

*“Avaliação da Eficiência e Eficácia da Estratégia de Controlo da doença do  
Amarelecimento Letal do Coqueiro na Província da Zambézia”*

**ANTÓNIA VAZ**

Dissertação submetida à Faculdade  
de Agronomia e Engenharia  
Florestal da Universidade Eduardo  
Mondlane para aquisição do Grau  
de Mestrado em Desenvolvimento  
Rural, orientado para Protecção de  
Plantas.

Supervisora: Prof. Dr<sup>a</sup> **Ana Mondjana**

Co-Supervisor: Prof. Dr. **Marcos Freire**

MAPUTO

Março de 2014

## **DECLARAÇÃO**

Eu declaro que esta dissertação é de minha autoria. Submeto-a para aquisição do grau de mestrado em Desenvolvimento Rural, orientado para Protecção Vegetal pela Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal da Universidade Eduardo Mondlane. Esta dissertação ainda não foi submetida a nenhuma Universidade para aquisição de algum grau ou exame.

**Assinado:** Antónia Vaz

## DEDICAÇÃO

Aos meus filhos, **Lóren, Karen e Celsharen** que este trabalho lhes sirva de inspiração e que possa trazer-lhes futuramente, incentivo para os seus estudos.

Ao meu esposo, **Celso Malate**, pelo amor, compreensão e apoio na concretização dos meus sonhos.

A minha querida mãe, por tudo que enfrentou em toda sua vida, e pelas vitórias alcançadas, para que eu pudesse ser o que hoje sou, **OFEREÇO**.

## AGRADECIMENTOS

À Deus todo poderoso, por tudo o que tem operado em minha vida e pela força que me dá nos momentos difíceis.

À minha supervisora, Prof. Dra Ana Mondjana, pela força e encorajamento para que pudesse continuar com os estudos e pela dedicação, paciência, encorajamento e acompanhamento contínuo na realização e elaboração da minha tese.

Ao meu Co-Supervisor Dr Marcos Freire, pelo apoio prestado na análise de dados e melhoria do texto.

As minhas irmãs, Fernanda e Helena, pelo apoio incondicional que me facultaram durante os meus estudos.

À dra Serafina Mangana, pelo apoio moral e encorajador facultados no decorrer do curso de mestrado e pelos ensinamentos na vida profissional.

À Eng<sup>a</sup> Nilsa Munguambe, pelo apoio prestado na realização dos testes laboratoriais.

Ao Millennium Challenge Account (MCA), pela disponibilização de fundos e meios materiais para concretização deste trabalho.

Ao Eng Remígio Timbrine e Eng Josef Pudivitri, do MCA, pelo apoio prestado na identificação dos locais de amostragem e no processo de amostragem. Igualmente agradeço ao dr. Lencastre pelo auxílio na elaboração dos mapas dos locais de colecta de amostras usando o GIS.

À dra Inês pela ajuda prestada na análise de dados.

À dra Íris Maholela, pela ajuda prestada na análise linguística da presente tese.

A todos que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

## **ÍNDICE**

DECLARAÇÃO .....	ii
DEDICAÇÃO .....	iii
AGRADECIMENTOS .....	iv
ABREVIATURAS.....	ix
Resumo.....	x
<b>CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Disposições Gerais .....	1
1.2. Problema de Estudo.....	5
1.3. Objectivos.....	5
<b>CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>8</b>
2.1. Introdução .....	8
2.2. Etiologia e Epidemiologia do Amarelecimento Letal do Coqueiro .....	9
2.2.2. Epidemiologia do Amarelecimento Letal do Coqueiro .....	10
2.3. Historial do Amarelecimento Letal do Coqueiro em Moçambique .....	12
2.4. Impacto da Doença em Moçambique .....	14
2.5. Amplitude do Hospedeiro e Distribuição Geográfica do Fitoplasma do ALC .....	15
2.6. Sintomas causados pelo Amarelecimento Letal do Coqueiro.....	16
2.8. Meios de Propagação e Dispersão da Doença .....	23
2.9. Maneio/ Controlo da doença .....	23
<b>CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA E/OU EFICÁCIA DA ESTRATÉGIA DE CONTROLO DO AMARELECIMENTO LETAL DO COQUEIRO EM MOCAMBIQUE .....</b>	<b>31</b>
3.1. Resumo .....	31
3.2. Introdução .....	32
3.3. Metodologia de Trabalho .....	34
3.3.1. Local do Estudo .....	34
3.3.2. Avaliação do estado de saúde das plantas ao redor da planta com ALC abatida ...	35
3.3.2.2. Análises Laboratoriais .....	38
3.3.3. Determinação do raio de abate das plantas infectadas, a partir da planta com sintomas evidentes de ALC .....	41

3.4. Parâmetros Avaliados .....	41
3.5. Resultados e Discussão .....	42
3.5.1. Avaliação do estado de saúde dos coqueiros ao redor do coqueiro com sintomas do ALC.....	42
3.5.2. Determinação do raio de abate de coqueiros infectados à partir da planta doente devido ao ALC.....	50
<b>CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DA TRANSMISSIBILIDADE DO AGENTE CAUSAL DO ALC PELOS FRUTOS DO COQUEIRO .....</b>	<b>55</b>
4.1. Resumo .....	55
4.2. Introdução .....	56
4.3. Metodologia de Trabalho .....	58
4.3.1. Avaliação da transmissão do Amarelecimento Letal do Coqueiro (ALC) pelos frutos de coqueiros .....	59
4.3.2. Testagem da Planta-mãe .....	59
4.3.3 Avaliação do Cairo e Embrião .....	60
4.3.4. Testagem das plântulas provenientes da germinação de frutos infectados.....	60
4.4. Análises Laboratoriais .....	61
4.5. Análise de Dados .....	62
4.6. Resultados e Discussão .....	62
4.6.1. Avaliação da possibilidade de transmissão do ALC através do fruto de coqueiros infectados. ....	62
<b>CAPÍTULO V - CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>68</b>
5.1. Conclusões .....	68
5.2. Recomendações.....	70
<b>ANEXOS.....</b>	<b>71</b>
Anexo 1: Mapa de localização dos coqueiros em estudo nos Distritos da Maganja da Costa e Nicosadala .....	71
Anexo 2: Protocolo de amostragem do material do tronco para extração de ADN e detecção de fitoplasma .....	72
Anexo 3 : Protocolo de Extração do Ácido desoxiribonucleico (DNA) para Coqueiro ...	75
Anexo 4: Identificação do ALC por Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	76

Anexo 5: Preparação do Tampão de Extração CTAB e do Tampão de corrida TBE.....	77
Anexo 6: Escala da Severidade do ALC .....	78
Anexo 7: Resultados de PCR de todas as amostras colhidas e analisadas.....	79
Anexo 8: Ficha de Registo de dados de recolha de amostras da doença do amarelecimento letal do coqueiro.....	85
Anexo 9: Ficha de Registo de dados de recolha de amostras da doença do amarelecimento letal do coqueiro.....	86

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 2.1:</b> Biologia do Amarelecimento Letal do Coqueiro .....	11
<b>Figura 2.2:</b> Distribuição do ALC no Mundo .....	16
<b>Figura 2.3:</b> Necrose nas inflorescências devido ao ALC .....	17
<b>Figura 2.4:</b> Queda prematura dos frutos devido ao ALC .....	17
<b>Figura 2.5:</b> Sintomas do ALC .....	18
<b>Figura 2.6:</b> Sintomas de <i>Fusarium oxysporium</i> .....	19
<b>Figura 2.7:</b> Sintomas de Murcha de Ganoderma .....	19
<b>Figura 2.8:</b> Sintomas de deficiência de Boro .....	20
<b>Figura 2.9:</b> Sintomas de deficiência de Manganês .....	20
<b>Figura 2.10:</b> Sintomas de deficiência de Magnésio .....	21
<b>Figura 2.11:</b> Sintomas de deficiência de Nitrogénio .....	21
<b>Figura 2.12:</b> Sintomas de deficiência de Potássio .....	22
<b>Figura 2.13:</b> Sintomas de danos por relâmpagos .....	22
<b>Figura 3.1:</b> Distritos abrangidos pelo estudo .....	35
<b>Figura 3.2:</b> Disposição dos coqueiros no campo .....	36
<b>Figura 3.3:</b> Processo de colheita de amostras .....	37
<b>Figura 3.4:</b> Produto de PCR P1/P7 da amostra #86 .....	43
<b>Figura 3.5:</b> Produto de PCR P1/P7 dos coqueiros adjacentes ao coqueiro #0 .....	46
<b>Figura 3.6:</b> Abate do coqueiro central sintomático #0 .....	47
<b>Figura 3.7:</b> Disposição das plantas doentes e sãs no campo na 1ª e 2ª amostragem .....	51
<b>Figura 4.1:</b> Colecta de amostra do cairo .....	60

<b>Figura 4.2:</b> Disposição dos frutos para germinação .....	61
<b>Figura 4.3:</b> Colecta das folhas de plântulas no germinador .....	61
<b>Figura 4.4:</b> Produto do PCR dos coqueiros “mãe” .....	63
<b>Figura 4.5:</b> Produto de PCR para P1/P7 de embrião, cairo e plântula .....	64

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Área e produção mundial de coco .....	2
<b>Tabela 2:</b> Localização dos campos de amostragem .....	36
<b>Tabela 3:</b> Sintomatologia e resultados de PCR das amostras centrais .....	42
<b>Tabela 4:</b> Sintomas e resultado de PCR na 1ª amostragem .....	44
<b>Tabela 5:</b> Sintomas e resultado de PCR na 2ª amostragem .....	45
<b>Tabela 6:</b> Locais de amostragem .....	50
<b>Tabela 7:</b> Produção de coco nas províncias de Inhambane e Zambézia .....	56
<b>Tabela 8:</b> Quantidade de cocos colhidos por coqueiros “mãe” .....	59
<b>Tabela 9:</b> Percentagens de coqueiros e frutos infectados pelo ALC .....	63

## **LISTA DE GRÁFICOS**

<b>Gráfico 1:</b> Queda da produção de copra devido ao ALC .....	15
------------------------------------------------------------------	----



## **ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ALC</b>	Amarelecimento Letal do Coqueiro
<b>CABI</b>	Centre for Agriculture and Bioscience Internacional
<b>EPPO</b>	European and Mediterranean Plant Protection Organization
<b>FISP</b>	Farmer Income Support Project (Projecto de Apoio a Renda do Agricultor)
<b>GIS</b>	Sistema de Posicionamento Global
<b>GPS</b>	Sistema de Programação Geográfico
<b>IIAM</b>	Instituto de Investigação Agrária de Moçambique
<b>Km</b>	Quilómetros
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction

## **Resumo**

O presente estudo foi realizado nos distritos da Maganja da Costa e Nicoadala, na Província da Zambézia, com objectivo de avaliar a eficácia e eficiência da estratégia de controlo do Amarelecimento Letal do Coqueiro, que consiste predominantemente no abate e queima de plantas doentes. Especificamente pretendia-se avaliar o estado de saúde das plantas adjacentes a planta central sintomática infectada com ALC e abatida; determinar o raio de abate de plantas infectadas, a partir de uma planta infectada com ALC e avaliar a transmissibilidade do agente causal do ALC pelos frutos do coqueiro. No total foram colhidas 231 amostras de tronco de coqueiros para a avaliação do estado de saúde das plantas adjacentes à planta central doente e abatida e para a determinação do raio de abate de plantas infectadas, a partir da planta infectada com ALC. Igualmente foram colhidos 54 frutos provenientes de coqueiros infectados para o estudo da possibilidade de transmissão da doença através dos frutos, tendo-se analisado o cairo, embrião e plântulas. Das 231 amostras, oito amostras foram positivas no teste de PCR. Os resultados de PCR para avaliação da possibilidade de transmissão do ALC pelos frutos foram todos negativos. O método de abate e queima de plantas infectadas mostrou ser um método eficiente porque elimina completamente o inóculo central e eficaz porque a disseminação do ALC para os coqueiros adjacentes ao coqueiro central abatido é interrompida devido à ausência do inóculo. Pelo facto de se tratar de uma zona epidémica, a infecção de novos coqueiros foi muito baixa, tendo dificultado a determinação do raio exacto de abate. Contudo, a recomendação para prevenir a disseminação da doença é de abater o coqueiro central infectado mais os coqueiros sintomáticos adjacentes ao coqueiro central, independentemente da posição em relação ao coqueiro central. Os frutos provenientes de coqueiros infectados pelo ALC não foram positivos no teste de PCR, mas não são viáveis para produção de plântulas.

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

### 1.1. Disposições Gerais

O coqueiro (*Cocus nucifera* L.) é uma cultura de origem asiática e introduzida em Moçambique por grandes empresas no século XX (Lourenço, 2012), é de grande importância sócio-económica no País. Ao nível do sector familiar, o cultivo do coqueiro surgiu mais tarde, em áreas adjacentes às das Empresas. Esta cultura, baptizada como “árvore das 100 aplicações (Araújo, 2009), tem a vantagem de oferecer vários subprodutos durante todo o ano, nomeadamente o fruto, rico em proteínas e calorias para a segurança alimentar de muitas famílias e fornecimento de matéria prima para a indústria de óleos e sabões, a madeira para a construção e mobiliário, a palha usada para a cobertura de casas e a seiva da floração para a produção de bebida alcoólica. É uma cultura importante na geração de renda para muitas famílias que dependem desta cultura para subsistência.

Com uma assistência técnica regular em toda a cadeia de produção, por parte dos serviços de extensão e serviços agrários, e com uma exploração autosustentável, esta cultura pode ser uma fonte inesgotável de divisas para o País (PD-Subsector coqueiro, 2005). O coqueiro constitui também fonte de receita para muitas famílias das zonas costeiras que dependem fundamentalmente desta cultura para sua sobrevivência, representando cerca de 30% da população Moçambicana.

Na região Austral de África, Moçambique já ocupou lugares de destaque na produção de coco no início da década 70, sendo a província da Zambézia destacada como uma das que possuía a maior plantação de coco a nível mundial. Esta província produzia anualmente 60.000 toneladas de copra, das quais 45.000 toneladas eram exportadas e 10.000 abastecia a indústria de produção de óleo (Muendane, 2007).

Em 1999, o sub-sector do coqueiro rendeu cerca de 41.2 milhões de dólares dos quais 7 à 12 milhões de dólares era receita a favor das famílias camponesas produtoras de coco. Actualmente, Moçambique ocupa o décimo primeiro lugar na produção de coco (Tabela 1), devido a vários

factores sócio-económicos e climatéricos, destacando-se, a idade avançada dos coqueiros, a má conservação/maneio dos palmares, problemas nutricionais e ataque de pragas e doenças.

**Tabela 1:** Área (hectares) e produção (\*10<sup>3</sup> unidades cocos) mundial

Países	2006		2007		2008		2009	
	cocos	ha (1000)	cocos	ha (1000)	cocos	ha (1000)	cocos	ha (1000)
Indonésia	15,656,000	3,789	15,966,000	3,788	16,235,000	3,799	16,498,000	3,854
Índia	14,811,000	1,947	15,840,000	1,937	14,744,000	1,903	15,729,750	1,895
Filipinas	12,960,000	3,311	12,327,000	3,355	12,573,000	3,380	15,668,000	3,402
Brazil	3,722,771	280	3,538,755	273	3,764,218	273	3,288,970	273
Sri Lanka	2,785,000	395	2,869,000	395	2,909,000	395	2,853,000	395
México	1,403,125	164	1,446,500	171	1,407,315	179	1,401,598	179
Tailândia	1,248,000	226	1,219,000	225	1,186,000	247	1,104,000	239
Tanzania	462,500	313	462,500	310	462,500	310	401,223	310
Gana	393,750	55	395,000	55	395,375	55	342,205	55
Jamaica	388,125	57	388,750	51	412,158	51	329,877	51
<b>Moçambique</b>	362,500	170	331,250	170	305,840	170	314,383	<b>170</b>
Venezuela	216,746	18	238,335	18	251,920	18	268,014	18
Nigéria	281,250	39	281,875	39	295,840	39	242,949	39
Fr Polynesia	108,750	20	108,750	20	111,116	20	95,668	20
Tonga	78,750	s/i	73,125	s/i	73,934	s/i	64,696	s/i
Palau	70,000	s/i	70,000	s/i	70,000	s/i	60,726	s/i
Guam	66,500	s/i	66,500	s/i	66,600	s/i	57,657	s/i
Outros Países	5,592,705	1,218	5,668,715	1,307	5,825,466	1,270	6,128,797	1,266
<b>Total</b>	<b>60,607,472</b>	<b>12,002</b>	<b>61,291,055</b>	<b>12,114</b>	<b>61,089,282</b>	<b>12,109</b>	<b>64,849,513</b>	<b>12,166</b>

Fonte : Adaptada de Coconut Statistical Year Book 2009, APCC

Em Moçambique, o coqueiro tem sido atacado por várias doenças, nomeadamente, mancha prateada (*Pestalotiopsis palmarum*), mancha castanha (*Diplodia* sp.), fumagina (*Capnodium* sp.) e o Amarelecimento Letal do Coqueiro (ALC). Dentre estas doenças, a que mais se destaca é a doença do Amarelecimento Letal do Coqueiro, que vem causando sérios problemas sócio-económicos nas zonas afectadas.

O ALC tem contribuído negativamente na produção, produtividade e desempenho do sub-sector do coqueiro. Estima-se que há 25 anos atrás, a Província da Zambézia era detentora de cerca de 15 milhões de coqueiros, contra os cerca de 7,5 milhões hoje existentes na mesma Província (TTI, 2009). Segundo estudos feitos em 2009, por uma empresa francesa denominada Teledectecção de Imagens Satélites (TTI Productions), assim como do Trabalho de Inquérito Agrícola (TIA), esta diminuição do número de coqueiros tende a acentuar-se devido ao ALC,

embora a idade avançada dos coqueiros também tenha o seu contributo, associado a outros factores anteriormente mencionados.

Desde a primeira detecção do ALC em 1992, em Moçambique, estima-se que cerca de seis (6) milhões de coqueiros tenham morrido, tendo sido registadas perdas na ordem dos 5% em 2005 e 25% em 2007 (Araújo, 2009). Recentes dados estatísticos indicam que seis (6) milhões de palmeiras morreram devido ao ALC, registando uma queda de produção de copra, de 46.6 mil toneladas para cerca de 12 mil toneladas entre 2004 e 2008. Esta redução, não se reflecte apenas na renda dos camponeses, mas também na própria economia da Província da Zambézia (Araújo, 2009). Situações dramáticas têm sido registadas em várias regiões de produção de coco, por exemplo, na província da Zambézia, a mortalidade de coqueiros em alguns palmares no Distrito de Inhassunge (Gonhane) e Chinde era de aproximadamente 100% (Mondjana *et al*, 2010). Uaciquete & Rao (1997), citam que a mortalidade de coqueiros observada em 1996 em alguns palmares da Mocímboa-da-Praia, província de Cabo Delgado, foi de 80%.

Esta situação que ocorre em Moçambique também foi reportada noutros países produtores de coco, particularmente na América Latina e África. Na Jamaica estima-se que cerca de 6 milhões de coqueiros foram mortos pela doença entre 1961 à 1981 (Bourdeix *et al*, 1999). No Ghana, por exemplo, cerca de 1 milhão de coqueiros morreram nos últimos 30 anos, também devido a doença. De igual modo a doença causou a morte de aproximadamente 8 milhões de coqueiros (38 %) na Tanzania. Estes exemplos são elucidativos da natureza destrutiva da doença.

Vários métodos têm sido aplicados para mitigar os efeitos do ALC, desde métodos culturais, métodos químicos, genéticos e até métodos integrados. Contudo, a utilização de variedades resistentes seria o método mais eficaz para o controlo do ALC, embora este tipo de material genético não é de fácil acesso. Importa referir que, existem alguns países que já desenvolveram variedades tolerantes a doença, e que constituem uma potencial fonte de germoplasma a ser testado em Moçambique. Sabe-se que em Moçambique, a variedade Gigante Verde de Moçambique mostra alguma tolerância a doença. Por outro lado, o método cultural de abate e queima de plantas infectadas pelo ALC, contribui também para redução da propagação da doença.

Trabalhos realizados no Ghana mostram que a erradicação atempada das árvores doentes, logo que aparecerem os primeiros sintomas, permite conter o desenvolvimento da doença e prevenir a formação de novos focos da doença (Burford, 2006). Observações feitas na República Dominicana e nas Caraíbas também sugerem que a velocidade de disseminação da doença pode ser reduzida com erradicação atempada dos coqueiros doentes (Bourdeix *et al*, 1999).

