a face superior da folha mostra uma mancha lisa e amarela, à qual corresponde, na face inferior, uma mancha alaranjada, com uma massa pulverulenta, saliente, constituída de urediniósporos do fungo. A sequência completa ou o conjunto de sintomas determinados por uma doença é conhecido por **quadro sintomatológico**.

Os sintomas de doenças de plantas podem ser classificados de acordo com vários critérios. Pode-se, por exemplo, separar os sintomas de acordo com sua localização em relação ao patógeno, com as alterações produzidas no hospedeiro ou, ainda, com a estrutura e/ou processo do hospedeiro afetados

De acordo com a localização dos sintomas em relação ao patógeno, pode-se separá-los em dois grupos: **sintomas primários**, resultantes da ação direta do patógeno nos órgãos que exibem os sintomas, e **sintomas secundários** ou **reflexos**, exibidos pela planta em órgãos distantes do local de ação do patógeno. Uma mancha foliar é exemplo do primeiro tipo e uma murcha provocada por um patógeno radicular ou vascular é exemplo do segundo.

Doenças podem provocar sintomas **plásticos**, que alteram o hábito de crescimento da planta como, por exemplo, superbrotamento ou nanismo. Em contraposição a estes tipos de sintomas, algumas doenças provocam **sintomas necróticos**, os quais não interferem com o hábito de crescimento, mas alguns órgãos são particularmente danificados. Manchas necróticas são exemplos de sintomas lesionais.

Os sintomas necróticos são caracterizados pela degeneração do protoplasma, seguida de morte de células, tecidos e órgãos. Alguns patossistemas exibem, em seu quadro sintomatológico, alguns sintomas que precedem à necrose, como amarelecimento, encharcamento e murcha.

Os sintomas plásticos são caracterizados por anomalias que levam a alterações visíveis na forma ou no conteúdo de tecidos doentes. Como exemplo de sintomas plásticos citam-se: estiolamento, mosaico, filofia, epinastia, galha, superbrotamento, dentre outros

Os sinais são representados por estruturas do patógeno associadas ao sintoma ou por produtos da interação hospedeiro-patógeno, geralmente associados ao tecido doente. Para fins de diagnóstico, os sinais podem superar os sintomas em confiabilidade. Além de estruturas patogênicas (partículas virais, células de procariotos, estruturas fúngicas como micélio, esporos, corpos de frutificação, etc.), exsudações ou cheiros emanados das lesões podem ser considerados como sinais. Em algumas doenças, como nos carvões, os sinais confundem-se com os sintomas. No carvão da cana-de-açúcar, por exemplo, o chicote, reconhecido como o “sintoma” típico da doença, nada mais é do que o conjunto de estruturas reprodutivas do fungo *Sporisorium scitamineum* (sin. *Ustilago scitaminea*) associadas a uma estrutura da planta resultante da alteração da gema apical ou de gemas laterais.

## **DIAGNOSE**

A diagnose se refere à identificação de uma doença e do seu agente causal, com base nos sintomas e sinais. A constatação de uma possível doença na plantação geralmente é feita pelo próprio produtor, técnico ou fitopatologista, por meio dos sintomas exibidos pelas plantas afetadas, pois representam um desvio do que normalmente é esperado para aquela espécie vegetal ou cultura. Análise preliminar feita no próprio campo ou em material recebido para estudo em uma Clínica Fitopatológica deve inicialmente reconhecer a

natureza da doença, isto é, se ela é causada por agente biótico ou abiótico. Este reconhecimento não deve ser confundido com diagnose ou identificação do agente causal da doença. No entanto, esta etapa preliminar é fundamental para nortear os procedimentos posteriores que visam à correta identificação do agente causal da doença, através de consultas em livros, escolha de técnicas apropriadas de isolamento e transmissão, análises sorológicas, moleculares, etc.