Como forma de fazer face à situação actual do palmar em Moçambique, várias acções tem sido levadas a cabo, no sentido de mitigar o problema. Assim, em 2009, o Governo de Moçambique através do MINAG beneficiou-se de um financiamento para apoio aos pequenos agricultores, através de um projecto denominado Projecto de Apoio à Renda dos Agricultores “Farmer Income Support Project” (FISP/MCA), financiado pelo Governo Americano-Millennium Challenge Account (MCA/MCC) com a duração de 5 anos. O Projecto, composto por três componentes, uma das quais, o controlo da doença do Amarelecimento Letal do Coqueiro, visava essencialmente conter a doença, aumentar a produção de coqueiros e de produtos derivados do coco e incentivar a diversificação de culturas nas zonas costeiras dos oito distritos circunscritos ao Projecto, nomeadamente: Pebane, Maganja da Costa, Namacurra, Nicosadala, Inhassunge e Chinde na Província da Zambézia assim como Angoche e Moma na Província de Nampula.

Na componente de controlo da doença, o método aplicado era o abate e queima de plantas infectadas com ALC e reposição do palmar com a variedade gigante verde de Moçambique por mostrar alguma resistência à doença. Por outro lado, o programa abrangia a componente de identificação de variedades resistentes, cujos ensaios foram estabelecidos na Província da Zambézia, com a finalidade de avaliar a resistência de diversas variedades provenientes da Costa do Marfim.

De acordo com o Projecto FISP, o método de erradicação atempada e limpeza dos coqueirais contribuíu significativamente na redução da incidência da doença nas províncias de Nampula e Zambézia, tendo reduzido a taxa de novas infecções de 2.5% no início do programa em 2008, para 0.8% actualmente (FISP, 2013).

## 1.2. Problema de Estudo

O Millennium Challenge Corporation (MCC) dos Estados Unidos da América, é uma organização que financia vários projectos de apoio em infraestruturas, transporte, acesso a saúde, fornecimento de água e saneamento do meio, acesso a educação, acesso a terra e na área da agricultura e irrigação. Em Moçambique, o MCC é representado pelo Millennium Challenge Account (MCA), que coordena a implementação de todas as actividades previstas no acordo. Na componente da Agricultura, o Governo de Moçambique em parceria com o MCA, envidou esforços para controlar a doença do ALC nas zonas infectadas e impedir que a mesma se propagasse para novas áreas. Contudo, questionamentos têm sido feitos, sobre a eficiência e eficácia da estratégia de controlo adoptada pelo Projecto de Apoio à Renda do Agricultor (FISP/MCA), que se concentrava no abate e queima de coqueiros infectados pelo ALC. Dentre as várias questões que surgiram destacam-se as seguintes:

1. Será que as plantas assintomáticas adjacentes à planta central aparentemente infectada com ALC (sintomática) e abatida estão ou não infectadas?
2. Se assumirmos que as plantas adjacentes à planta doente abatida também estão infectadas mas não apresentam sintomas, e que a doença é transmitida por um vector, qual seria o raio que contém plantas infectadas mas assintomáticas, tendo como centro a planta doente abatida?
3. Outro aspecto também relevante está relacionado com a controversa opinião sobre a presença do fitoplasma nos frutos do coqueiro. Apesar da transmissão por semente ainda não ter sido descrita, testes moleculares (especificamente a *Polimerase Chain Reaction* (PCR), confirmaram a presença do amarelecimento letal no tecido embrionário de sementes provenientes de plantas infectadas (Nipah *et al*, 2007). Será que uma planta doente produz frutos infectados? E se a resposta for afirmativa, então quantos cocos estão infectados/por árvore e será que esses frutos infectados transmitem o fitoplasma a planta por elas gerada?

## 1.3. Objectivos

Avaliar a eficiência e eficácia da estratégia de controlo do Amarelecimento Letal do Coqueiro adoptado no programa de mitigação da doença em Mocambique, que consiste no abate e queima de plantas doentes.

Especificamente pretende-se o seguinte:

1. Analisar o estado de saúde das plantas adjacentes à planta central sintomática infectada com ALC e abatida;
2. Determinar o raio de abate de plantas infectadas, a partir de uma planta infectada com ALC;
3. Analisar a transmissibilidade do agente causal do ALC pelos frutos do coqueiro.

### **Hipóteses**

Para responder as questões enumeradas no problema de estudo, foram formuladas as seguintes hipóteses:

**Hipótese 1.** Se uma planta de coqueiro estiver infectada pelo amarelecimento letal, então algumas plantas de coqueiro adjacentes à planta doente abatida, estarão infectadas.

**Hipótese 2.** Dependendo da variedade, um coqueiro infectado pode produzir até 1% de cocos infectados.



## Bibliografia

Araújo, M. (2009). Renasce esperança na produção de copra. Zambézia-on-line. <http://manueldearaujo.blogspot.com/2009/05/agricultura-renasce-esperanca-na.html>. May 10, 2009

Borford, H. (2006). Coconut lethal yellowing in Ghana: a new hybrid is being tested. <http://www.innovations-report.com/html/reports/agricultural-sciences/report-69870.html>

Bourdeix, R., Allou, K. and Konan Konan, J.L. (1999). Lethal Yellowing diseases of the coconut palm: an overview. [www.plantapalm.com/.../pestsndiseases/vpe\\_ly\\_coconut.htm](http://www.plantapalm.com/.../pestsndiseases/vpe_ly_coconut.htm)

Coconut Statistic Yearbook (2009). Asian and Pacific Coconut Community. [www.cri.gov.lk/web/images/.../statistics/satistics\\_on\\_coconut\\_oil\\_palm.p...](http://www.cri.gov.lk/web/images/.../statistics/satistics_on_coconut_oil_palm.p...) Table 13: National monthly coconut production data - 2009-2010 (mln. nuts).

Lourenço, E. (2012). Informação verbal, não publicada. Director da Agricultura do Grupo Madal S.A.R.L. [Lourenco@madal.co.mz](mailto:Lourenco@madal.co.mz). Província da Zambézia, Moçambique.

Mondjana, A.M.; Santos, L., Vaz, A., Caniço, A., Mangana, S., Nuaila, V., Massingue, F. e Massinga, J. (2010). Manual Prático para Identificação e Maneio do Amarelecimento Letal do Coqueiro. Arranjo gráfico e impressão: LEIMA IMPRESSÕES ORIGINAIS, LDA.

FISP, (2013). Relatório Anual do Provedor de Serviços do FISP, Relatório de Progresso Q14, Ano 4, 1 Janeiro de 2013-31 Março de 2013.

Muendane, C. T. (2007). Biocombustíveis, Matérias Primas. Workshop on Potential Development of Biofuel in Mozambique. Maputo, 11-12 July, 2007.

Nipah, J.O.; Jones, P. e Dickinson, M.J. (2007). Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected with Cape St Paul wilt disease in Ghana. *Plant pathology* 2007, vol 56, pp 777 – 784.

Plano Director Sub- Sector coqueiro (2005). DRAFT, Dezembro 2005, p 124. Ministério da Agricultura. Direitos reservados a KPMG International.

TTI PRODUCTION, (2009). Baseline survey of the distribution and incidence of coconut lethal yellowing disease in Mozambique: “Results of CLYD survey and recommendations of options to follow the distribution of CLYD in the future”. MCA-Moçambique, MPD, Moçambique.

TIA, (2009). Trabalho de Inquérito Agrícola. Direcção de Economia. Ministério da Agricultura, Moçambique.

Uaciquete, A.; Rao, Y. P., (1997). Coconut pest and disease situation in Mozambique. *Proceedings of the international cashew and coconut conference: trees for life the key to development*, Dar es Salaam, Tanzania, 17-21 February 1997: 527-529

## CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Introdução

A revisão bibliográfica que a seguir se apresenta visa essencialmente sustentar de informação básica ao presente estudo de modo a responder às questões mencionadas anteriormente no problema de estudo, relativamente à contaminação dos coqueiros adjacentes ao coqueiro central sintomático, ao raio de abate dos coqueiros adjacentes em relação ao coqueiro central sintomático e a transmissibilidade da doença do amarelecimento letal do coqueiro (ALC) através de frutos de coqueiros contaminados.

Em Moçambique, o coqueiro é cultivado ao longo da zona costeira, onde a maior parte das plantações se situam nas províncias de Cabo-Delgado, Nampula, Zambézia e Inhambane. A Província da Zambézia, com cerca de 110,000 ha de palmares, corresponde a 65% da área total do palmar em Moçambique, estimada em 170,000 ha. Com excepção da província da Zambézia, onde cerca de 30% da área de palmar pertence ao sector privado, o coqueiro é essencialmente uma cultura do sector familiar (MADAL, 2008) e uma das principais fontes de rendimento das populações das zonas costeiras. Estima-se que a renda obtida pelos camponeses é de aproximadamente 4.3 milhões de dólares americanos e cerca de 14 a 30% da população Moçambicana beneficia-se directa ou indirectamente desta cultura para sua sobrevivência (PD Sub-sector do coqueiro, 2005).

Da produção nacional anual na década 90, de cerca de 60 000 toneladas, 50% destinava-se ao consumo familiar e a restante produção era comercializada em forma de copra, bagaço, óleo e sabão. As indústrias consumiam 27.100 toneladas de copra, das quais 20.700 ton compradas aos camponeses e 6.400 ton de produção própria. Em 1999, o sub-sector do coqueiro rendia ao país cerca de 10 milhões de dólares americanos anualmente, resultantes da exportação da copra e derivados, chegando a ocupar o quarto lugar nas exportações agrícolas do país (MADAL, 2008).

Em Moçambique são cultivadas várias variedades, nomeadamente, o Gigante Verde de Moçambique (MZT), Gigante Vermelho de Moçambique (MRT), Gigante Castanho de Moçambique (MBT), Anão Verde do Brasil (BGD), Anão Amarelo da Malásia (MYD), Anão

Vermelho da Malásia (MRD), e híbridos em pequena escala, mas a mais predominante é o MZT. Na Província da Zambézia existem 3 tipos de híbridos, a citar, híbrido proveniente do cruzamento entre MZT X MYD, MZT X MRD e MZT X BGD (Pudivriti, 2010).

Nos últimos anos, os coqueiros têm registado rendimentos muito baixos, resultantes de vários factores tais como a idade avançada das plantações (acima de 50 anos), falta de manejo, falta de nutrientes, ausência de chuva e a ocorrência de pragas e doenças. Dentre as doenças, a que mais se destaca é a doença do “Amarelecimento Letal do coqueiro-ALC” (Letal Yellowing Disease), que até 2008 havia coberto uma área de 34.000 ha correspondentes a 31% da área total de coqueiros na Zambézia (Mondjana, 2010).

O amarelecimento letal é uma doença que ocorre em várias partes do mundo, incluindo as Caraíbas (Jamaica, Cuba, República Dominicana, Haiti, Ilhas Caiman, Honduras, Belize e Yucatan), África ocidental (Gana, Togo, Nigéria), África oriental e Austral (Quênia, Tanzânia e Moçambique). Em Moçambique a doença circunscreve-se às províncias de Cabo-Delgado, Nampula e Zambézia, sendo que nas duas últimas províncias, foi possível reduzir a taxa de novas infecções de 2.5% para abaixo de 1% de 2008 a 2013, devido a intervenção do programa de mitigação da doença implementado pelo Projecto de Apoio a Renda do Agricultor (FISP, 2013).

## **2.2. Etiologia e Epidemiologia do Amarelecimento Letal do Coqueiro**

### **2.2.1. Etiologia do Amarelecimento Letal do Coqueiro**

Fitoplasmas são microrganismos procariotas, sem parede celular, não são cultiváveis em meio de cultura (Elliott e Harrison, 2009) e só são visíveis ao microscópio electrónico, devido ao seu tamanho minúsculo variando de 142-295 nm de diâmetro e 1 à 16 µm de comprimento. Os fitoplasmas possuem um formato redondo ou ovoide, com uma membrana celular de até três camadas, com duas membranas densas envolvendo uma membrana transparente. Estes microrganismos são patógenos sistémicos, sobrevivendo somente dentro do tecido vascular que transporta os carboidratos (Elliott e Harrison, 2009). São microrganismos semelhantes as bactérias (Tenericutes), pertencentes a classe Mollicutes e a ordem acholeplasmatales (Marinho *et al*, 2002).

A doença do Amarelecimento Letal do Coqueiro é causada por um fitoplasma comumente conhecido por *Coconut lethal yellowing pathogen* (Nutman & Roberts, 1955), que bloqueia o transporte da seiva elaborada, causando o amarelecimento e morte dos coqueiros.

Dependendo do local onde a doença ocorre, alguns nomes comuns são atribuídos a doença, tais como, Awka disease na Nigéria, Cape St Paul wilt no Gana, Kaincope disease no Togo, Kribi disease nos Camerões, unknown disease na Jamaica, Jaunisse létale des palmiers, pourriture du bourgeon terminal no Haiti, Amarillos letal de las palmeras e Pudrición del cogollo em Cuba (Marinho *et al*, 2002).

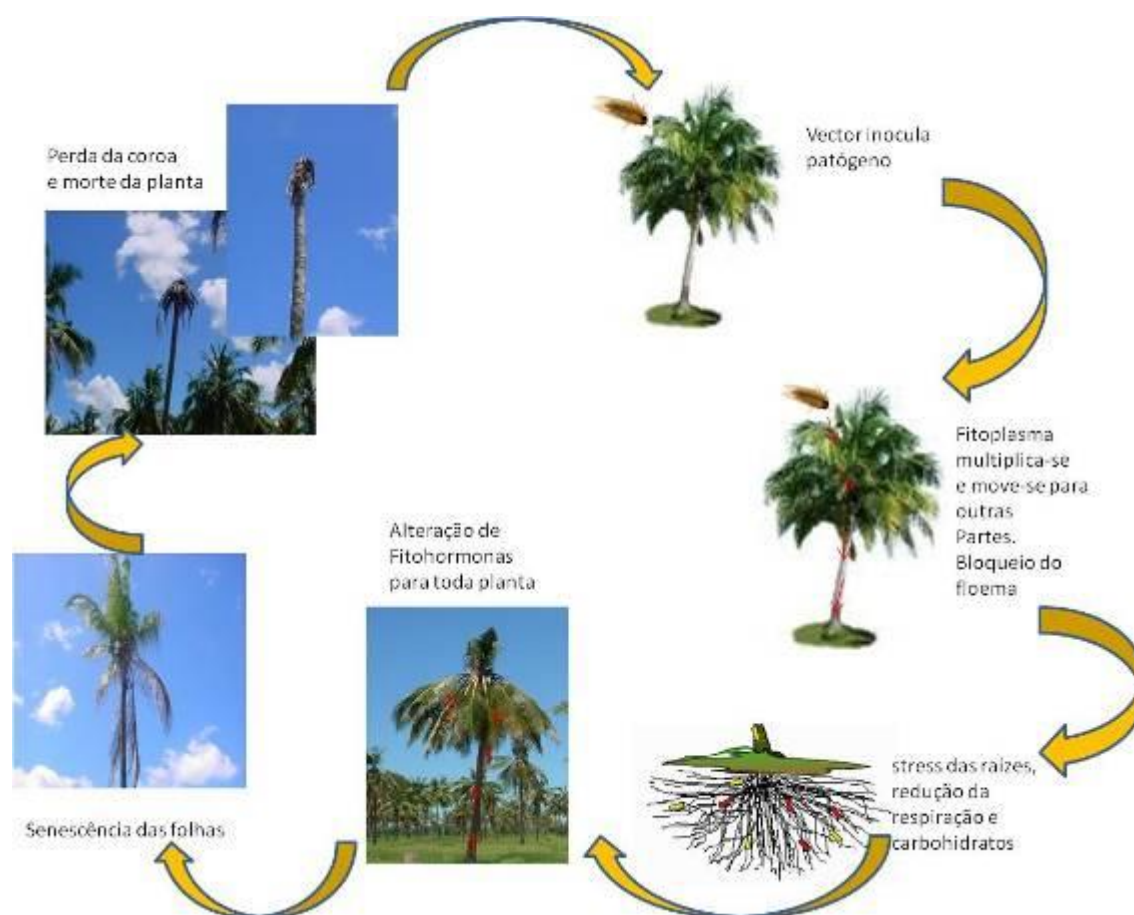
### **2.2.2. Epidemiologia do Amarelecimento Letal do Coqueiro**

O ALC é transmitido por um insecto vector, sugador (Howard *et al.*, 1983), das famílias *Cicadelloidea* e *Fulgoroidea* (D'Arcy & Nault, 1982), ordem Hemiptera, que na fase adulta, alimenta-se das folhas do coqueiro e de outras palmeiras (Figura 2.1), mas os seus danos não são facilmente visíveis. Na fase pré-emergente, os insectos alimentam-se de plantas infestantes ao redor dos coqueiros, particularmente *Stenotaphrum secundatum* mas também de outras espécies como *Paspalum notatum*, *Cynodon dactylon* (Reinert, 1980).

Em Países como Estados Unidos da América, México, América Central e Caraíbas, foi identificado um insecto da ordem Homoptera, denominado *Mindus crudus*, como sendo o principal vector transmissor da doença do amarelecimento letal do coqueiro. Segundo Howard (1980), as densidades populacionais de *M. crudus* encontram-se acima de 40 vezes mais nas áreas infectadas pelo ALC em relação às áreas não infectadas. Um estudo realizado por Howard (1984), mostrou que a distribuição geográfica de *M. crudus* no mundo, coincide com a distribuição do fitoplasma, com excepção de alguns lugares das Caraíbas, nomeadamente, Bahamas, República Dominicana e Haiti, onde até ao momento, quer o insecto assim como a doença não foram ainda reportados.

Segundo Purcell 1985, *M. crudus* é um vector pouco eficiente para a transmissão do fitoplasma, mas a sua reprodução é muito rápida, facto que os torna muito abundantes na área de acção, de tal modo que, mesmo com uma taxa baixa de transmissão, chega a ser suficiente para a dispersão

da doença. Ao nível da zona tropical, este insecto reproduz-se continuamente durante todo o ano, pelo facto do processo de diapausa ficar interrompido devido a temperaturas mais elevadas. Um estudo realizado por Howard *et al.* (1983), concluiu que introduzindo *M. crudus* em plântulas de coqueiro estabelecidas em ambiente controlado, por exemplo, numa estufa, após um determinado período de tempo, as plantas exibiram sintomas do ALC, mas por outro lado, no mesmo ambiente controlado e na ausência de *M. Crudus*, as plantas permaneceram sãs.



**Figura 2.1:** Biologia do Amarelecimento Letal

Segundo informação do EPPO, as espécies Auchenorrhynchan foram confirmadas como sendo potenciais vectores do ALC. Em África, mais particularmente no Gana foi identificada uma outra espécie de *Myndus* denominado *M. adiopodoumeensis* como potencial vector do ALC, enquanto que na Tanzania foram encontrados insectos da sub-ordem Auchenorynchous e *Diartrombus mkurangai* em campos de coqueiros infectados pelo ALC. O padrão de voo destes insectos

coincidiu com o padrão de expansão de doença, o que levou a suspeitar que estas espécies são prováveis vectores do AL na Tanzania (Mpunami, 1997).

Vários estudos foram efectuados para identificação do vector transmissor do ALC, através da colecta de vários insectos em campos de coqueiros infectados, uma vez que não se conhecem ainda os habitats preferenciais destes insectos (Kaiza, 1987). Segundo Mpunami *et al* (2000), nem sempre a detecção do ADN do fitoplasma do ALC no sistema digestivo de um insecto, implica necessariamente que este seja transmissor da doença. O mesmo autor, afirma que analisando o PCR dos potenciais insectos vectores com o daqueles que não são considerados vectores, ambos haviam adquirido o fitoplasma durante a alimentação. Este estudo mostra que são necessários testes mais apurados, como por exemplo, o sequenciamento do ADN e a exposição da planta aos possíveis vectores, para afirmar que um insecto é realmente o potencial vector de transmissão do ALC.

Em Moçambique, o vector não foi ainda identificado, contudo, neste momento estão em curso estudos visando a sua identificação. Um estudo realizado por Dollet *et al* (2007), nas províncias da Zambézia e Cabo Delgado, revelou que na província da Zambézia, nenhum outro insecto foi encontrado em coqueiros infectados para além dos Derbids. Na província de Cabo Delgado foram encontrados 40 “Green pentatomid bugs” da espécie *Platacantha lutea*. Destes insectos, foram testados apenas 12 indivíduos, dos quais sete *P. lutea* foram positivos no teste de PCR. Contudo, citando Dollet *et al* (2007), este resultado pode ser apenas pelo facto destes insectos alimentarem-se do coqueiro e não que eles sejam vectores do ALC.

### **2.3. Historial do Amarelecimento Letal do Coqueiro em Moçambique**

Em Moçambique a doença foi identificada pela primeira vez no País em 1992, no Distrito de Palma, na Província de Cabo Delgado tendo sido confirmada em 1996 na mesma Província nos Distritos de Palma, Mocímboa-da-Praia e arredores da Cidade de Pemba (Uaciquete & Rao, 1997). Mais tarde, foi observada na província da Zambézia, nos distritos de Pebane, Manganja-da-Costa, Namacurra, Nicoadala, Inhassunge e Chinde e província de Nampula, distritos de Angoche e Moma (PD Sub-Sector Coqueiro 2005).

Na tentativa de fazer face ao problema, o Governo de Moçambique (GM) tem vindo a envidar esforços no sentido de mitigar a doença nas zonas infectadas e prevenir o alastramento para áreas ainda livres. Assim, o GM beneficiou-se do financiamento para o subsector do coco através do Programa de Apoio ao Sector do Coqueiro em Moçambique (PASCOM), Projecto de Apoio a Renda do Agricultor (FISP) e Projecto para Estabelecimento de áreas Livres de ALC (STDF/WTO).

O Projecto PASCOM tinha como objectivos, o controlo da expansão da doença através do abate e queima de plantas infectadas com ALC e o aumento das receitas e nível de vida das populações, através da intensificação agrícola e distribuição de variedades melhoradas. Foram importadas da Costa do Marfim, 21 variedades altamente produtivas e resistentes ao ALC, estando ainda em campo de ensaios para avaliação de variedades resistentes.

O projecto FISP priorizava entre várias componentes, a componente de segurança alimentar e apoio aos pequenos agricultores na contenção da doença pelo método de abate e queima de plantas doentes, renovação dos palmares, usando o gigante verde de Moçambique e outras variedades tolerantes à doença e a diversificação das culturas para fazer face a questão de segurança alimentar. Pela intervenção deste programa, foi possível abater 600.000 coqueiros doentes na zona epidémica, foram limpos 8.000 ha na zona endémica, replantadas 757.326 mudas de coqueiros e coberta uma área de 8.000 ha de culturas alternativas, nomeadamente feijão boer, feijão nhemba, gergelim e amendoim. Para o estudo de variedades resistentes estão em curso ensaios para apuramento de variedades que possam resistir à infecção do fitoplasma.

A Província de Inhambane, a segunda maior produtora de coco no País, beneficiou-se em 2010, do Projecto para Estabelecimento de áreas Livres de ALC, uma vez que até a altura, nenhum foco da doença havia sido identificado neste ponto do País. O Projecto tinha como objectivos, estabelecer e desenvolver capacidade fitossanitária em Moçambique para implementação dos padrões/normas internacionais de medidas fitossanitárias (ISPM), tendo em vista controlar a doença do ALC e aumentar o acesso ao mercado internacional do coco, bem como estabelecer e manter a zona Sul do país, como zona livre da doença.



Assim em 2010, foi identificado um foco da doença no Distrito de Vilankulo (Relatório STDF, 2010), província de Inhambane (figura 1.3.1), tendo sido eliminado imediatamente. Nesta altura, foi desenhado pelo Ministério da Agricultura através da Direcção Nacional de Serviços Agrários, o Plano de Acção para Contenção do ALC na zona Sul do País. O Plano tinha como objectivos, realizar monitorias regulares às Províncias de Inhambane, Gaza e Maputo, com vista a prevenir o surgimento de novos focos e a institucionalização de medidas de quarentena doméstica visando prevenir a entrada de material infectado das zonas com ALC para a zona Sul no geral e em particular a província de Inhambane.

#### **2.4. Impacto da Doença em Moçambique**

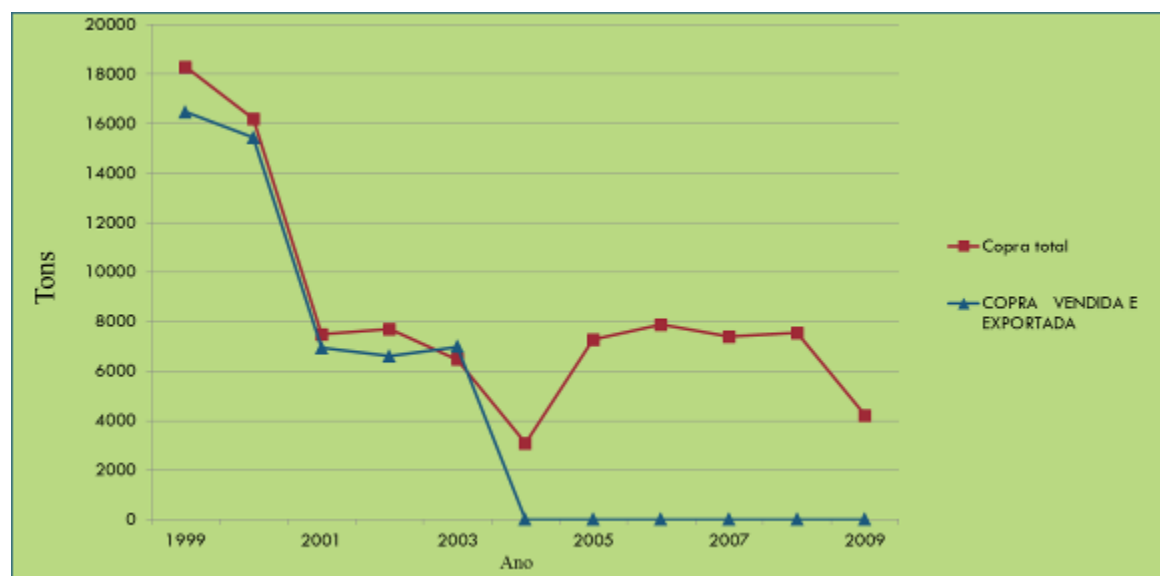
No País, a doença tem efeitos negativos em termos de rendimentos dos agricultores, segurança alimentar e disponibilidade de matéria prima para o agro-processamento. Para além da redução da renda familiar e insegurança alimentar a que as famílias estão sujeitas, devido a redução da produção de coco e seus subprodutos, a doença levou muitas famílias a migrarem dos seus locais de origem para as cidades, procurando melhores condições de vida. Hoje em dia, pode-se observar na Província da Zambézia, uma invasão do mangal, para obtenção de lenha para a venda, na tentativa de colmatar o défice de renda a que as famílias estão expostas. De referir que a invasão do mangal proporciona consequências negativas para o meio ambiente.

Dados do TTI indicam que, há 20 anos, existiam na província da Zambézia cerca de 15 milhões de coqueiros, mas hoje, devido à doença do ALC, apenas metade deste número é que prevalece e com tendência a reduzir ainda mais, se um programa intensivo de contenção do ALC e repovoamento do palmar não for implementado. Os Distritos de Chinde e Inhassunge na província da Zambézia, são os mais afectados, chegando a mortalidade dos coqueiros a atingir os 100% (Mondjana *et al*, 2010).

Por outro lado, devido à elevada produção de coco e seus derivados que o País outrora foi detentor, estes produtos eram exportados para vários países, incluindo a vizinha África do Sul. Com o surgimento do ALC, Moçambique ficou interdito de exportar coco e seus derivados para a República da África do Sul no período 2004 à 2005, contribuindo negativamente para a economia nacional. A produção de copra baixou de 18.000 toneladas em 1999 para 4.000



toneladas em 2009 (Gráfico 1), afectando a indústria e as populações dependentes deste produto para subsistência.



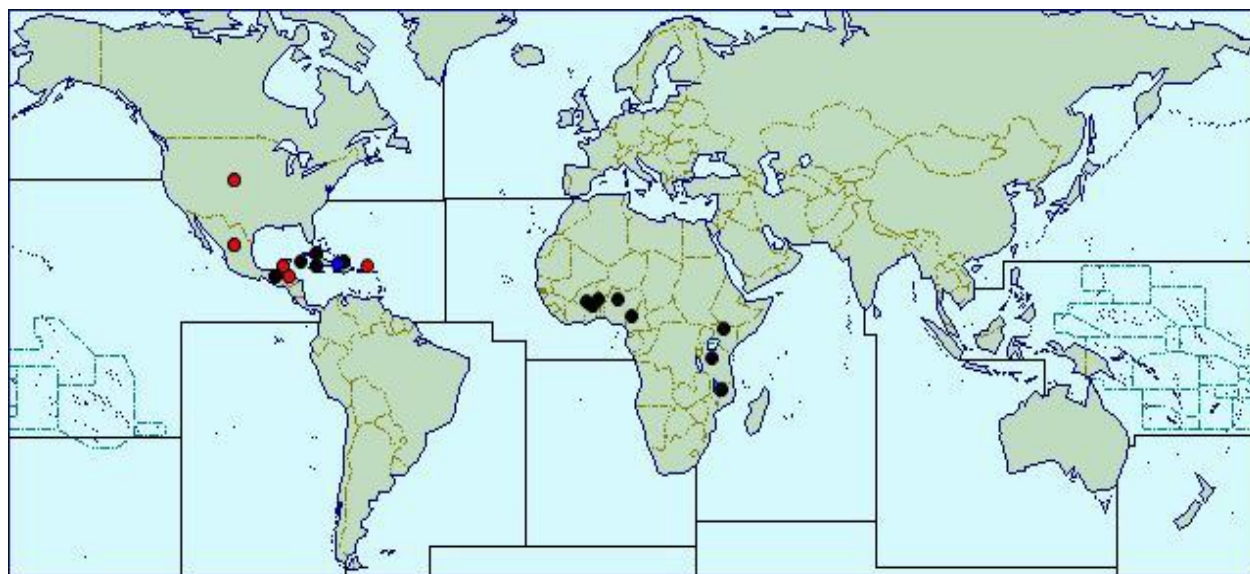
**Gráfico 1:** Variação da produção de copra na província da Zambézia

## 2.5. Amplitude do Hospedeiro e Distribuição Geográfica do Fitoplasma do ALC

O fitoplasma do ALC não só infecta a cultura do coqueiro (*Cocos nucifera*), mas também tem como hospedeiro, outras palmeiras como *Borassus flabellifer*, *Howeia forsteriana*, *Phoenix canariensis*, *P. dactylifera*, *P. reclinata* e *P. sylvestris* (Harrison & Howard, 2007). Harries (1977) e Howard *et al.* (1979) mencionam cerca de 30 espécies susceptíveis à infecção pelo ALC, destacando entre outras a *Arenga engleri*, *Caryota mitis*, *Chrysalidocarpus cabadae*, *Dictyosperma album*, *Livistona chinensis*, *L. rotundifolia*, *Trachycarpus fortunei*, *Veitchia macdanielsii*, *V. merrillii*, *Allagoptera*, *Arenga*, *Arikuryroba*, *Borassus*, *Corypha*, *Dictyosperma*, *Gaussia*, *Hyophorbe*, *Latania*, *Livistona*, *Mascarena*, *Nannorrhops*, *Phoenix* e *Pritchardia*.

Segundo Howard (1983), a zona de origem do fitoplasma não é conhecida, mas apontam-se dois locais como possíveis focos de origem da doença, nomeadamente, Sudeste da Ásia e Caraíbas. Actualmente, a doença encontra-se distribuída na América do Norte, nomeadamente, Estados Unidos, Florida, Miami e Palm Beach, Texas e México na Península Yucatan; América Central, Bahamas, Ilhas Caimã, Cuba, República Dominicana, Haiti, Honduras, Jamaica, Guatemala e

Belize; América do Sul em Guiana e em África no Benin, Camarões, Ghana, Quênia, Moçambique, Nigéria, Tanzânia e Togo (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Distribuição da doença do ALC no mundo (Fonte: <http://www.cabi.org/isc/?compid>)

**Legenda:** ● = Presente, sem detalhes

● = dispersa

● = presente, bem localizado e detalhado

## 2.6. Sintomas causados pelo Amarelecimento Letal do Coqueiro

Após a infecção do coqueiro pelo fitoplasma do ALC, a planta permanece saudável, crescendo normalmente, durante um período de latência de cerca de nove meses (262 dias). Terminado este período, os sintomas começam a manifestar-se de forma progressiva (Dabek, 1975), começando pela necrose da inflorescência, cujas flores apresentam-se parcialmente escurecidas, em vez de amarelo-creme (Martinho *et al*, 2002). Pode ocorrer uma descoloração total nas inflorescências ainda não emergentes. A maioria das flores morre, resultando na ausência de frutos (CABI, 2000) (Figura 2.3).

Quando os frutos são produzidos, ocorre queda prematura de frutos ainda verdes ou já maduros que podem desenvolver escurecimento e podridão (Figura 2.4) (Harrison and Elliot, 2008), reduzindo a viabilidade das sementes (CABI, 2000).



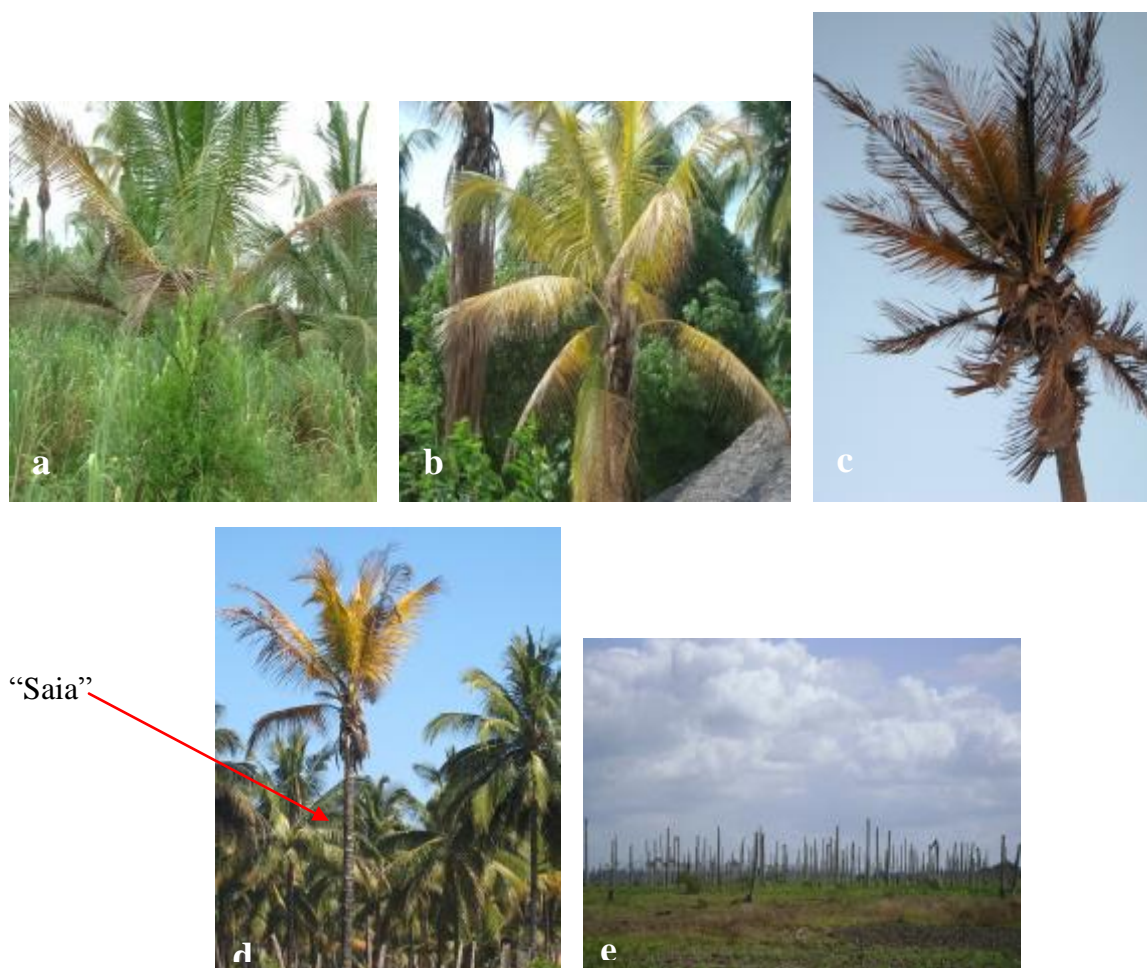
**Figura 2.3:** Necrose das inflorescências



**Figura 2.4:** Queda prematura dos frutos.

Depois da necrose das inflorescências, ocorre a clorose das folhas, que posteriormente se tornam amarelo-alaranjadas no caso das variedades gigantes e castanho-avermelhadas no caso das variedades anãs. O amarelecimento inicia nas folhas mais velhas (Figura 2.5a), ocorrendo em apenas uma folha (folha bandeira), progredindo mais tarde para as folhas mais jovens (Figura 2.5b), e finalmente para a coroa como um todo. A descoloração se torna amarronzada, seguida de dissecação e morte dos tecidos afectados (Figura 2.5c). A morte das folhas forma uma espécie de “saia” ao redor do tronco (Figura 2.5d), antes da queda. Finalmente, o meristema apical apodrece, a planta morre, e ocorre o colapso da coroa, deixando o tronco nú (Figura 2.5e) (Marinho *et al*, 2002).

Antes do aparecimento de qualquer dos sintomas foliares mencionados acima, ocorre a necrose das raízes devido à infecção pelo fitoplasma do ALC (CABI, 2000). Ao fim de 3-7 meses depois do aparecimento dos primeiros sintomas, ocorre a morte da planta.



**Figura 2.5:** Sintomas do ALC. a) sintomas nas folhas mais velhas; b) progressão dos sintomas para folhas mais jovens; c) dissecação e morte dos tecidos; d) “Saia” a volta do tronco; e) tronco nú.

## 2.7. Sintomas Semelhantes aos Sintomas do Amarelecimento Letal do Coqueiro

Os sintomas da doença do Amarelecimento Letal do Coqueiro são muitas vezes confundidos com os sintomas de outras doenças ou sintomas relacionados com carências de nutrientes ou ainda sintomas causados por factores abióticos (Mondjana *et al*, 2010). Dentre os vários sintomas que se podem confundir com os sintomas do ALC, destacam-se os seguintes: sintomas causados pela Murcha de Fusarium e Murcha de Ganoderma, a deficiência dos nutrientes, Boro, Manganês, Magnésio, Nitrogénio e Potássio e os danos causados por Relâmpagos.



### 2.7.1. Sintomas causados pela Murcha de Fusarium

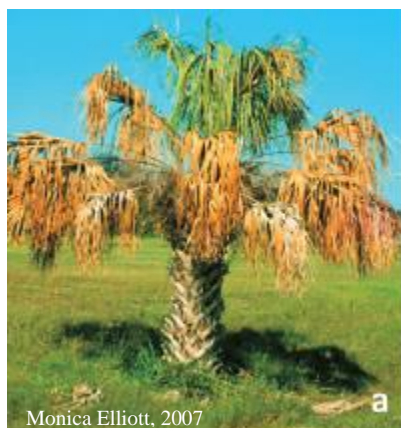
A Murcha de Fusarium é causada pelo fungo designado *Fusarium oxysporum*, que provoca uma descoloração das folhas (Figura 2.6) semelhante ao estágio de amarelecimento de todas as folhas da base para o topo no caso do ALC. Porém, não apresenta nenhuma outra sintomatologia dos diferentes estágios da doença do ALC.



**Figura 2.6:** sintomas de *Fusarium oxysporum* na palmeira da espécie Phoenix

### 2.7.2. Sintomas causados pela Murcha de Ganoderma

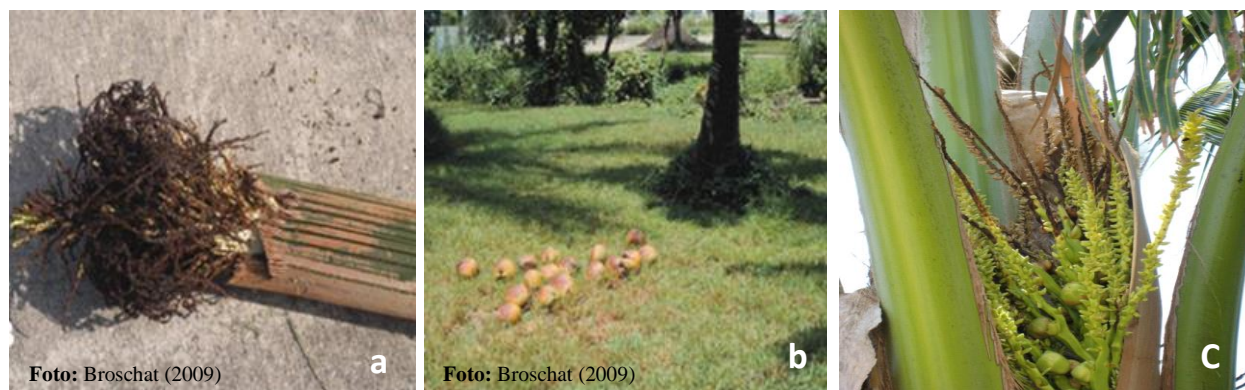
A murcha de Ganoderma é uma doença causada por um fungo *Ganoderma zonatum*. Esta doença é facilmente confundida com o ALC pelo facto de, na fase avançada da doença, as folhas ficarem amarelas e caídas (Figura 2.7a), a semelhança do que acontece com a doença do ALC. Contudo, a diferença reside no facto de que o fungo cresce na parte externa do tronco, formando cogumelos (Figura 2.7b)



**Figura 2.7:** sintomas causados pela Murcha de Ganoderma

### 2.7.3. Sintomas causados pela deficiência de Boro (Bo)

A semelhança do ALC, a falta de Bo na planta provoca a queda prematura dos frutos (Figura 2.8a) e necrose das inflorescências (Figura 2.8b), mas esta necrose é diferente da necrose causada pelo fitoplasma do ALC (Figura 2.8c), uma vez que esta última inicia na ponta das inflorescências.