A correta diagnose e o conhecimento da epidemiologia da doença são pré-requisitos indispensáveis para definir medidas para o seu manejo. Considerando-se uma das formas de controle mais empregadas atualmente, o controle químico, é fácil justificar que uma diagnose incorreta pode levar à adoção de medidas de controle completamente ineficientes. Por exemplo, os fungicidas modernos, com ingredientes ativos cada vez mais específicos, atuam de forma diferente em cada espécie fúngica. Enquanto controlam eficazmente uma espécie, podem ser completamente ineficientes para outra, mesmo que sejam espécies pertencentes ao mesmo gênero. Portanto, diagnose e controle estão intimamente relacionados, pois a diagnose determina o controle.

### **Diagnose de doenças conhecidas**

Quando uma planta exibe sintomas e sinais suspeitos de infecção por agente biótico, o primeiro passo é confrontar os sintomas observados com aqueles relatados na literatura. Se a doença for conhecida, os sintomas e os sinais presentes na planta doente deverão coincidir com aqueles descritos na literatura. Como referências são usadas diversos tipos de publicações incluindo livros-textos, compêndios, manuais e guias de campo. Este procedimento é, geralmente, suficiente para uma diagnose conclusiva.

Nos casos de infecções por fungos, o procedimento para identificação é, na maioria das vezes, simples. Fungos geralmente produzem estruturas reprodutivas (esporos, corpos de frutificação) na superfície dos órgãos atacados. O exame ao microscópio estereoscópico (lupa) seguido da coleta dessas estruturas e posterior observação em microscópio de luz, frequentemente permite a identificação do fungo e sua associação com os sintomas. Quando as estruturas fúngicas não estão facilmente visíveis, pode-se colocar o material vegetal doente em câmara úmida por cerca de 24 h. Isso normalmente estimulará a produção das estruturas reprodutivas características do fungo. Nos casos de fungos

necrotróficos, é possível ainda proceder ao isolamento do agente em meio de cultura, com sua posterior identificação por métodos culturais, morfológicos ou moleculares.

Suspeitando-se de infecção bacteriana pode-se lançar mão da chamada ‘corrida bacteriana’, de preparações que permitam a visualização da bactéria ao microscópio de luz ou mesmo do isolamento em meio de cultura. A identificação da bactéria poderá ser necessária para complementar a diagnose e, neste caso, pode-se fazer uso de métodos culturais, bioquímicos, sorológicos e moleculares.

Caso a suspeita de que o agente causal seja um molicute, embora seja um procaríoto como as bactérias, os procedimentos são um pouco diferentes. Tratando-se de fitoplasmas, que não são cultiváveis em meios de cultura, a demonstração da sua ocorrência em plantas sintomáticas pode ser feita por meio do uso de microscopia eletrônica de transmissão (MET) ou da técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (“Polymerase Chain Reaction – PCR”). Ambas são bastante úteis para a detecção de fitoplasmas, no entanto, a técnica de PCR vem sendo empregada de forma rotineira para esta finalidade. A presença de sintomas característicos na planta doente e a detecção de fitoplasmas nos seus tecidos têm sido suficientes para confirmar a diagnose de doenças associadas a esses agentes fitopatogênicos.

A diagnose de doenças causadas por vírus e viróides também inicia-se pela observação dos sintomas, que são distintos daqueles causados por fungos e bactérias. Caso não seja possível a identificação da doença com base apenas nos sintomas, a diagnose e identificação do vírus é feita por meio dos seguintes procedimentos: a) teste de transmissão do vírus para espécies hospedeiras e/ou indicadoras por meio de transmissão mecânica ou por enxertia, ou até usando-se o vetor do vírus quando conhecido (inseto, ácaro, nematóide, fungo); b) exame do material vegetal ao MET para observar a morfologia das partículas virais e os tipos de inclusões citoplasmáticas; c) testes sorológicos podem ser empregados para os casos em que há antissoros específicos disponíveis; d) testes moleculares com primers específicos.

Se os sintomas exibidos pela plantas são indicativos de infecção por nematoides, a identificação destes agentes pode ser feita com base em características morfológicas que podem ser obtidas pelo exame dos exemplares em microscópio de luz (até 1.000x de aumento). É a chamada identificação descritiva clássica, que é composta de três etapas: a

extração dos nematóides das amostras, a obtenção de preparações microscópicas e o exame das preparações em microscópio. Muitas vezes, porém, não é possível a identificação dessa maneira sendo necessário o uso de eletroforese de isoenzimas. Atualmente, as técnicas moleculares também já estão sendo empregadas com essa finalidade.

### **Diagnose de doenças desconhecidas**

O item anterior tratou da diagnose de doenças já descritas na literatura. Como se deve proceder, no entanto, quando nenhuma evidência de doença conhecida é encontrada no material analisado? Ou, ainda, como foram diagnosticadas as doenças quando apareceram pela primeira vez, no passado?

O estabelecimento da relação causal entre uma doença e um microrganismo só pode ser confirmado após o cumprimento de uma série de etapas, que compõem o “**postulado de Koch**”. Este postulado, descrito pelo médico alemão Robert Koch, em 1881, para o carbúnculo, causado pelo *Bacillus anthracis*, foi adaptado à Fitopatologia e é, até hoje, utilizado como método clássico de diagnose de doenças de plantas. Assim é enunciado o postulado de Koch:

- **associação constante patógeno-hospedeiro** – o suspeito patógeno deve estar presente em todas as plantas de uma mesma espécie que apresentam o mesmo tipo de sintoma. Em outras palavras, um determinado sintoma deve estar constantemente associado a um suspeito patógeno, sempre que a doença for observada.
- **Isolamento do patógeno** - o organismo associado ao sintoma deve ser isolado da planta doente, multiplicado axenicamente e ter suas características descritas.
- **Inoculação do patógeno e reprodução dos sintomas** – O suspeito patógeno, obtido em cultura pura, deve ser inoculado em plantas sadias da mesma espécie e variedade e provocar o mesmo sintoma observado nas plantas inicialmente doentes.
- **Reisolamento do patógeno** - O microrganismo deve ser reisolado das plantas submetidas à inoculação experimental e suas características devem ser as mesmas observadas na segunda etapa do postulado.

Somente se todas as citadas etapas forem cumpridas, o organismo isolado pode ser considerado como o agente patogênico, responsável pelo sintoma observado. No entanto,

para o isolamento e a inoculação do agente causal são necessárias técnicas específicas de laboratório, descritas a seguir.

### **Isolamento de agentes fitopatogênicos**

Uma planta doente possui uma microflora composta pelo parasita primário (agente causal da doença) e de organismos epifíticos, algumas vezes até saprofiticos. Para isolar agentes patogênicos em cultura pura, como fungos e bactérias, é necessário separá-lo da microflora epífita/saprófita, através de técnicas que favoreçam seu desenvolvimento, em detrimento do crescimento dos outros. Diversas etapas devem ser cumpridas durante o isolamento de um agente patogênico. No caso de patógenos foliares, pequenos fragmentos de tecido da região limítrofe entre a área lesionada e a área sadia devem ser retirados da planta doente. Nesta área o patógeno se encontra em maior atividade, enquanto que na área necrótica, localizada no centro das lesões, normalmente são encontradas altas populações de organismos saprofiticos, os quais não são desejáveis.

Os fragmentos foliares da região limítrofe do tecido doente deve, então, sofrer uma desinfestação superficial, a fim de eliminar, ou pelo menos reduzir consideravelmente, os saprófitas presentes. Um dos métodos mais utilizados na desinfestação superficial de tecidos de plantas é a imersão dos fragmentos selecionados em uma solução de álcool etílico a 70% durante 30 segundos a um minuto, seguida da imersão em hipoclorito de sódio a 0,5% por dois a três minutos. Para amostras provenientes de tecidos rígidos (raízes ou frutos), pode-se aumentar a concentração do agente desinfestante, o tempo de exposição, ou ambos.