**Figura 2.8:** Sintomas de deficiência de Boro. **a** – necrose das inflorescências; **b** – queda prematura de frutos; **c** – necrose das inflorescências devido ao ALC

### 2.7.4. Sintomas causados pela deficiência de Manganês (Mn)

A falta deste nutriente na planta causa clorose, encaracolamento e redução das folhas mais novas (Figura 2.9a). Na fase mais avançada, as folhas exibem necroses irregulares (Figura 2.9b), motivo pelo qual são confundidos com os sintomas do ALC.



**Figura 2.9:** Sintomas da deficiência de Manganês. **a** – encaracolamento das folhas; **b**- necroses irregulares nas folhas

#### 2.7.5. Sintomas causados pela deficiência de Magnésio (Mg)

A falta deste nutriente leva ao surgimento da cor amarela-alaranjada nas folhas e ao longo das margens (Broschat e Elliott, 2005), mantendo o centro da folhagem com a cor verde (Figura 2.10). Ao contrário dos sintomas do ALC, as folhas apresentam uma cor amarela-acastanhada.



**Figura 2.10:** Sintomas de deficiência de Mg

#### 2.7.6. Sintomas causados pela deficiência de Nitrogénio (N)

A falta de nitrogénio nas plantas provoca uma coloração amarelo-esverdeado nas folhas velhas e redução de tamanho e clorose nas folhas mais novas (Figura 2.11). Por sua vez, os sintomas do ALC caracterizam-se pelo amarelecimento acastanhado e uniforme das folhas.



**Figura 2.11:** Sintomas de deficiência de Nitrogénio



### 2.7.7. Sintomas causados pela deficiência de Potássio (K)

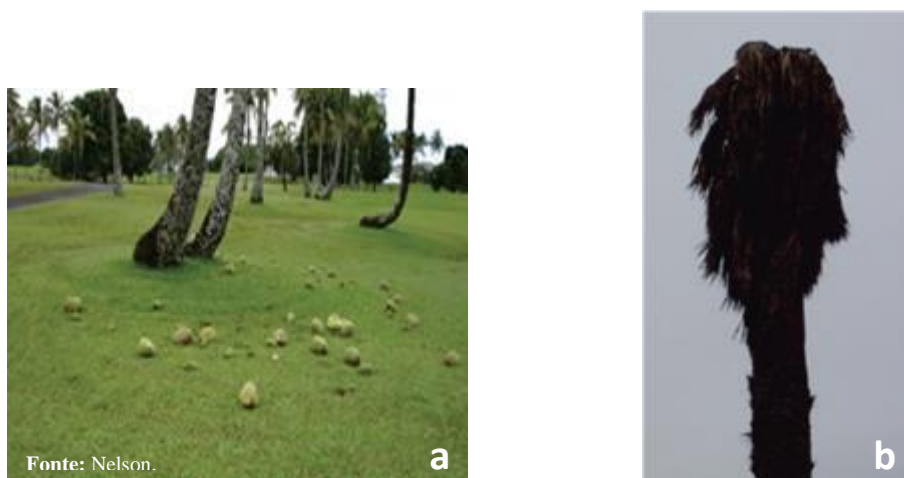
Na fase inicial de deficiência de K as folhas apresentam uma coloração amarelo-alaranjada, com manchas pretas ou necróticas nas folhas mais velhas (Figura 2.12). Na fase mais avançada da deficiência de K, os sintomas podem ser confundidos com os do ALC.



**Figura 2.12** Sintomas de deficiência de K

### 2.7.8. Sintomas causados por Relâmpagos

Os sintomas típicos de plantas atingidas por relâmpagos caracterizam-se pela queda dos frutos (Figura 2.13a) e colapso repentino da canópis (Figura 2.13b). Estes sintomas são também confundidos com os da doença do amarelecimento letal do coqueiro. Contudo, nalgumas vezes, as plantas afectadas por relâmpagos apresentam “sangramento” e queimaduras.



**Figura 2.13:** Sintomas devido a relâmpagos. a – queda de frutos; b – Morte da planta



## **2.8. Meios de Propagação e Dispersão da Doença**

A dispersão natural ocorre através do movimento do insecto vector. Contudo, o material de propagação, incluindo de espécies ornamentais, pode transportar o patógeno durante as viagens, embora seja difícil transportar o vector através de material de propagação, excepto pelo movimento dos adultos, até um raio de aproximadamente 100 km (McCoy *et al.*, 1976). Pelo facto da baixa eficiência do vector, a probabilidade deste transportar o fitoplasma para locais muito distantes (internacionais) também é baixa. Por outro lado, é possível transportar o vector (*M. Crudus*) no estado de ninfa no solo acompanhado da planta, mas neste estágio ele não está infectado pelo fitoplasma.

Por outro lado, a transmissão da doença através da semente tem sido um assunto controverso, dado que ainda não foram produzidas evidências científicas, embora se acredite que embriões infectados pela doença podem mostrar diferentes comportamentos na germinação (Nipah, *et al.*, 2007). A transmissão por semente ainda não foi descrita, apesar de análises de PCR, confirmarem a presença do ALC no tecido embrionário de sementes provenientes de plantas infectadas (CABI, 2000). Um estudo recente realizado por Nipah *et al.* (2007) revelou a presença do fitoplasma do amarelecimento letal do coqueiro em apenas uma semente de todos os frutos produzidos por um coqueiro que apresenta sintomas iniciais da doença.

## **2.9. Maneio/ Controlo da doença**

As doenças causadas por fitoplasmas são de difícil controlo uma vez infectada uma determinada zona, sendo por isso importante manter medidas de exclusão para prevenir a entrada destes microrganismos. Por outro lado, uma vez introduzido o fitoplasma, é importante a identificação imediata das plantas sintomáticas, para que medidas de controlo possam ser implementadas. No caso específico do ALC, vários métodos vêm sendo aplicados para a contenção da doença, desde a limpeza dos campos, uso de material livre da doença, uso de variedades resistentes e erradicação atempada de coqueiros infectados.

### **2.9.1. Controlo Genético**

O melhor método de controlo do ALC é o plantio de variedades resistentes à doença. Para o caso de Moçambique a variedade “Gigante Verde de Moçambique” tem-se mostrado resistente a

doença. Em Alguns campos dos Distritos costeiros da Província da Zambézia, onde a doença mais danos causou aos coqueiros, é possível observar coqueiros da variedade gigante verde, não infectados, no meio de plantas infectadas e com sintomas visíveis. Nesta Província, estão em curso, ensaios para o apuramento de variedades resistentes, cuja semente é proveniente da Costa do Marfim, uma vez que neste País, nunca foi diagnosticada a doença do ALC. São cerca de 30 variedades em campo, das quais 20 variedades foram semeadas em 2005 e mais 10 variedades semeadas no corrente ano (Freire, 2013).

Na Jamaica foram testadas várias variedades com objectivo de apurar a sua resistência ao ALC. Destas variedades, as que se mostraram resistentes à doença foram: Anão Verde da Malásia, Anão Amarelo da Malásia, Anão Doirado da Malásia, Anão Fiji, Anão Vermelho *Spicate*, Anão Verde *Chowghat* e *Ceylon King* (Howard and Harrison, 2007). A utilização de sementes de variedades de coqueiros resistentes pode contribuir significativamente na redução da propagação do ALC em muitos locais onde a doença ocorre. O Gana é também um exemplo concreto de desenvolvimento de variedades resistentes e com sucesso no controlo da doença (Dery *et al*, 1995). No Gana, nove ensaios foram estabelecidos para o estudo da resistência, envolvendo 38 variedades. Destes ensaios, apenas dois não foram ainda afectados pela doença depois de mais de 20 anos (Dery *et al*, 1995). O híbrido do cruzamento entre Anão verde de Sri Lankan (SGD) e Vanuatu Tall (VTT), mostrou ser resistente ao ALC, apresentando inclusive boas características agronómicas e tem contribuído para a recuperação da indústria do coco no Gana (Dare *et al*, 2010).

### **2.9.2. Controlo Químico**

O controlo do vector com insecticidas é também crucial para limitar a dispersão da doença, assim como o controlo de infestantes, dado que algumas infestantes nas plantações de coqueiros são hospedeiros alternativos das ninfas de *M. crudus* (Howard, 1990).

O Tratamento dos coqueiros infectados com injeção de oxytetracycline-HCl no tronco, também têm mostrado remissão de sintomas do amarelecimento letal (McCoy, 1975). As Plantas tratadas produzem um novo crescimento e podem manter-se sem sintomas pelo retratamento em intervalos de três meses (Howard & Harrison, 2007). Contudo, este não é um método curativo nem sustentável a longo prazo, uma vez que acareta custos elevados, para além de não ser

benéfico ao ambiente. Por outro lado, o uso de insecticidas pode contribuir para o desenvolvimento de insectos vectores resistentes.

O tratamento biológico do vector, através da utilização de parasitóides, predadores e fungos, seria o método mais adequado para redução da população, desde que se mantenha um ambiente natural que não prejudique o estabelecimento e manutenção destes microorganismos.

### **2.9.3. Controlo Cultural**

Segundo Haward e Harrison (2007), *Myndus crudes*, um dos vectores do ALC, na fase larval, desenvolve-se em infestantes ao redor dos coqueiros e apenas a fase adulta é que se alimenta das folhas do coqueiro. Assim sendo, é importante o controlo destas infestantes através do arranque manual e queima das mesmas. Por outro lado, o controlo pode também ser efectuado mantendo infestantes que não são da preferência do vector, como é o caso do uso de dicotiledóneas. Porque *M. Crudes* não têm preferência por infestantes dicotiledóneas, estas infestantes podem ser plantadas nos campos de coqueiros, reduzindo assim a população do vector. Contudo, este método por si, não resolve o problema da doença, mas deve ser integrado com os outros métodos de controlo.

No Gana, a estratégia de manejo/controlo do amarelecimento letal do coqueiro foi baseada no abate e queima de plantas infectadas, logo que aparecessem os primeiros sintomas, permitindo a contenção da doença e prevenção de novos focos da doença (Burford, 2006). Por outro lado, foi feita a reposição das plantas abatidas em áreas livres da doença, pelo uso de plantas resistentes ao ALC, como é o caso de Sri Lanka Green Dwarf, Vanuatu Tall (VTT) e um híbrido proveniente do cruzamento entre Malayan Yellow Dwarf e VTT.

### **2.9.4. Medidas de Exclusão**

Esta medida visa essencialmente impedir o movimento de plantas das regiões onde a doença já existe para as regiões ainda livres da doença. Uma vez que o diagnóstico da doença é difícil, a certificação de material de propagação para exportação não é considerada uma protecção adequada contra a introdução da doença. A melhor medida para impedir a dispersão do ALC de Países infectados para Países ainda livres da doença, é a proibição de importação de plântulas de

coqueiro dos Países infectados (OEPP/EPPO, 1990), incluindo outras palmeiras ornamentais susceptíveis.

Esta medida é aplicada a nível internacional, mas também se pode aplicar a nível interno, ou seja, dentro de um País. Quando aplicada dentro de um determinado país, denomina-se quarentena doméstica.

## Bibliografia

- Borford, H. (2006). Coconut lethal yellowing in Ghana: a new hybrid is being tested. <http://www.innovations-report.com/html/reports/agricultural-sciences/report-69870.html>
- Dollet, M. (2009). A hybrid coconut to control lethal yellowing disease in Ghana. CIRAD, Agricultural Research for Development. <http://www.cirad.fr/en/research-operations/research-results/2009/a-hybrid-coconut-to-control-lethal-yellowing-disease-in-ghana>. 07/2010.
- Broschat, T. K. and Elliott, M. L. (2005). Disorders and Diseases of Ornamental Palms. University of Florida, SP 360.
- CABI (2000). Crop protection compendium: global version. Wallingford, Oxon, UK.
- Dabek, A. J. (1975). The incubation period, rate of transmission and effect on growth of coconut lethal yellowing disease in Jamaica. *Phytopathologische Zeitschrift*, Berlin, v. 84, n. 1, p. 1-9.
- D'arcy, C.J.; Nault, L.R. (1982). Insect transmission of plant viruses and mycoplasma-like and rickettsial-like organisms. *Plant Disease*, St. Paul, v. 66, p. 99-104.
- Dare, D., Andoh-Mensah, E., Nipah, J. O., Yankey, N., Quaicoe, R. N., Nkansah-Poku, J. and Dery, S. K. (2010). Evaluation of some basic traits of a promising coconut hybrid: Sri Lankan Green Dwarf crossed to Vanuatu Tall (SGD x VTT). *Journal of science and technology*, Vol. 30, N° 3 (2010), pp 9.
- Dery, S.K., N'Cho, Y.P., Quaicoe, R.N., Arkhurst, E.D. and, Philippe, R. (1995). Screening For Resistance to Lethal Yellowing Disease of Coconuts in Ghana: An update of trial Results. [http://www.plantapalm.com/vpe/pestsanddiseases/vpe\\_coconutly1.htm](http://www.plantapalm.com/vpe/pestsanddiseases/vpe_coconutly1.htm)
- Dollet, M.; Macome, F.; Vaz, Antónia e Fabre, S. (2007). Phytoplasmas identical to coconut lethal yellowing phytoplasmas from Zambesia (Mozambique) found in a pentatomid bug in Cabo Delgado province. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S139-S140, 2011, ISSN 1721-8861.
- EPPO quarantine pests (1990). Palm Lethal Yellowing Phytoplasma. Data Sheets on Quarantine Pests. Prepared by CABI and EPPO for the EU under contract 90/399003.
- FISP (2013). Relatório trimestral do provedor de serviços do FISP. Relatório de progresso Q 14 - Ano 4 do ACDIVOCA.
- Freire, M. (2013). Comunicação verbal. Projecto FISP/MCA.
- Harries, H.C. (1977) In: *Plant health and quarantine in international transfer of genetic resources* (Ed. by Hewitt, W.B.; Chiarappa, L.). CRC Press, Cleveland, USA.
- Harrison, N. A. and Elliott, M. L. (2007). Lethal yellowing (LY) of palm.

Harrison, N.A. and Elliott, M.L. (2008). Lethal Yellowing of Palms. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0714-01.

Harrison, N.A., Helmick E.E & Elliott M.L. (2008). Lethal yellowing-type diseases of palms associated with phytoplasmas newly identified in Florida, USA. *Annals of Applied Biology* v.153, p. 85–94.

Howard, F.W.; Thomas, D.L.; Donselman, H.M.; Collins, M.E. (1979) Susceptibilities of palm species to mycoplasma-like organism-associated diseases in Florida. *FAO Plant Protection Bulletin* v.27, p.109-117.

Howard, F.W.; McCoy, R.E. (1980) Reduction in spread of mycoplasma-like organism-associated lethal decline of the palm, *Veitchia merrillii*, by use of insecticides. *Journal of Economic Entomology* v.73, p. 268-270.

Howard, F.W. (1983) World distribution and possible geographical origin of palm lethal yellowing disease and its vectors. *FAO Plant Protection Bulletin* 31, p.101-113.

Howard, F. W., Norris, R. C., and Thomas, D. L. (1983). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Mindus crudus* (Homoptera: Cixiidae). *Trop. Agric.* v.60, p.168-171.

Howard, F.W.; Thomas, D.L.; Donselman, H.M.; Collins, M.E. (1979) Susceptibilities of palm species to mycoplasma-like organism-associated diseases in Florida. *FAO Plant Protection Bulletin* 27, p.109-117.

Howard, F.W. & Harrison, N.A. (2007). Lethal Yellowing of Palms. [http://flrec.ifas.ufl.edu/Hort/Palms/lethal\\_lethal\\_yellow\\_facts.htm](http://flrec.ifas.ufl.edu/Hort/Palms/lethal_lethal_yellow_facts.htm). p. 6. Published in 2/8/2007. 10:17 AM.

Harrison NA, Helmick EE, Elliott ML (2008). Lethal yellowingtype diseases of palms associated with phytoplasmas newly identified in Florida, USA. *Annals of Applied Biology* 153, 85–94.

Howard, F.W. (1983) World distribution and possible geographical origin of palm lethal yellowing disease and its vectors. *FAO Plant Protection Bulletin* 31, p.101-113.

Howard, F.W. (1990). Evaluation of grasses for cultural control of *Myndus crudus*, a vector of lethal yellowing of palms. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 56, p. 131-137.

Kaiza, D. A. (1987). History and etiology of the lethal disease of coconut palm, *Cocos nucifera* L., in Tanzania. (MSc Thesis). Sokoine, Tanzania: Sokoine University of Agriculture. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3059.2000.00460.x/full>

MADAL, 2008. The situation of the coconut palm plantation in Mozambique, with a focus on the diseases affecting it. Apresentado por Emanuel Lourenço na Conferência sobre o coco no Ghana.

Marinho, V.L de A; Batista, M. F. E e Miller, R. (2002). Praga quarentenária A1 Amarelecimento Letal do Coqueiro “Coconut Lethal Yellowing. Brasília DF, ISSN 0102-0099.

McCoy, R. (1976). Comparative epidemiology of the lethal yellowing, kaincopé and cadang-cadang disease of coconut palm. Plant Dis. Rep. 60, p.498-502.

McCoy, R.E., Howard, F.W., Tsai, J.H., Donselman, H.M., Thomas, D.L., Basham, H.G., Atilano, R.A., Eskafi, F.M., Britt. L. and Collins, M.E. (1983). Lethal Yellowing of Palms. University of Florida Agricultural Experiment Station Bulletin no. 834. Gainesville, Florida.

McCoy, R. (1976). Comparative epidemiology of the lethal yellowing, Kaincopé and cadang-cadang diseases of coconut palm. Plant Dis. Rep. 60, p.498-502.

Mondjana, A.M. (2010). Amarelecimento Letal do Coqueiro em Moçambique, breve historial e situação actual. Comunicação verbal.

Mondjana, A.M.; Santos, L., Mangana, S. Massingue, F. e Massinga, J. (2010). Relatório sobre Estabelecimento de áreas livres do amarelecimento letal do coqueiro em Moçambique. Projecto “MTF/MOZ/098/STF (STDF 230). Establishment of pest Free Areas regarding Lethal Yellowing Disease of Coconuts in Mozambique”.

Mondjana, A.M.; Santos, L., Vaz, A., Caniço, A., Mangana, S., Nuaila, V., Massingue, F. e Massinga, J. (2010). Manual Prático para Identificação e Maneio do Amarelecimento Letal do Coqueiro. Editado pela FAO. Arranjo gráfico e impressão: LEIMA IMPRESSÕES ORIGINAIS, LDA.

Mpunamia, A. A.; Jonesb, P. and Dickinsonc, M. J. (2000). Identification of potential vectors of the coconut lethal disease phytoplasma. Plant Pathology (2000) 49, 355±361

Mpunami, A. A. (1997). Molecular methods for detecting the coconut lethal disease (LD) phytoplasma in Tanzania. PhD thesis, University of Nottingham.

Nipah, J.O.; Jones, P. E Dickinson, M.J. (2007). Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected with Cape St Paul wilt disease in Ghana.

Plano Director do Sub-Sector do Coqueiro (2005). Direcção de Economia, Ministério da Agricultura. pp. 26-27

Pudivriti, J. (2010). Informação verbal sobre variedades cultivadas na Zambézia. Coordenador do Projecto FISP/Millennium Challenge Corporation.