Após a desinfestação superficial, os fragmentos devem ser transferidos, em condições assépticas, para um meio de cultura pobre em nutrientes. Nessa situação, apenas o organismo que está no interior dos tecidos deve crescer, favorecido pelos nutrientes fornecidos pelo tecido vegetal do próprio hospedeiro. Após 24-48 horas de incubação, pequenas porções retiradas dos bordos das colônias fúngicas ou bacterianas que se desenvolveram no meio pobre devem ser transferidas para um meio rico em nutrientes. A transferência dos microrganismos de um meio de cultura para outro é designada, em Fitopatologia, pelo termo repicagem. Em meio nutritivo adequado e sob condições de incubação (temperatura e luz) favoráveis, o microrganismo isolado deverá desenvolver

colônias puras. Para patógenos vasculares, utiliza-se uma variação do procedimento acima descrito. Nesse caso, corta-se um pedaço da haste da planta afetada, faz-se a imersão em álcool etílico e realiza-se uma flambagem rápida da superfície vegetal. Em seguida, com uma lâmina afiada e flambada, remove-se parte da casca e, com essa mesma lâmina, fragmentos devem ser retirados do lenho. Esses fragmentos devem ser submetidos a uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 2 a 3 minutos e transferidos para meio de cultura apropriado.

Uma variação no método de isolamento, conhecido por isolamento direto, compreende o isolamento de agentes patogênicos a partir das suas estruturas que estão colonizando os tecidos do hospedeiro. Alguns fungos produzem estruturas de reprodução (esporos ou corpos de frutificação) na superfície do hospedeiro, mais precisamente sobre a área lesionada. Quando estas estruturas estão presentes em grande quantidade, pode-se proceder ao isolamento por meio da coleta das mesmas (sob microscópio estereoscópico), seguida de transferência direta para o meio de cultura.

Nem todos os agentes fitopatogênicos são capazes de crescer em meio de cultura. Muitos parasitas biotróficos, como os fungos causadores de oídios, míldios, ferrugens e carvões, além dos vírus, viroides e fitoplasmas se desenvolvem somente em células vivas dos hospedeiros. Assim, a manutenção, o isolamento e a obtenção de inóculo desses agentes fitopatogênicos são limitados aos seus hospedeiros específicos, os quais devem ser mantidos em locais adequados, como casas de vegetação e telados.

### **Inoculação de microrganismos fitopatogênicos**

A inoculação envolve técnicas em que patógeno e hospedeiro são colocados em contato, sob condições favoráveis à infecção e ao desenvolvimento da doença.

Para fungos e bactérias de parte aérea, a inoculação é feita pela pulverização de uma suspensão de esporos ou células bacterianas na superfície da planta. Logo após a inoculação, as plantas devem ser submetidas a uma câmara úmida por, pelo menos, 24 horas, período necessário para que ocorra a germinação dos esporos e a penetração das estruturas fúngicas e das células bacterianas no hospedeiro. Em condições naturais, a câmara úmida é representada por períodos em que as plantas permanecem com água livre sobre as folhas. Isto ocorre pela irrigação por aspersão, ocorrência de períodos chuvosos e,

principalmente, deposição de orvalho. Para bactérias e fungos que penetram no hospedeiro através de aberturas naturais, é recomendável que as plantas sejam mantidas sob câmara úmida e em condições de escuro por 12 horas, antes da inoculação, para garantia da abertura dos estômatos.

Quando o fungo é um parasita de raízes, recomenda-se cultivá-lo previamente em substrato que permita sua incorporação ao solo no momento da inoculação. Normalmente são utilizados diversos tipos de grãos como substrato, como por exemplo, trigo ou sorgo. Nesse caso, a inoculação consiste em incorporar ao solo determinada quantidade desses grãos colonizados que receberá a muda a ser inoculada. Recomenda-se que o solo utilizado seja previamente esterilizado para evitar a presença de microrganismos indesejáveis.

No caso dos fungos e bactérias vasculares, o procedimento mais utilizado é a imersão das raízes da planta a ser inoculada numa suspensão de esporos ou de células bacterianas, preparada a partir da cultura pura desses agentes. A eficiência da inoculação pode ser melhorada se ferimentos forem provocados artificialmente nas raízes, por meio de corte parcial das radículas, seguida da imersão em suspensão de inóculo.