Purcell, A.H. (1985) The ecology of plant diseases spread by leafhoppers and planthoppers. In: *The leafhoppers and planthoppers* (Ed. by Nault, L.R.; Rodriguez, J.G.), pp. 351-380. Wiley, New York, USA.

Reinert, J.A. (1980) Phenology and density of *Haplaxius crudus* (Homoptera: Cixiidae) on three southern turfgrasses. *Environmental Entomology* v.9, p.13-15.

TTI (2009). Baseline survey of the distribution and incidence of coconut lethal yellowing disease in Mozambique: “Results of CLYD survey and recommendations of options to follow the distribution of CLYD in the future”. MCA-Moçambique, MPD, Moçambique.

Uaciquete, A.; Rao, Y. P., (1997). Coconut pest and disease situation in Mozambique. Proceedings of the international cashew and coconut conference: trees for life the key to development, Dar es Salaam, Tanzania, 17-21 February 1997: 527-529



# **CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA E/OU EFICÁCIA DA ESTRATÉGIA DE CONTROLO DO AMARELECIMENTO LETAL DO COQUEIRO EM MOCAMBIQUE**

## **3.1. Resumo**

O método de abate e queima de coqueiros infectados com Amarelecimento Letal do Coqueiro (ALC) é um método de controlo aplicado em várias partes do mundo, incluindo Moçambique. No País, o método foi intensificado com a introdução do programa de mitigação implementado pelo Projecto de Apoio à Renda do Agricultor (FISP). O presente estudo foi realizado nos Distritos da Maganja da Costa e Nicoadala na Província da Zambézia, e tinha como objectivos avaliar o estado de saúde das plantas adjacentes à planta central sintomática infectada com ALC e abatida e determinar o raio de abate de plantas infectadas, a partir de uma planta infectada com ALC. No total foram colhidas 231 amostras de tronco de coqueiros para o estudo de avaliação do estado de saúde das plantas adjacentes à planta central doente e abatida e para determinação do raio de abate de plantas infectadas, a partir da planta infectada com ALC. Todas as amostras foram submetidas ao teste de PCR tendo resultado em oito amostras positivas. O método de abate e queima de plantas infectadas mostrou ser um método eficiente porque elimina completamente o inóculo central e eficaz porque a disseminação do ALC para os coqueiros adjacentes ao coqueiro central abatido é interrompida devido à ausência do inóculo. Pelo facto de se tratar de uma zona epidémica, a infecção de novos coqueiros foi muito baixa, tendo dificultado a determinação do raio exacto de abate. Contudo, a recomendação para prevenir a disseminação da doença é de abater o coqueiro central infectado mais os coqueiros sintomáticos adjacentes ao coqueiro central, independentemente da posição (Norte, Sul, Este, Oeste) em relação ao coqueiro central.

### 3.2. Introdução

Em Moçambique, a doença do Amarelecimento Letal do Coqueiro (ALC) surgiu em 1992, no Distrito de Palma, Província de Cabo-Delgado, tendo-se expandido mais tarde para o Distrito de Mocímboa da Praia e arredores da cidade de Pemba, na mesma Província. Posteriormente, a doença expandiu-se para os distritos costeiros das Províncias da Zambézia e Nampula (Mondjana *et al*, 2010). Devido à doença, cerca de 500.000 coqueiros foram mortos de um número de 7.500.000 coqueiros existentes em 2008 na província da Zambézia e Nampula (TTI, 2009). Dados de 2009 estimavam em 2,5% ao ano (cerca de 195.000 plantas), a taxa de novas infecções, concentradas especialmente na zona epidémica, onde o nível de infecção encontra-se abaixo de 10% (FISP/ACDIVOCA, 2011).

Na província da Zambézia, este Sub-Sector empregava até 2000, cerca de 7.000 pessoas em empresas de produção e processamento de coco, tendo este número reduzido bastante com a redução da produção (CEPAGRI, 2006). Devido à doença, o país perde anualmente cerca de \$12.000.000 (Madal, 2011 não publicado), que seriam receitas de exportação e observa-se uma deterioração das condições de subsistência rural para mais de 1.3 milhões de pessoas nas zonas costeiras das províncias da Zambézia e Nampula. Segundo o relatório do Provedor de serviços do FISP, este número poderá aumentar consideravelmente se a doença não for controlada.

A dispersão da doença pode ser rápida dependendo das condições locais como por exemplo, a abundância do vector e medidas de controlo aplicadas (Ashburner 1996). Uma vez o vector presente e havendo condições para o seu desenvolvimento, ele multiplica-se rapidamente, infestando todo o campo ou zona. Mas esta infestação depende também dos hospedeiros disponíveis para as fases de desenvolvimento do insecto, uma vez que as ninfas alimentam-se de infestantes ao redor dos coqueiros e os adultos alimentam-se das folhas do coqueiro. Nesta fase, medidas de controlo devem prevalecer para impedir o crescimento das ninfas e consequentemente reduzir-se-á a população dos adultos.

Segundo Harrison e Elliott (2008), a dispersão da doença do ALC, é caracterizada como sendo “aos saltos”, em relação ao coqueiro central (foco), e esta disseminação pode ser influenciada pelos ventos. A planta central infectada é usada como foco de dispersão da doença à medida que

o insecto vector for se alimentando, uma vez que este adquire o fitoplasma durante a alimentação. As primeiras plantas a serem contaminadas serão as plantas ao redor da planta infectada, podendo o vector se deslocar até cerca de 100 km ou mais onde provavelmente estabelecerá um novo foco. Os mesmos autores afirmam que a dispersão da doença da cidade de Miami a cidade de Palm beach, na Flórida, distanciadas por cerca de 128 km, ocorreu em 3 anos, enquanto que na Jamaica a dispersão da doença do Oeste para Este, distanciadas 238 km, ocorreu em 60 anos. Existem sem dúvidas, diferenças na dispersão da doença dependendo da localização geográfica.

As medidas de intervenção em vários Países do mundo como Gana, Jamaica, Flórida e incluindo Moçambique, têm-se cingido na eliminação de plantas doentes como forma de destruição do foco da doença.

Analisando as áreas de produção de coqueiro existentes nas províncias da Zambézia e Nampula e que se beneficiaram da intervenção do FISP, estima-se que de um total de 130.000 ha existentes, apenas 58.500 ha correspondem à zona epidémica, onde ainda se justifica uma intervenção de forma a retardar a velocidade de infecção e perda de plantas. Os restantes 71.500 ha correspondem às Zonas Endémica e Intermédia, cuja intervenção se deve concentrar na limpeza total dos coqueiros doentes. Nestas últimas zonas, não se afigura economicamente viável qualquer intervenção de manejo devido ao avançado estado de degradação do palmar.

Segundo a definição adoptada pelo FISP, programa de mitigação da doença, considera-se zona epidémica as áreas com menos de 10% de palmeiras infectadas, cujo foco activo da doença encontra-se em expansão. A estratégia de controlo da doença visa essencialmente, prevenir ou reduzir ao máximo a expansão da doença, de tal forma que não infecte novos coqueiros, através do abate de coqueiros infectados, coqueiros já mortos e sua eliminação pela queima ou outro tipo de aproveitamento do tronco.

A zona endémica, considera-se a área cuja incidência da doença situa-se acima de 75%, com maior parte de troncos mortos, cuja intervenção centra-se basicamente na eliminação de todos os

troncos mortos e de qualquer coqueiro doente ainda existente e na limpeza da área. Depois de limpas as áreas, estas podem ser usadas para o estabelecimento de novas plantações.

A principal medida de contenção do problema do ALC é o abate e eliminação das plantas infectadas, que deve ser feita imediatamente após detecção dos primeiros sintomas do ALC. Esta medida pode impedir a expansão da doença para novas áreas, mantendo assim a doença controlada, mas raramente atinge níveis de erradicação da doença (Bourdeix *et al*, 1999).

Esta medida que está a ser implementada pelo FISP nas Províncias da Zambézia e Nampula, permitiu uma redução da incidência do ALC de cerca de 2.5% observados em 2009, para abaixo de 1% em 2011 nas zonas epidémicas (FISP/ACDIVOCA, 2011a), demonstrando assim que uma intervenção activa antecipada pode permitir bons resultados e diminuir os níveis de infecção com fitoplasma e consequentemente retardar a perda do palmar. As plantas adjacentes à planta infectada, por não apresentarem sintomas, devem ser permanentemente vigiadas para permitir uma intervenção atempada.

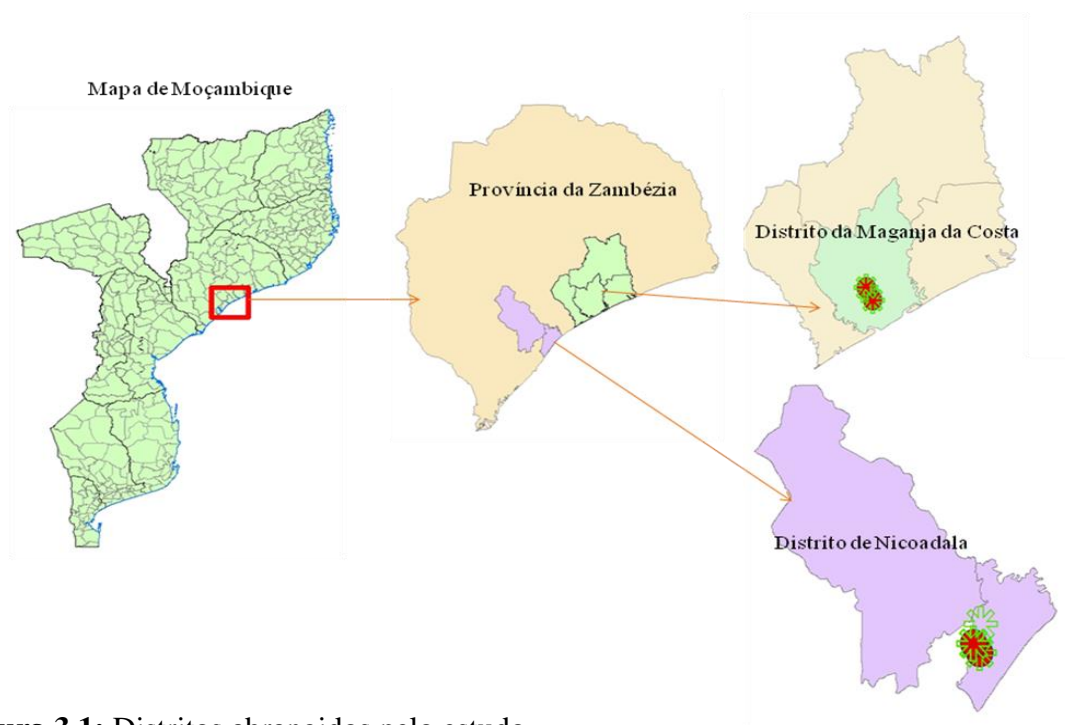
Constituem objectivos deste trabalho:

1. Avaliar o estado de saúde das plantas adjacentes à planta central abatida com sintomas de ALC ;
2. Determinar o raio de abate de plantas infectadas, a partir de uma planta infectada com ALC;

### **3.3. Metodologia de Trabalho**

#### **3.3.1. Local do Estudo**

O estudo foi realizado em dois locais considerados “zonas epidémicas”, a saber: Distritos da Maganja da Costa e Nicoadala na Província da Zambézia. Foram seleccionados seis (6) campos do sector privado, nomeadamente, plantações da antiga Boror e plantações da Madal (Figura 3.1).



**Figura 3.1:** Distritos abrangidos pelo estudo

No Distrito da Maganja da Costa foram seleccionados dois campos da empresa Madal, na localidade de Cabuir e um campo da empresa Boror na localidade de Caroga. No distrito de Nicoadala os levantamentos foram efectuados em dois campos da empresa Madal na localidade de Maquival, povoados de Madal e Temane e um campo da Boror na mesma localidade, mas no povoado de Nanguete (Tabela 2).

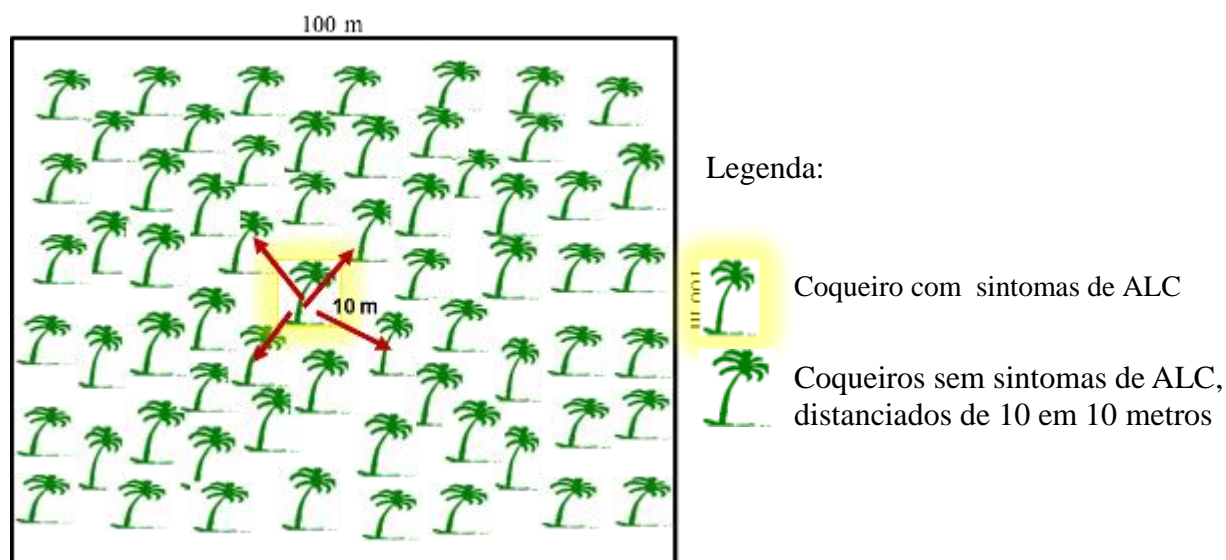
### **3.3.2. Avaliação do estado de saúde das plantas ao redor da planta com ALC abatida**

Em cada Distrito foram seleccionados três campos de amostragem, a citar: dois na Localidade de Cabuir e um em Caroga, no Distrito da Maganja da Costa e três na Localidade de Maquival, no Distrito de Nicoadala (Anexo 1). Os campos encontram-se distanciados 10 km um do outro em plantações do sector privado, previamente identificadas pela equipe de Sistema de Posicionamento Global (GIS), composta de técnicos do provedor de serviços do FISP, ACDIVOCA. Em cada campo de amostragem foram seleccionadas vinte e um (21) coqueiros, das quais o coqueiro central apresentava sintomas do ALC e os vinte adjacentes ao coqueiro central não apresentavam sintomas (Figura 3.2). O coqueiro doente e os vinte coqueiros

adjacentes foram marcados e georeferenciados com auxílio do Sistema de Programação Geográfico (GPS). A distância que separa um coqueiro do outro na mesma linha é de 10 metros.

**Tabela 2:** Localização dos campos de amostragem

Província	Distrito	Localidade	Povoado	Proprietário	# de Campos
Zambézia	Maganja da Costa	Cabuir	-	Madal	2
			-		
		Caroga	-	Boror	1
	Nicoadala	Maquival	Madal	Madal	2
			Temane		
			Nanguele	Boror	1



**Figura 3.2:** Disposição das plantas no campo

### 3.3.2.1. Recolha das Amostras

O método de colecta de amostras do caule foi adaptado do protocolo descrito por Jones (2005) (Anexo 2). Antes do início do processo de colecta de amostras, fez-se a esterilização da broca usando primeiro javel, depois água esterilizada, seguida de álcool e finalmente a esterilização

com chama. Enquanto a broca esfriava, procedeu-se à esterilização da catana com javel, e posterior lavagem com água esterilizada. A seguir, foi retirada uma pequena camada superficial do tronco e com ajuda da broca o material foi recolhido para um tubo falcon contendo sílica dessecada, até  $\frac{1}{4}$  do tubo (Figura 3.3). Os tubos foram etiquetados indicando o local da amostragem, número da amostra, data de colheita e nome do colector.



**Figura 3.3:** Processo de colheita de amostra. **Foto** (Cortesia de Lencastre, Arone)

Depois de recolhido o material nos coqueiros com ajuda da broca, foram selados os locais, com pedaços de madeira de 2-3 cm de comprimento e 10-12 mm de diâmetro, para evitar entrada de outros microrganismos patogénicos.

Para prevenir contaminações, foram removidos com ajuda de uma escova, os detritos que haviam sobrado na broca e novamente passou-se pelo javel, água esterilizada, álcool e chama. Entre cada amostra, este procedimento foi repetido.

Colhidas as amostras, o coqueiro com sintomas, foi abatido e queimado, permanecendo os coqueiros assintomáticos. As amostras foram posteriormente transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM) em Nicoadala, para processamento com base no teste de Reacção em Cadeia Polimerase (PCR) (Anexo 3).



Ao fim de nove meses, seguiu-se a segunda amostragem, nos mesmos locais, nas plantas georeferenciadas e anteriormente sem sintomas. Novamente foram colhidas amostras do material do tronco para testar a presença ou ausência do fitoplasma.

### **3.3.2.2. Análises Laboratoriais**

As análises moleculares das amostras colhidas, foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), localizado no Distrito de Nicosadala, na Província da Zambézia. Foram analisadas um total de cento e dezoito (118) amostras colhidas na primeira amostragem e cento e treze (113) amostras da segunda amostragem.

### **Detecção do Fitoplasma**

Para detecção do fitoplasma responsável pelo amarelecimento letal do coqueiro, primeiro fez-se a extração do ADN total, empregando a metodologia de extração rápida (Daire *et al*, 1992) e posteriormente o teste de PCR, utilizando o *primer* universal P1/P7 e o *primer* do Gana 813f/Awka SR, em caso do primeiro teste ter mostrado bandas positivas para o ALC.

### **Extração Rápida do ADN**

Foram misturados e macerados num almofariz, 500 mg de material recolhido de troncos de coqueiros com 4 mililitros (ml) de buffer CTAB e 1% de Polyvinilpyrrolidone (PVP) medida de uma ponta de espátula. Depois de homogeneizada a mistura, fez-se a transferência de 2 ml do macerado para um tubo de igual volume e acrescentou-se 2 µl da enzima RNase A (20 mg/ml) e deixou-se em repouso por 5 minutos. De seguida, deixou-se incubar a mistura por 20 minutos em banho Maria à 65°C, invertendo 2 a 3 vezes o tubo e colocou-se depois o tubo na centrífuga, para centrifugação à 13000 rpm por 2 minutos seguida da transferência de 1 ml do sobrenadante para um tubo de 2 ml. Transferiu-se o sobrenadante para a câmara de fumos e a este adicionou-se 1 ml de clorofórmio-álcool-isoamílico e agitou-se manualmente durante 20 minutos. Esta mistura, seguiu depois para centrifugação a 13200 rpm durante 15 minutos, fim dos quais transferiu-se 1 ml do sobrenadante para um novo tubo de 2 ml e acrescentou-se 1 ml de Isopropanol gelado, conservado a -20°C.



Ao fim de 30 minutos de repouso, fez-se a centrifugação a 13200 rpm durante 15 minutos e depois descartou-se o sobrenadante ficando apenas com o precipitado (*pellet*).

Ao *pellet* foi adicionado por duas vezes, 1000 µl e 500µl de etanol a 70% e passou pela centrifugação a 13200 rpm a cada adição de etanol durante 10 e 5 minutos, respectivamente. Por cada lavagem, o etanol era retirado com cuidado para não se perder o *pellet*. Finalmente, o tubo contendo o *pellet*, foi invertido e colocado num papel de filtro à temperatura ambiente durante 1 hora para secagem, fim dos quais foi acrescentado ao *pellet* 50µL de água ultrapura e o ADN foi armazenado a -20°C até a sua utilização (protocolo de extracção, Anexo 2).

### **Preparação do Tampão de Extração CTAB**

Procedeu-se a pesagem de 3 gramas (gr) de CTAB, 8.1gr de NaCl (1.4 Molar), 0.8 gr de EDTA (100mµ) e 1.21 gr de trisbase (100mµ). Todos os produtos químicos foram colocados num copo erlenmeyer e adicionou-se água destilada até completar o volume de 100 ml. Usando o Phmetro ajustou-se o PH para 8 e colocou-se a solução no agitador magnético a 75°C a 500-700 rpm cerca de 30 minutos.

### **Teste de PCR**

Para detecção do fitoplasma foram usados dois tipos de *primers*, nomeadamente, *primers* universais P1/P7 do kit Qiagen e no caso dos resultados positivos para P1/P7, estes foram submetidos aos *primers* específicos do Gana 813f/Awka SR para confirmação das estirpes.