Na inoculação de vírus, as células da planta hospedeira devem sofrer ferimentos para que as partículas virais sejam inseridas em seu interior. Para o caso de vírus transmitidos por insetos, a inoculação é realizada via ferimentos provocados pelo próprio vetor, durante sua alimentação na planta. Na inoculação mecânica experimental, a suspensão viral, preparada a partir de um extrato de plantas doentes, é aplicada sobre a superfície do hospedeiro. Isso é feito na presença de um abrasivo (normalmente carbureto de silício), que tem por função provocar microferimentos no tecido vegetal, garantindo a entrada das partículas virais nas células da planta. Não há necessidade de câmara úmida nesse caso.

## **BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

Agrios, G.N. **Plant Pathology**. 5. ed. San Diego, Academic Press, 2005.

Bateman, D.F. The dynamic nature of disease. In: Horsfall, J.G. & E.B. Cowling (ed.) **Plant Disease an Advanced Treatise**. New York, Academic Press, 1978.

Bennett, W.F. **Nutrient Deficiencies & Toxicities in Crop Plants**. St. Paul, APS Press, 1993.

- Crowther, J.R. **ELISA, Theory and Practice**. Methods in Molecular Biology. New Jersey, Humana Press, 1995.
- Dijkstra, J. & de Jager, C.P. **Practical Plant Virology: Protocol and Exercises**. Springer Lab Manual, 1998.
- Foster, G.D. & Taylor, S.C. **Plant Virology Protocols – From Virus Isolation to Transgenic Resistance**. New Jersey, Humana Press, 1998.
- Hampton, R., Ball, E. & De Boer, S. **Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens – A Laboratory Manual**. St. Paul, APS Press, 1990.
- Horsfall, J.G. & Diamond, A.E. The diseased plant. In: Horsfall, J.G. & A.E. Diamond (ed.) **Plant Pathology an Advanced Treatise**. New York, Academic Press, 1959.
- Hull, R. **Plant Virology**. Fifth Edition, Elsevier, 2014.
- Lee, D.T. & Vu, N.A. Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases. **Applied Biological Chemistry** **60**:169–180, 2017.
- Matthews, R.E.F. **Diagnosis of Plant Virus Diseases**. London, CRC Press, 1993.
- Putham, A.R. & Duke, W.B. Allelopathy in agroecosystems. **Annual Review of Phytopathology** **16** :431-451, 1978.
- Rice, E.L. **Allelopathy**. New York, Academic Press, 1974.
- Roberts, D.A. & Boothroyd, C.W. **Fundamentals of Plant Pathology**. S. Francisco, W.H. Freeman, 1972.
- Schumann, G.L. & D'Arcy, C.J. **Essential Plant Pathology**. St. Paul, APS Press, 2010.
- Shurtleff, M.C. & Averre III, C.W. **The Plant Disease Clinic and Field Diagnosis of Abiotic Diseases**. St. Paul, APS Press, 1997.
- Stakman, E.C. & Harrar, J.G. **Principles of Plant Pathology**. New York, The Ronald Press Company, 1957.
- Talboys, P.W.; Ainsworth, G.C.; Pegg, G.F.; Wallace, E.R.A. **Guide to the Use of Terms in Plant Pathology**. Phytopathological Papers 17, Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1973.
- Tarr, S.A.J. **Principles of Plant Pathology**. London, MacMillan, 1972.

- Trigiano, R.N., Windham, M.T.; Windham A.S. **Plant Pathology – Concepts and Laboratory Exercises**. Boca Raton, CRC Press, 2008.
- Tuite, J. **Plant Pathological Methods**. Minneapolis, Burgess, 1969.
- Van Regenmortel, M.H.V. **Serology and Immunochemistry of Plant Viruses**. New York, Academic Press, 1982.
- Walker, J.C. **Plant Pathology**. New York, McGraw-Hill, 1950.
- Weintraub, P.G. & Jones, P. **Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors**. London, CAB International, 2010.
- Woltz, S.S. Nonparasitic plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology** 16:403-430, 1978.