Na reacção do PCR, foram incluídas amostras para o controlo positivo e negativo. Para o controlo negativo foi usada água miliq e para o positivo foi usado DNA extraído de coqueiros comprovados como infectados pelo fitoplasma do ALC.

### **PCR usando Primers Universais**

A primeira reacção do PCR foi feita com os *primers* universais P1 e P7, utilizando 1.5 µl de DNA obtido segundo o método de extracção acima mencionado. O volume final da mix para reacção foi de 25µl, contendo para além do DNA da amostra, Coral load PCR buffer a 2.5 µl, água Miliq a 18.25 µl, dNTPs a 0.5 Mm, primers a 1.0 µl e 5 U de Taq polimerase a 0.25 µl.

A amplificação foi realizada em um *termocycler* kratec, programado para um ciclo inicial de 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 50 segundos e 72°C por um minuto e trinta segundos e finalmente seguido por um ciclo de 72°C por dez minutos e 4°C até ao final da reacção.

### **PCR usando Primers Específico do Gana 813f/Awka SR**

A segunda reacção de PCR foi realizada com o *primer* do Ghana 813f/Awka SR, com volume final da mix para reacção de 25µl, contendo 1.5 µl do DNA da amostra, Coral load PCR buffer a 2.5 µl, água Miliq a 18.25 µl, dNTPs a 0.5 Mm, primer a 1.0 µl e 5 U de Taq polimerase a 0.25 µl.

A amplificação foi feita no *termocycler* kratec, programado para um ciclo inicial de 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C por 50 segundos e 72°C por um minuto e trinta segundos e finalmente seguido por um ciclo de 72°C por dez minutos e 4°C até finalizar a reacção.

### **Electroforese em Gel Agarose**

Os produtos da amplificação com os *primers* universais e *primers* específicos foram analisados por electroforese em gel agarose 1% e tampão de corrida TBE. A corrida deu-se a uma voltagem constante de 80 V por 1 hora. A seguir adicionou-se ao gel seis microlitros de uma solução de brometo de etídio para coloração (proporção: 0.5 µl para 10 ml de solução). As bandas do ADN foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta.

### **Preparação do Buffer TBE - Tampão de corrida**

Para preparação deste tampão procedeu-se com a pesagem de 108 gr de trisbase, 55 gr de Ácido Bórico e 7.44 gr de EDTA (40 ml, 0.5 M). Todos os produtos químicos foram colocados num frasco com tampa e adicionou-se água destilada até completar o volume de 1000 ml. Usando o Phmetro ajustou-se o PH para 8 e colocou-se na autoclave por cerca de 3 horas.

### **3.3.3. Determinação do raio de abate das plantas infectadas, a partir da planta com sintomas evidentes de ALC**

Para a determinação do raio de abate, foram inspecionados os coqueiros seleccionados no procedimento descrito em 3.3.2 e foi medida a distância a partir de um coqueiro infectado com ALC, até ao coqueiro seguinte infectado ou não da mesma linha (Figura 3.2). De referir que a distância entre os coqueiros da mesma linha era de 10 metros. No período de nove meses, fez-se a monitoria dos coqueiros assintomáticos para controlar o aparecimento dos sintomas. Com base nos testes de PCR efectuados em 3.3.2.2 foi possível saber se as amostras colhidas do coqueiro sem sintomas e próxima do coqueiro sintomático estavam ou não infectadas pelo fitoplasma, embora assintomáticos, e se a distância entre os coqueiros infectados deveria ser alargada, ao novo coqueiro portador do fitoplasma.

## **3.4. Parâmetros Avaliados**

Em cada campo foi analisada a incidência e a severidade da doença, com base nos sintomas visuais observados.

### **3.4.1. Incidência da doença**

A incidência da doença foi determinada com base na presença e/ou ausência de sintomas do ALC nas plantas. Foi usada a escala de 1-2, onde 1 significa presença do ALC e 2 significa ausência do ALC (Ficha 1).

### **3.4.2. Severidade**

A severidade foi calculada com base nos sintomas observados em cada planta. Normalmente, ela é expressa através de uma escala que indica o desenvolvimento da doença através dos sintomas. A escala usada foi de 1 a 5, onde 1 indica a ausência de sintomas e 5 indica sintomas severos e morte da planta (Anexo 6).

### **3.4.3. Determinação do raio de abate**

O raio de abate foi determinado com base nos resultados do PCR e projectados para o pacote ArcGIS 9.3.

### 3.5. Resultados e Discussão

#### 3.5.1. Avaliação do estado de saúde dos coqueiros ao redor do coqueiro com sintomas do ALC

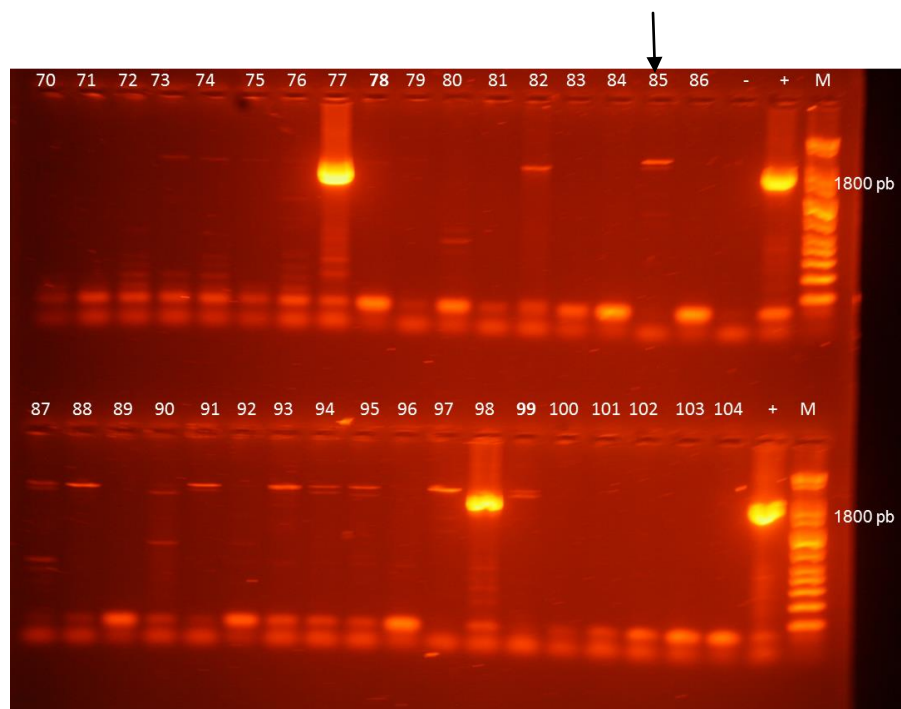
No decurso da primeira amostragem nos Distritos de Maganja da Costa e Nicoadala, foram colhidas e submetidas ao teste de PCR um total 118 amostras de material de tronco de coqueiros sintomáticos e assintomáticos, tendo-se constatado que de um total de seis coqueiros centrais, cinco foram positivos para o ALC, nomeadamente os coqueiros #1, #39, #56, #77, e #98 e um coqueiro apenas foi negativo, o coqueiro #22 (Tabela 3). O PCR foi também positivo para o coqueiro #85, distanciado a 30 metros do coqueiro central #77 (Figura 3.4).

**Tabela 3:** Sintomatologia e Resultado de PCR das amostras centrais

Local de amostragem		Coqueiro central *	Sintomas	Resultado do PCR (P1/P7)	Resultado do PCR (813f/Awka SR)
Maganja da Costa	Cabuire	Coqueiro #1	Amarelecimento de todas as folhas	Positivo	Positivo
		Coqueiro #22	Queda de frutos	Negativo	- **
	Caroga	Coqueiro #39	Amarelecimento de todas as folhas	Positivo	Positivo
Nicoadala	Maquival/Nanguela	Coqueiro #56	Amarelecimento de todas as folhas	Positivo	Positivo
	Maquival/ Madal	Coqueiro #77	Amarelecimento de todas as folhas	Positivo	Positivo
	Maquival/ Temane	Coqueiro #98	Amarelecimento das folhas basais	Positivo	Positivo

(\*) Os números representam os coqueiros centrais sintomaticos e foram atribuídos aleatoriamente

(\*\*) Nao foi realizado o teste PCR, pelo facto do primeiro teste com o primer P1/P7 ter sido negativo.



**Figura 3.4:** Resultado do PCR usando o primer universal P1/P7, demonstrando a banda positiva para a amostra 86 duma planta sintomática não central.

A quando da primeira amostragem, no Distrito da Maganja da Costa, nenhum outro coqueiro adjacente ao coqueiro central #1, manifestava sintomas do ALC (Tabela 4).

Passados nove meses depois da primeira amostragem, apenas os coqueiros distanciados 30 e 40 metros do coqueiro central #1, apresentaram sintomas da doença no estágio de necrose das inflorescências e o teste de PCR foi positivo. Mas os restantes coqueiros adjacentes ao coqueiro central abatido, não apresentaram sintomas da doença (Tabela 5). Este caso pode ser explicado em como a doença já estivesse presente nestes dois coqueiros, na altura da primeira amostragem embora assintomática, pois dados indicam que o período de latência da doença é de aproximadamente nove meses (262 dias) (Marinho *et al*, 2002), fim dos quais a doença começa a manifestar-se através dos sintomas.

**Tabela 4:** Sintomas e resultado do PCR na primeira amostragem

Local	Coq. Central	PCR P1/P7	Distância dos coqueiros adjacentes em relação ao coqueiro central																			
			10 metros				20 metros				30 metros				40 metros				50 metros			
			Sint	PCR P1/P7	PCR Gana	Total obsv.	Sint	PCR P1/P7	PCR Gana	Total obsv.	Sint	PCR P1/P7	PCR Gana	Total obsv.	Sint	PCR P1/P7	PCR Gana	Total obsv.	Sint	PCR P1/P7	PCR Gana	Total obsv.
Mag. Da Costa	#1	+	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4
	#22	-	0	Neg.	-	3	0	Neg.	-	2	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	3
	#39	+	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	3	0	Neg.	-	2	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	3
Nicoadala	#56	+	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4
	#77	+	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	2B	+	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4
	#98	+	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4	0	Neg.	-	4

**Legenda:** Coq. = coqueiro; Sint. = sintomas; Total obsv. = total de coqueiros observados; 2 B = necrose das inflorescências (anexo 6); Neg. = negativo

**Tabela 5:** Sintomas e resultado do PCR, nove meses depois da primeira amostragem

Local	Coq. Cen tral	PCR P1/P7	Distância dos coqueiros adjacentes em relação ao coqueiro central																			
			10 metros				20 metros				30 metros				40 metros				50 metros			
			Sint	PCR P1/P7	PCR Gana	Total obsv.	Sint	PCR P1/P7	PCR Gana	Total obsv.	Sint	PCR P1/P7	PCR Gana	Total obsv.	Sint	PCR P1/P7	PCR Gana	Total obsv.	Sint	PCR P1/P7	PCR Gana	Total obsv.
Mag. Da Costa	#1	+	0	-	-	4	0	-	-	4	2B	+	-	4	2B	+	-	4	0	-	-	4
	#22	-	0	-	-	3	0	-	-	2	0	-	-	4	0	-	-	4	0	-	-	3
	#39	+	Queda frutos	-	-	4	0	-	-	3	0	-	-	2	0	-	-	4	0	-	-	3
Nicoal dala	#56	+	0	-	-	4	0	-	-	4	0	-	-	4	0	-	-	4	0	-	-	4
	#77	+	0	-	-	4	0	-	-	4	AtF E4	+	-	4	Queda frutos	-	-	4	0	-	-	4
	#98	+	0	-	-	4	0	-	-	4	0	-	-	4	0	-	-	4	0	-	-	4

**Legenda:** Coq. = coqueiro; Sint = sintomas; Total obsv. = total de coqueiros observados; 2B = necrose das inflorescências (anexo 5), AtF. E4 = Amarelecimento de todas as folhas, estágio 4 (anexo 6)

Segundo Maust *et al* (2003) as alterações fisiológicas nas folhas e raízes, iniciam muito antes do aparecimento dos sintomas visuais, causando uma diminuição da fotossíntese e respiração das raízes. As concentrações de açúcar e amido nas folhas intermediárias (folha 14) e superiores (folha 4) aumentam, enquanto que as concentrações de carboidratos nas raízes reduz rapidamente durante o período de incubação do fitoplasma. Nesta fase, é interrompido o transporte de açúcar no floema causando stresse dos tecidos e consequentemente o desenvolvimento dos sintomas visuais.

Contudo, segundo Bonnot *et al* (2009) o período de incubação pode levar ainda mais tempo, sobretudo quando a infecção ocorre antes de serem removidas as plantas vizinhas infectadas, mencionando 3 à 9 meses para plantas com 2 a 3 anos de idade e 7 à 15 meses ou 6 à 24 meses em plantas adultas. No caso concreto, tratando-se de plantas adultas o período de incubação poderá ter ocorrido no intervalo de 7 e 15 meses já que a colecta de amostras decorreu no nono mês depois da primeira amostragem.



O mesmo estudo realizado por Bonnot *et al* (2009), mostrou que existe uma tendência de se contaminar plantas vizinhas embora essa contaminação aconteça de forma lenta ao longo do tempo. Esta lentidão na dispersão da doença tende a crescer com o aumento da distância entre plantas.

Os resultados do PCR para os *primers* universais P1/P7, indicam que as amostras colhidas a 30 e 40 metros foram positivas apenas na segunda amostragem (Figura 3.5) e embora tenha sido o único caso de contaminação de coqueiros vizinhos nos seis campos estudados, confirma a afirmação de Bonnot *et al* (2009), mencionada no parágrafo acima. Mais uma vez repisa-se o facto de se tratar de uma zona epidémica com níveis de infecção muito baixos e onde medidas de controlo da doença vêm sendo implementadas. Segundo Lee *et al* (2000) um dos métodos de redução da propagação da doença é precisamente o abate e queima de coqueiros contaminados que constituem fonte para dispersão do fitoplasma, ou seja, abatido o coqueiro central, o vector não terá mais fonte de inóculo para continuar a disseminar o fitoplasma (Figura 3.6).



**Figura 3.5:** Produto do teste de PCR usando o primer universal P1/P7, dos coqueiros adjacentes ao coqueiro central # 1. 2ª amostragem na Maganja da Costa



**Figura 3.6:** Abate do coqueiro sintomático central # 1, na Maganja da Costa

Pode-se constatar neste caso, que a dispersão da doença foi lenta, pese embora o facto de não se conhecer o período em que o coqueiro central (inóculo) foi infectado. Segundo um estudo realizado por Bonnot *et al* (2009), para avaliar a dispersão da doença ao longo do tempo, foi possível constatar também que em novos casos de plantas contaminadas pelo ALC, os valores médios de incidência da doença por mês, foram muito baixos, variando de 0.009 a 0.018 durante um período de 34 meses, ou seja, praticamente não houve infecção.

Análise do PCR P1/P7 do coqueiro central #22 abatido (Tabela 4), foi negativo, bem como os resultados de todos os coqueiros adjacentes. O coqueiro central #22, apresentava queda prematura dos frutos na primeira amostragem. Segundo Broschat e Elliott (2005), existem outros factores que podem contribuir para a queda prematura dos frutos, como por exemplo, a deficiência de Boro e os danos causados por relâmpagos. Muitas vezes estes dois factores são confundidos com os sintomas característicos da ALC. Mas se ao fim de nove meses os coqueiros adjacentes ao coqueiro central abatido, também não manifestarem sintomas da doença, pode-se afirmar que provavelmente o coqueiro central #22 também não estivesse infectado, atribuindo-se a queda dos frutos a outras causas. Assim, pode-se afirmar que não houve foco para garantir a transmissão para os coqueiros adjacentes.

Os resultados de PCR P1/P7 para os coqueiros adjacentes ao coqueiro central #39, foram negativos (Tabela 5), contudo, dois coqueiros distanciados 10 metros do coqueiro central #39, mostravam sintomas iniciais do ALC ao fim de nove meses. Segundo Tymon *et al* (1998), um

coqueiro infectado por ALC morre ao fim de 3 a 8 meses depois do aparecimento dos primeiros sintomas. No caso vertente, pode-se concluir que o foco de infecção destes dois coqueiros pode ter sido o coqueiro central #39, embora os sintomas não se tenham manifestado imediatamente. Segundo Neroni (2004), os fitoplasmas apresentam períodos de dormência, dificultando a detecção precoce do fitoplasma. Isto acontece muitas vezes quando a concentração do patógeno no coqueiro é muito reduzida, consequentemente a distribuição não é uniforme. Por outro lado, em estágios iniciais da doença, as inflorescências seriam possivelmente a melhor parte do coqueiro para detecção do patógeno, pois segundo Maust *et al* (2003) a concentração de açúcar e amido é direccionada para a parte superior da planta, onde também existe maior concentração do fitoplasma.

Os coqueiros adjacentes ao coqueiro central #56, não exibiram sintomas de ALC depois de nove meses, no distrito de Nicoadala. Este resultado pode dever-se por um lado, ao facto de se ter eliminado o inóculo central, mas também poderá dever-se a ausência ou baixa densidade do vector transmissor da doença no local. Este facto acontece muitas vezes quando as condições para a reprodução do vector não são favoráveis, como por exemplo, factores climáticos, tratos culturais que são desfavoráveis ao crescimento e desenvolvimento das ninfas dos insectos, etc. Haward e Harrison (2007), afirmam que algumas ninfas de insectos vectores, que se alimentam de infestantes ao redor dos coqueiros, como por exemplo, as ninfas de *Myndus crudus*, não têm preferências por dicotiledóneas, acabando por morrer devido à escassez de alimento. Sendo assim, a população de insectos adultos reduz e consequentemente poderá desaparecer ao longo do tempo.

Contudo, no caso em que o vector esteja presente, mas em baixa densidade populacional, pode contribuir para uma dispersão lenta da doença, prolongando assim o tempo de infecção de novas plantas. Harrison e Elliott (2008) afirmam que existem diferenças na dispersão da doença, pois, dependendo da localização geográfica, chega a levar anos para que uma determinada zona fique infectada.

Os resultados do PCR P1/P7 dos coqueiros adjacentes ao coqueiro central #77, foram todos negativos com excepção da amostra do coqueiro distanciado a 30 metros (Tabela 5). Este

coqueiro não foi imediatamente abatido como se fazia com os coqueiros centrais, pelo facto de apresentar sintomas no estágio inicial da doença. Ao final de nove meses, voltou-se a colher amostra de todos os coqueiros adjacentes incluindo o coqueiro distanciado a 30 metros todas as amostras foram negativas com excepção novamente do coqueiro distanciado a 30 metros. Nesta fase, o coqueiro apresentava ainda algumas folhas, mas as maiores partes encontravam-se necróticas e descaídas. Esta sintomatologia coincide com as mencionadas por Tymon *et al* (1998) quando se referem que ao fim de 3 a 8 meses depois do aparecimento dos primeiros sintomas, a planta morre.

O coqueiro imediatamente a seguir, 40 metros, também apresentava sintomas da doença, depois de nove meses, nomeadamente a queda prematura dos frutos, mas o diagnóstico não foi positivo para o fitoplasma do ALC. Este resultado pode ser explicado pela infecção tardia da planta ou pela resistência do coqueiro à doença (variedade Gigante Verde de Moçambique - GVM). Embora estudos estejam ainda a decorrer para identificação de variedades resistentes em Moçambique, observações de campo, mostram que a variedade GVM mostra alguma resistência à doença. Segundo relatório do FISP (2013), devido à resistência observada nestas variedades, têm-se multiplicado plântulas para repovoamento do palmar, enquanto se aguardam os resultados conclusivos dos estudos.

Contudo, outro factor que contribuiu para uma baixa incidência do ALC foi o facto de se tratar de uma zona epidémica onde a percentagem de infecção situa-se abaixo de 10% de acordo com o levantamento efectuado pelo projecto FISP, que tem contribuído muito na mitigação da doença, abatendo coqueiros doentes uma vez identificados. O segundo factor pode ser a baixa abundância da população do vector (ainda não conhecido) que contribuiu para uma disseminação lenta do fitoplasma. Segundo um estudo realizado por Dery *et al* (1996), observou também que a população do possível insecto vector do ALC no Gana foi muito baixa neste período (Agosto) coincidindo com baixa infecção do ALC.

Em relação ao coqueiro #98, os resultados de PCR P1/P7 na primeira e segunda amostragem mostraram que não ocorreu nenhuma infecção do ALC aos coqueiros adjacentes ao coqueiro central #98 (Tabela 5). Os coqueiros adjacentes mantiveram-se livres do ALC, nove meses

depois de abatido o coqueiro central infectado. Provavelmente, a baixa concentração do patógeno no tecido vegetal colhido pode estar associada aos resultados negativos ou ainda a existência de substâncias inibidoras. Um estudo realizado por Nerone (2004) para identificação de fitoplasmas em videiras mostrou que a amplificação do fragmento alvo do fitoplasma nas reacções de PCR, pode ser impedida devido à elevada concentração de compostos inibidores produzidos pela planta. No caso específico do coqueiro, provavelmente estas substâncias inibidoras podem ter contribuído para que não ocorresse a amplificação do fragmento.

No caso concreto deste estudo, a ausência de novas infecções pode estar ligada aos métodos de controlo implementados no local, como por exemplo, o abate e queima das plantas sintomáticas e a existência da variedade nativa Gigante Verde de Moçambique, que se tem mostrado resistente ao ALC.

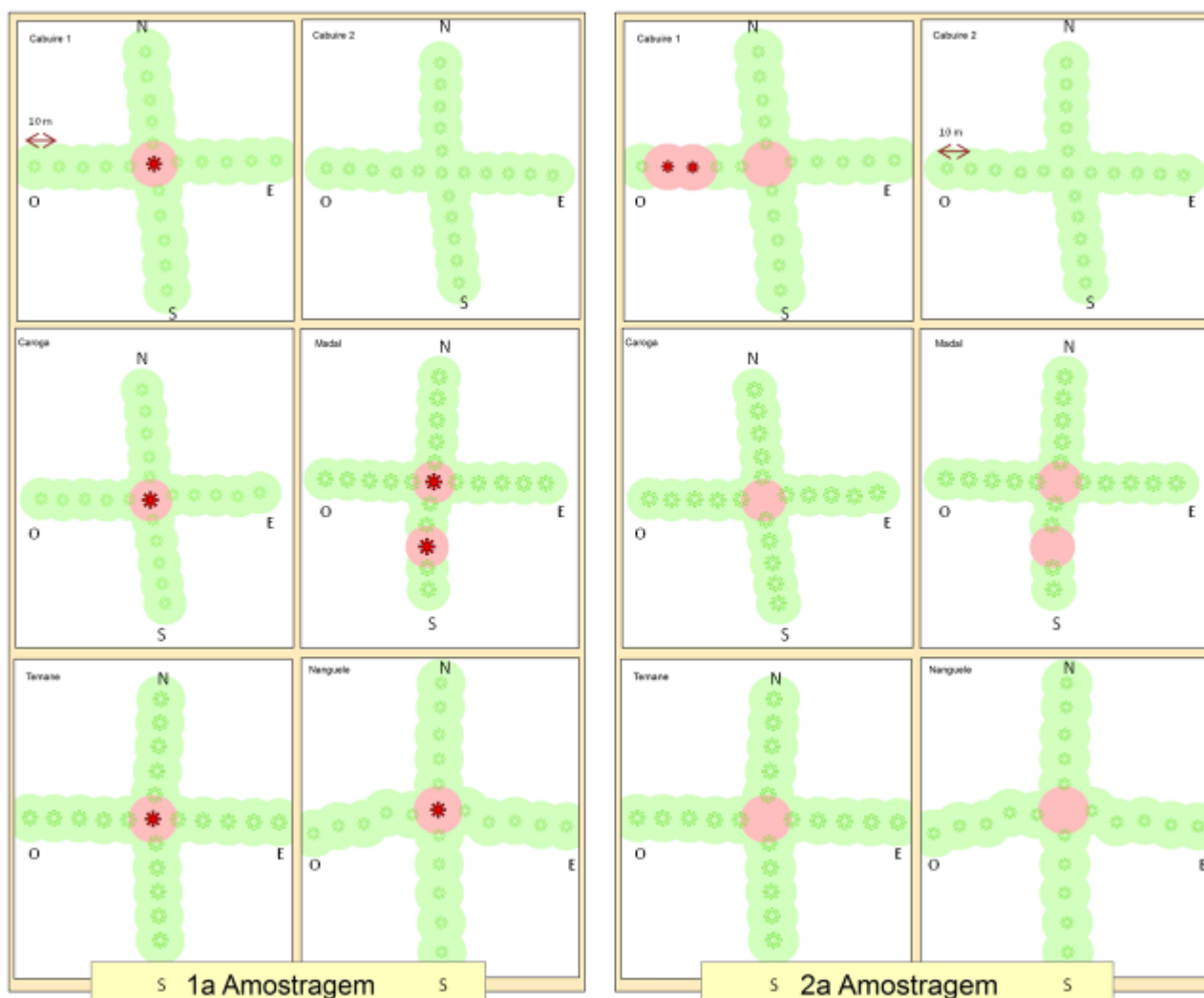
### **3.5.2. Determinação do raio de abate de coqueiros infectados à partir da planta doente devido ao ALC**

Ao longo de um período de 9 meses foram monitoradas 118 coqueiros na primeira amostragem e 113 coqueiros na segunda amostragem, nos 6 campos do sector privado, nomeadamente nos distritos da Maganja da Costa e Nicosadala, província da Zambézia (Tabela 6).




**Tabela 6:** Locais de amostragem

Província	Distrito	Localidade	Povoado	Proprietário	# de Campos	# coqueiros	
						1ª amostragem	2ª amostragem
Zambézia	Maganja da Costa	Cabuir	-	Madal	2	38	37
			-				
		Caroga	-	Boror	1	17	16
	Nicoadala	Maquival	Madal	Madal	2	21	20
			Temane			21	20
			Nanguele	Boror	1	21	20
						118	113

No decorrer da primeira amostragem, constatou-se que a incidência da doença nos dois Distritos foi mais expressiva nos coqueiros centrais, com excepção do coqueiro #22 central (Figura 3.7). No campo da Madal, foi também observado um coqueiro doente, aos 30 metros, ainda na primeira amostragem, mas em nenhum outro local observou-se este aspecto (Figura 3.7).



**Figura 3.7:** Disposição das plantas nos campos estudados na 1ª e 2ª amostragem

**Legenda:**  = Coqueiro central abatido;  = Coqueiro supostamente saudável;  
 = Zona tampão; 10m = Distância entre coqueiros em metros; N = Norte;  
 S = Sul; E = Este; O = Oeste

Numa situação como a que ilustra a figura 3.7, é difícil delimitar com precisão o raio de abate ideal para prevenir a dispersão da doença para plantas vizinhas. Segundo Bonnot *et al* (2009), a progressão da doença ao longo do tempo é irregular e o apogeu da incidência da doença não é igual nos diferentes locais de amostragem. McCoy (1976), cita que a dispersão do ALC ocorre dentro de uma área infectada, possivelmente até 100 metros de diâmetro à volta do foco activo

mas a doença nos coqueiros pode aparecer dispersa até um raio de mais de 100 km dos coqueiros previamente infectados e deste modo estabelecer-se-á um novo foco.

Isto mostra que a incidência da doença dentro de um mesmo campo e entre campos diversos não é homogénea e esta falta de homogeneidade pode dever-se a dois factores, segundo Bonnot *et al* (2009): o primeiro é que pelo facto da doença ser transmitida por um vector, facilita o surgimento de novos casos através de infecções simultâneas em coqueiros vizinhos a partir de um coqueiro já infectado.

Um exemplo de infecções simultâneas pode ser o que ilustra a figura 3.7 no campo Cabuire 1, em que a partir de uma planta infectada, foram também infectados mais dois coqueiros vizinhos. Embora estes coqueiros infectados não estejam imediatamente a seguir ao coqueiro central (foco), existe grande probabilidade de eles terem sido infectados a partir do coqueiro central, uma vez que a dispersão da doença não é homogénea e o vector sendo um insecto, pode voar para qualquer distância dentro da mesma área, causando o que se chama dispersão aos saltos, podendo atingir os 70 km ou mais, dificultando deste modo à determinação do raio preciso dos coqueiros doentes a serem eliminadas pelo processo de abate.

Segundo Bonnot *et al* (2009), é pouco provável que a heterogeneidade dentro do campo seja causada pela plantação de diferentes materiais genéticos ou que seja devido à idade, porque tratando-se de plantações comerciais, como é o caso das áreas em estudo, cada campo é plantado usando plântulas provenientes da mesma fonte, mesmo material genético e homogéneo, com tempo limitado para o plantio. Bonnot *et al* (2009) explica também que a heterogeneidade causada por operações culturais nunca foi citada, porque a inoculação mecânica ainda não é conhecida.

O segundo factor é a dispersão secundária da doença, a partir de plantas infectadas para plantas vizinhas, onde o tempo de aparição da doença e a distância entre as plantas reflectem-se meramente no progresso da doença no espaço e ao longo do tempo (Bonnot *et al*, 2009). Assim sendo, torna-se difícil limitar o raio de coqueiros infectados, pois pode-se correr o risco de incluir coqueiros sãos para o abate.



## Bibliografia

Ashburner, G.R., Córdova, I.I., Oropeza, C.M., Illingworth, R. And Harrison, N.A. (1996) First report of coconut lethal yellowing disease in Honduras. Plant Dis. V.80, p.960.

Bonnot, F., Franqueville H. e Lourenço, L. (2009). Spatial and spatiotemporal pattern analysis of cocconut lethal yellowing in Mozambique. Phytopathology 2010 April; 100 (4): 300-12. Doi: 10.1094/PHYTO-100-4-0300.

Bourdeix, R., Allou, K. and Konan Konan, J. L. (1999). Lethal yellowing diseases of the coconut palm: an overview. [http://www.plantapalm.com/vpe/pestsndiseases/vpe\\_ly\\_coconut.htm](http://www.plantapalm.com/vpe/pestsndiseases/vpe_ly_coconut.htm)

Broschat, T. K. and Elliott, M. L. (2005). Disorders and Diseases of Ornamental Palms. University of Florida, SP 360.

Dery S. K, Phillipe, R., Nkasah-Poku J. and Mariau D. (1997). Seasonal population variation in two suspected vectors of the Cape St. Paul wilt disease of coconut in Ghana in relation to disease incidence. Proceedings of the International Cashew and Coconut Conference, 1997, Dar-Es-Salaam, Tanzania.

FISP/ACDIVOCA, (2011). Quarterly Progress Report, quarter 6, year 2, 1 January-31 March 2011. Farmer Income Support Project, MCA-Moçambique.

FISP/ACDIVOCA, (2011a). Quarterly progress report, quarter 8, year 2, 1 July-30 September 2011. Farmer Income Support Project, MCA-Moçambique.

Harrison, N. A. and Elliott, M. L. (2008). Lethal yellowing (LY) of palm. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0714-01

Howard, F.W. & Harrison, N.A. (2007). Palm diseases caused by Phytoplasmas: Lethal yellowing and Texas Phoenix palm decline. University of Florida, IFAS. [http://sarasota.ifas.ufl.edu/Hort/Pubs/Palm Diseases Caused by Phytoplasmas.pdf](http://sarasota.ifas.ufl.edu/Hort/Pubs/Palm%20Diseases%20Caused%20by%20Phytoplasmas.pdf) [Adobe PDF Document 33.42 KB]

Lee I. M., Davis, R. E., Gundersen-Rindal D. E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic *Mollicutes*.- *Annual Review of Microbiology*, 54: 221-255.

Marinho, V.L de A; Batista, M. F. E e Miller, R. (2002). Praga quarentenária A1 Amarelecimento Letal do Coqueiro “Coconut Lethal Yellowing. Brasília DF, ISSN 0102-0099.

McCoy, R, (1976). Comparative epidemiology of the lethal yellowing, kaincopé and cadang-cadang disease of coconut palm. Plant Dis. Rep. 60, p.498-502.

Mondjana, A.M.; Santos, L., Vaz, A., Caniço, A., Mangana, S., Nuaila, V., Massingue, F. e Massinga, J. (2010). Manual Prático para Identificação e Maneio do Amarelecimento Letal do Coqueiro. Arranjo gráfico e impressão: LEIMA IMPRESSÕES ORIGINAIS, LDA.

Nerone, R.C. (2004). Detecção e identificação molecular de fitoplasmas associados ao amarelo da videira. Dissertação de Mestrado em Fitopatologia. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Pudivriti, J. (2010). Informação verbal sobre variedades cultivadas na Zambézia. Coordenador do Projecto FISP/MCA.

Tymon AM, Jones P & Harrison N.A. (1998). Phylogenetic relationships of coconut phytoplasmas and the development of specific oligonucleotide PCR primers. *Annals of Applied Biology* v.132, p. 437–452.

TTI, 2008. Baseline survey of the distribution and incidence of coconut lethal yellowing disease in Mozambique: “Results of CLYD survey and recommendations of options to follow the distribution of CLYD in the future”. MCA-Moçambique, MPD, Moçambique.

## **CAPÍTULO IV - AVALIAÇÃO DA TRANSMISSIBILIDADE DO AGENTE CAUSAL DO ALC PELOS FRUTOS DO COQUEIRO**

### **4.1. Resumo**

A doença do Amarelecimento Letal do Coqueiro (ALC) está associada a fitoplasmas, procariotas, pertencentes à classe Mollicutes, que sobrevivem somente dentro do floema. Os sintomas da doença caracterizam-se pela necrose das inflorescências, queda prematura dos frutos, amarelecimento das folhas da base para o topo e finalmente a morte do coqueiro. Pelo facto dos frutos caírem prematuramente, pressupõe-se que estes estejam infectados pela doença, sendo estes frutos considerados não viáveis como semente. O presente estudo foi realizado nos Distritos da Maganja da Costa e Nicosadala, na Província da Zambézia e tinha por objectivo avaliar a transmissão do fitoplasma do ALC através dos frutos de plantas infectadas. Para o estudo, foram seleccionados 12 coqueiros “mãe” com sintomas de ALC e destes foram colhidas um total de 54 frutos que se encontravam ainda no coqueiro, com excepção dos frutos caídos. Dos 54 frutos, foram seleccionados 31 frutos para serem semeados no germinador para produção de plântulas e os restantes 23 foram colhidas amostras do cairo e embrião. Todas as amostras dos coqueiros “mãe”, plântulas, cairo e embrião foram submetidas ao teste de PCR. Apenas 9 dos 12 coqueiros “mãe” foram positivos para o fitoplasma do ALC. Dos 31 frutos no germinador, apenas 16 é que germinaram e os resultados de PCR foram todos negativos para o ALC, bem como dos embriões e cairos.

## 4.2. Introdução

A utilização de semente/plântula ou outro material de propagação vegetativa certificada, constitui uma condição *sine qua non* para garantir uma boa produção, uma vez que todos os demais insumos serão somente condicionantes para proteger este potencial e aumentar o seu desempenho. Por outro lado, a semente/plântula é o meio mais eficiente para dispersão de doenças, independentemente de barreiras geográficas, albergando muitas vezes patógenos por longos períodos sem exhibir sinais (Neergard, 1979). Assim, estudos sobre epidemiologia das doenças são importantes para entender como a doença se manifesta e como controlá-la de forma eficaz, sobretudo no caso de doenças transmitidas por vectores, em que existe a necessidade de se entender também o comportamento do vector numa determinada cultura.

A doença do amarelecimento letal do coqueiro tem afectado muitas partes do mundo, nomeadamente países da América do Norte, Central e América do Sul e África, incluindo Moçambique. Nos vários países afectados pela doença, ela tem causado quedas de produção muito elevadas e com efeitos negativos na vida de muitas famílias, chegando as perdas a atingir os 100% (Nipah *et al*, 2007). A doença caracteriza-se pela queda prematura dos frutos ainda verdes, necrose das inflorescências, amarelecimento das folhas e morte da planta. Os frutos caídos prematuramente não são indicação de que estejam contaminados pelo fitoplasma do ALC, mas é indicação de que a planta mãe encontra-se infectada pela doença.

A **Tabela 7** ilustra a produção de coco nas províncias de Inhambane e Zambézia, maiores produtores desta cultura em Moçambique. Analisando a tabela, pode-se observar que um coqueiro produzia anualmente cerca de 60 cocos. Mas com a recente problemática do ALC, esta produção reduziu para menos de 50 cocos por ano.

**Tabela 7:** Produção do coco em Inhambane e Zambézia

Item	Inhambane	Zambézia
Coqueiros (milhões)	2.8	9.3
Área (1000 ha)	30	110
Coqueiros por ha.	93	84
% cultivada por pequenos agricultores	98	57
Cocos/ano (milhões)	140	550

Fonte: SODETEG, CIRAD e MADER 2000 .

A semente é o material de reprodução vegetal de qualquer espécie ou cultivar, proveniente de reprodução sexuada ou assexuada, que tem como finalidade específica a sementeira (Banze, 2000). Assim, o uso de semente livre de patógenos permite obter uma boa produção, contribuindo também para a multiplicação deste material vegetal para usos futuros.

A semente do coqueiro, o coco, é um fruto seco simples classificado como drupa, que possui uma casca fibrosa e uma espécie de "caroço" interno, o endocarpo. O endocarpo apresenta três "olhos" de germinação, facilmente visíveis quando extraída a casca, e é por onde emerge a raiz, uma vez o embrião germinado.

Nalgumas culturas é possível que a infecção por patógenos ocorra dentro da semente, as doenças comumente designadas por *seedborn* (transmissíveis por semente), mas na cultura do coqueiro, nunca foi reportada a transmissão por semente. Segundo Cordova *et al* (2003), a transmissão por semente no coqueiro é dificultada pelo facto do fitoplasma residir dentro do líquido floemático, o qual não tem nenhuma conexão com a semente, embora um dos sintomas, inclui a queda prematura dos frutos. Na verdade os frutos acabam por cair provavelmente porque o fitoplasma bloqueia a circulação de carboidratos, que são essenciais para o desenvolvimento dos frutos e para a floração.

Segundo Dollet (2002), das mais de 600 doenças causadas por fitoplasmas, até ao momento conhecidas, nunca foi reportada a transmissão por semente, pese embora alguns autores confirmem a presença do fitoplasma nos frutos de coqueiros. Um estudo realizado por Harrison & Oropeza (1997), para a identificação de fitoplasma em frutos produzidos por um coqueiro infectado, mostrou que pelo menos um (1) fruto por coqueiro é portador do fitoplasma, ainda que o coqueiro apresente os primeiros sintomas da doença. Embora tenha sido detectado o fitoplasma no fruto, não implica necessariamente que o fruto contaminado seja transmissor da doença, contudo, estes frutos não são viáveis como material de propagação ((Nipah *et al*, 2007), uma vez que o fitoplasma limita o desenvolvimento dos frutos.

A transmissão da doença ocorre de uma planta para outra durante a alimentação do insecto vector, durante os tratos culturais em que são usados os mesmos instrumentos cortantes nas

diferentes plantas (transmissão mecânica) (Lee *et al*, 2000). Segundo McCoy *et al* (1976), a transmissão da doença a longas distâncias pode atingir um raio de até 100 km.

A selecção de material para plantação deve ser criteriosamente feita tendo em conta entre outros factores, à resistência ao ALC. Na Jamaica, a variedade Malayan Dwarf, uma variedade local, mostrou resistência à doença (Whitehead, 1968) e tem sido usada como material de propagação. Um estudo realizado no Gana, para apuramento de variedades resistentes ao ALC mostrou que algumas variedades são menos susceptíveis a doença, nomeadamente: Sri Lanka Green Dwarf e Vanuatu Tall. Em Moçambique, a variedade Gigante Verde de Moçambique tem mostrado resistência ao ALC, mas estudos visando a confirmação da resistência estão ainda em curso. Em paralelo, foram importadas 21 variedades da Costa do Marfim para estudo da resistência ao ALC, tendo sido plantadas no distrito de Nicosadala na província da Zambézia.

A identificação de variedades resistentes às doenças em Moçambique, especialmente a doença do ALC, é importante para que sirvam de material para multiplicação e replantação do palmar, com a finalidade de contrariar a actual situação. Estas variedades deverão também ser detentoras de outras características como é o caso de tolerância à seca e com alto potencial de produção. Uma vez identificadas variedades resistentes ao ALC, estas serviriam de material de propagação, uma vez que os seus frutos também estariam livres do fitoplasma.

Com o presente estudo, pretende-se avaliar a transmissão do fitoplasma do ALC presente em frutos de plantas infectadas para um novo coqueiro.

#### **4.3. Metodologia de Trabalho**

As amostras para o presente estudo foram colhidas no Distrito de Nicosadala, campo da MADAL. A amostragem foi aleatória tendo sido seleccionados os coqueiros que se encontravam no estágio 3 de infeção (amarelecimento das folhas basais).

#### 4.3.1. Avaliação da transmissão do Amarelecimento Letal do Coqueiro (ALC) pelos frutos de coqueiros

Para avaliar a transmissão do ALC através dos frutos, foram seleccionados doze coqueiros das variedades Gigante Verde de Moçambique (MZT) e Híbrido de Moçambique (não especificado) com sintomas bem visíveis da doença (fase 3). Pelo facto de ser difícil encontrar coqueiros doentes com frutos, não foi especificado o número exacto de frutos a colher em cada coqueiro, optando-se por colher todos os frutos maduros (McCoy *et al*, 1983) encontrados na árvore (excepto os caídos, por ser difícil identificar a origem). Os frutos de cada coqueiro, foram separados pela metade para a avaliação da doença no cairo, embrião e plântulas (Tabela 8).

**Tabela 8:** Número de cocos colhidos por coqueiro

Código do coqueiro <sup>1</sup>	# de frutos colhidos	# de frutos para produção de plântulas	# de frutos para o teste do cairo e embrião
Av1	3	2	1
Av2	2	1	1
Av3	8	4	4
Av4	2	1	1
Av5	4	3	1
Av6	8	4	4
Av7	4	3	1
Av8	4	2	2
Av9	3	2	1
Av10	7	4	3
Av11	7	4	3
Av12	2	1	1
<b>Total</b>	<b>54</b>	<b>31</b>	<b>23</b>

(<sup>1</sup>) – Av = designação atribuída aos coqueiros “mãe”

#### 4.3.2. Testagem da Planta-mãe

As plantas-mãe, de onde foram colhidos os cocos para o teste de transmissão pela semente, também foram analisadas e testadas para confirmação da presença ou ausência do fitoplasma.



### 4.3.3 Avaliação do Cairo e Embrião

De cada metade dos frutos colhidos em cada coqueiro, foi feita a colecta do cairo e do embrião para confirmar a presença ou ausência do ALC nos frutos e a possibilidade da sua transmissão as novas plantas.

A amostragem foi realizada segundo os procedimentos que asseguir se descrevem.

**Amostragem do Cairo** - Foram feitos quatro furos no cairo de cada fruto, com ajuda de uma broca e o material de cada furo foi misturado como amostra única e colocado num tubo “Falcon” (Figura 4.1) contendo sílica. De igual modo, repetiu-se o processo para todos os outros frutos da mesma planta.

**Amostragem do Embrião** – a colheita de amostras do embrião foi efectuada nos frutos acima referidos. Uma vez retirada a amostra do cairo, foi removido todo o cairo. Com auxílio de uma faca esterilizada, retirou-se o embrião e colocou-se num tubo “Falcon” contendo sílica. Ambas amostras (cairo e embrião) foram posteriormente enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular do IIAM no Distrito de Nicoadala, Província da Zambézia, para testagem.



**Figura 4.1:** colecta de amostras do cairo

### 4.3.4. Testagem das plântulas provenientes da germinação de frutos infectados

Para confirmar se a doença é ou não transmissível para a nova planta através do fruto proveniente de plantas doentes, foi instalado um germinador coberto por uma rede entomologica (Figura 4.2). O germinador foi instalado em Nicoadala, nos campos da empresa MADAL, em área de topografia plana, próximo de fonte de água, longe de coqueirais velhos e doentes. As

sementes foram distribuídas no germinador distanciadas 10 centímetros umas das outras perfazendo uma área de 2 metros x 0.70 metros (Figura 4.2), cobrindo 2/3 de sua altura com material de cobertura (solo).

As sementes iniciaram a germinação aos 115 dias após o plantio e a colecta das primeiras folhas foi efectuada 5 meses depois da germinação (Figura 4.3), obedecendo os procedimentos descritos por Jones (2005) e as amostras foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular do IIAM em Nicosadala, província da Zambézia.



**Figura 4.2.** Disposição dos frutos para germinação



Colocação da amostra num plástico ziploc

**Figura 4.3.** Colecta das folhas no germinador

#### 4.4. Análises Laboratoriais

As análises das amostras colhidas foram efectuadas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), localizado no Distrito de Nicosadala,

na Província da Zambézia. Foram colhidas um total de oitenta e nove (89) amostras, das quais 12 amostras dos coqueiros “mãe”, 23 correspondentes às amostras de cairo, 23 correspondente a embrião e 31 correspondentes as amostras de plântulas. Destas, foram analisadas um total de sessenta e nove (69) amostras e descartadas 20 amostras.

Durante o período de desenvolvimento dos frutos no germinador, quinze (15) frutos não tiveram germinação. E do total de amostras de embriões colhidos, cinco (5) encontravam-se infectados por fungos.

#### **4.4.1. Extracção do ADN**

A extracção do ADN seguiu o procedimento descrito no ponto 3.3.2.1.

#### **4.4.2. Polimerase Chain Reaction (PCR)**

As amostras foram submetidas ao teste de PCR para identificação da presença do fitoplasma usando *primers* universais P1/P7 e no caso de resultados positivos para P1/P7, as mesmas amostras foram submetidas ao *primer* específico do Gana 813f/Awka SR. Nesta reacção foram incluídas amostras para o controlo negativo (coqueiro são), controlo positivo correspondente ao ADN de uma amostra de coqueiro com fitoplasma do amarelecimento letal e o marcador para controle da reacção (protocolo, Anexo 3).

### **4.5. Análise de Dados**

#### **Percentagem de transmissão da doença através dos frutos**

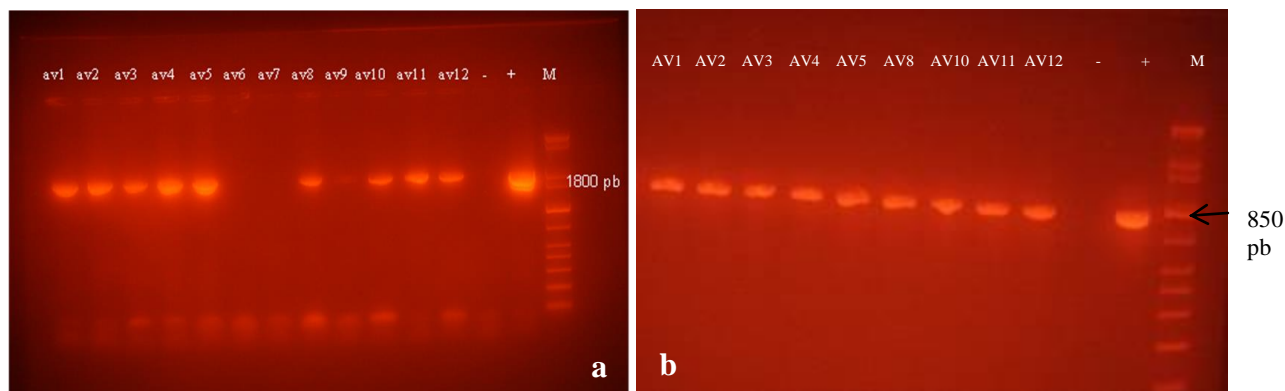
Os dados foram analisados com base nas percentagens de frutos, embriões, cairo e plântulas infectados ou não pelo Amarelecimento Letal do Coqueiro.

### **4.6. Resultados e Discussão**

#### ***4.6.1. Avaliação da possibilidade de transmissão do ALC através do fruto de coqueiros infectados.***

De um total de doze (12) amostras (av1 à av12) colhidas de coqueiros infectados com ALC para o estudo da transmissão pelo fruto, nove (9) amostras foram positivas para ALC com os *primers*

P1/P7 (Figura 4.4a). As 9 amostras positivas foram depois submetidas ao PCR usando *primer* do Gana 813f/ Awka SR, tendo sido todas positivas (Figura 4.4b).



**Figura 4.4:** Produto de PCR dos coqueiros “mãe”; (a) com *primer* universal P1/P7; (b) com *primer* do Gana 813/Awka SR; av1 à av12 - coqueiros “mãe” com sintomas de ALC

A tabela 9, ilustra as percentagens de amostras positivas e negativas no total das amostras colhidas. Pode-se observar que 75% do total de coqueiros “mãe” foram positivos para o fitoplasma do ALC.

**Tabela 9:** Percentagens de Coqueiros e frutos infectados pelo ALC

Itens	Quantidade de material	Perdas	Material Analisado	PCR (P1/P7)		PCR (Ghana)
				+	-	+
Coqueiros	12	0	12	9 (75%)	3 (25%)	9 (75%)
Embrião	23	5(*)	18	0 (0%)	18 (100%)	-
Cairo	23	0	23	0 (0%)	23 (100%)	-
Plântulas	31	15 (**)	16	0 (0%)	16 (100%)	-

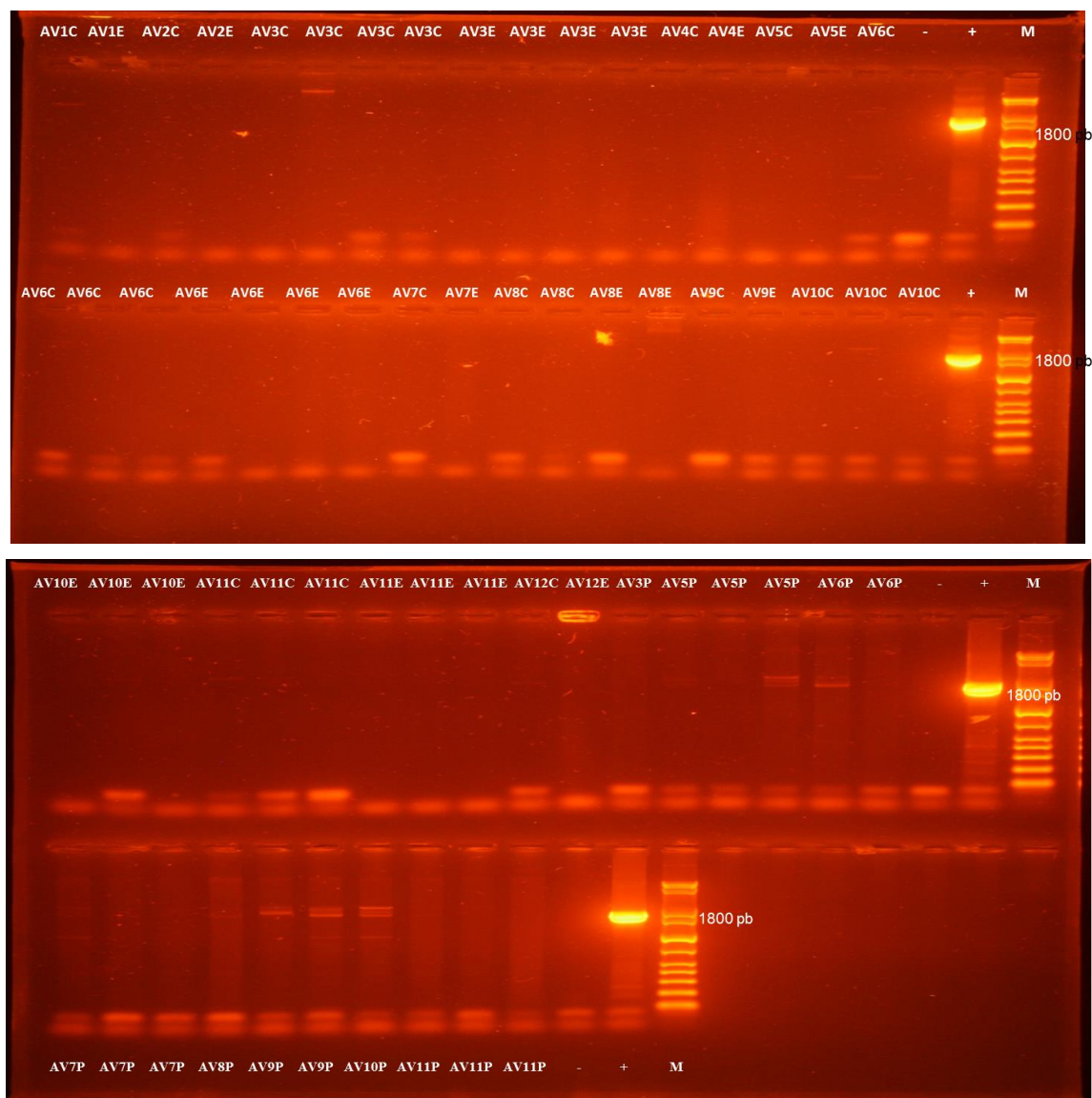
(\*) – infecção por fungos; (\*\*) - sem germinação

### Germinação da Semente/ Coco

A produção de plântulas não ocorreu em todos os frutos colhidos de coqueiros infectados, pois, dos 31 frutos semeados para produção de plântulas, apenas dezasseis (16) frutos é que germinaram (Tabela). Segundo Nipah *et al* (2007), embriões infectados com ALC são pouco

prováveis de germinar, embora outros factores possam também estar associados à não germinação. Este resultado vem suportar um estudo realizado pelo mesmo autor em que de um total de 12 frutos de coqueiros contaminados por ALC apenas germinaram 5 sementes de coqueiro, equivalente apenas a 41.7%.

O resultado do PCR com o primer universal P1/P7 de embriões, cairos e plântulas provenientes dos coqueiros infectados também foram negativos para o ALC (Figura 4.5).



**Figura 4.5:** Resultado de PCR usando os primers universais P1/P7 de embriões, cairos e plântulas.

**Legenda:** AV1 a AV12 – código dos coqueiros “mãe”; C – amostra de cairo;  
E – amostra de embrião; P – amostra de plântulas



Estes resultados coincidem com os resultados de PCR para P1/P7, de um estudo realizado por Nipah *et al* (2007), em que nenhuma banda foi visível para o ALC, nas 16 amostras de embriões de coqueiro infectados. O mesmo autor cita que o floema onde o fitoplasma reside não têm nenhuma conexão directa com os embriões, sendo por isso muito difícil a transmissão através dos frutos.

Segundo Dollet (2002), das mais de 600 doenças causadas por fitoplasmas, até ao momento conhecidas, nunca foi reportada a transmissão por semente. Contudo, Harrison e Oropeza (1997), reportaram que PCR específicos (seguindo-se 40 ciclos de PCR) revelaram a presença do fitoplasma do Amarelecimento Letal em pelo menos uma semente de coqueiros exibindo sintomas iniciais da doença, mas esta conclusão não resolve o controverso problema da transmissão por semente.

As análises de PCR realizadas por Marinho *et al* (2002), confirmaram a presença do fitoplasma do ALC no tecido embrionário de sementes provenientes de plantas infectadas, mas o estudo não conseguiu confirmar a transmissão do fitoplasma para a nova planta, o que leva a acreditar que dificilmente esta transmissão ocorre. Por outro lado, analisando o percurso feito pelos elementos da seiva do floema da planta onde o fitoplasma reside, conclui-se que este, não tem conexão directa com o embrião.

O facto das análises de PCR das plântulas provenientes de frutos de coqueiros infectados não exibirem bandas positivas, mesmo tendo germinado, estas plântulas não são viáveis para o plantio. Existe a probabilidade de uma percentagem do fitoplasma infectar os frutos, embora a doença não se manifeste nas plântulas provenientes desses frutos. Segundo Harrison & Oropeza (1997), a formação dos frutos é feita mediante a divisão de células das inflorescências em células especializadas do fruto. Assim sendo, os frutos provenientes de plantas infectadas pelo ALC serão sempre considerados “defeituosos”, pela afinidade com a planta mãe.

Para o caso do presente estudo, pode-se afirmar que apesar das plântulas terem sobrevivido depois da germinação só leva a conclusão de que o ALC não é transmissível por semente caso

contrário, ele teria um período lactente de infecção muitíssimo longo, acima do período já citado por vários autores que varia de 3 a 24 meses.



## Bibliografia

Banze, P. (2010). Apontamentos de tecnologia de sementes. Curso de mestrado em Desenvolvimento Agrário, Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal, UEM.

Cordova, I.; Jones, P.; Harrison, N. A. and Oropeza, C. (2003). In situ PCR detection of phytoplasma DNA in embryos from coconut palms with lethal yellowing disease. *Molecular Plant Pathology* (2003) 4( 2 ), p. 99–108

Dollet M. (2002). CIRAD concepts: toward a global research programme on integrated control of lethal yellowing-like phytoplasma diseases of the coconut palm. In: *Proceedings of the Expert Consultation on Sustainable Coconut Production through Control of Lethal Yellowing Disease, Kingston, Jamaica, 2002*. CFC Technical Paper No 18.

Harrison & Oropeza (1997). Recent studies on detection of lethal yellowing disease phytoplasmas in the Americas. In: *Proceedings of an International Workshop on Lethal Yellowing-Like Disease of Coconut, Elmina, Ghana, 1995*. Chatham, UK: Natural Resources Institute, p. 221-34.

Jones, P. (2005). Coconut lethal yellowing disease: development of new diagnostic tools and laboratory support to promote their application. Annex. DFID Crop Protection Program, Final Technical Report, Project R8309. Rothamsted Research, Herts, UK.

Lee, I. M., Davis, R. E., Gundersen-Rindal, D. E. (2000). Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*. v.54, p. 221-255.

Marinho, V.L de A; Batista, M. F. E e Miller, R. (2002). Praga quarentenária A1 Amarelecimento Letal do Coqueiro “Coconut Lethal Yellowing. Brasília DF, ISSN 0102-0099.

McCoy, R.E., Howard, F.W., Tsai, J.H., Donselman, H.M., Thomas, D.L., Basham, H.G., Atilano, R.A., Eskafi, F.M., Britt. L. and Collins, M.E. (1983). Lethal Yellowing of Palms. University of Florida Agricultural Experiment Station Bulletin no. 834. Gainesville, Florida.

McCoy, R. E.; Carroll, V.J.; Poucher, C. P.; Gwin, G. H (1976). Field control of coconut lethal yellowing with oxytetracycline hydrochloride. *Phytopathology*, St. Paul, MN, v. 66, n. 9, p. 1148-1150.

Neergaard, P. (1979). Seed pathology. Volume I.

Nipah, J.O.; Jones, P. e Dickinson, M.J. (2007). Detection of lethal yellowing phytoplasma in embryos from coconut palms infected with Cape St Paul wilt disease in Ghana.

## CAPÍTULO V - CONCLUSÕES GERAIS E RECOMENDAÇÕES

### 5.1. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram responder algumas das questões inicialmente formuladas relativamente ao estado de saúde das plantas adjacentes a planta central infectada e abatida; sobre o raio de abate e sobre a transmissibilidade do ALC através dos frutos de coqueiros infectados. A hipóteses sobre infecção de plantas adjacentes a planta central foi comprovada no presente estudo. Em relação a hipótese 2, sobre transmissibilidade do ALC, justifica-se pelo facto de apesar dos testes de PCR terem sido negativos, não foram analisados todos os frutos, pois alguns já haviam caído e haviam sido recolhidos pelas comunidades.

Com o estudo concluiu-se que nos estágios iniciais da doença é difícil detectar o fitoplasma do ALC pelo facto da sua concentração ser muito baixa e a sua distribuição irregular no liquido floemático.

Nas zonas epidémicas, a infecção de novas plantas é muito lenta, sobretudo quando o foco central é eliminado, permitindo um desenvolvimento saudável das plantas vizinhas. Contudo, não se exclui a possibilidade das plantas vizinhas virem a ser contaminadas, uma vez presente o vector (ainda não conhecido em Moçambique).

O método de abate e queima de coqueiros infectados adoptado pelo programa de mitigação da doença na província da Zambézia é eficiente e eficaz.

Uma vigilância regular dos palmares permite a detecção dos primeiros sintomas ainda cedo, facilitando também a intervenção com medidas de controlo.

Nos Distritos de Maganja da Costa e Nicoadala na Província da Zambézia, predominam a estirpe do Gana, o que não signifique necessariamente que exista apenas uma estirpe. É possível que estirpes específicas de Moçambique estejam presentes, mas por não existir um *primer* apropriado para sua identificação, torna-se difícil a sua detecção.

Não foi possível determinar o raio de abate uma vez identificado o coqueiro central infectado pela doença, pelo facto da disseminação da doença ter ocorrido muito lentamente, pois, apenas dois coqueiros foram infectados no intervalo de nove meses, entre a primeira e segunda amostragem.

Uma vez identificada a planta central, deve-se eliminar apenas as plantas sintomáticas ao redor da planta doente, independentemente da posição (Norte, Sul, Este, Oeste) em relação à planta central, deixando as plantas aparentemente sãs ou assintomáticas, para não se correr o risco de eliminar coqueiros saudáveis. Caso haja outros coqueiros doentes distantes do foco, estes devem igualmente ser eliminados.

Em relação à transmissão por semente, conclui-se que apesar dos testes de PCR para o cairo e embrião terem sido negativos, estes frutos não são viáveis para o plantio, uma vez que os frutos caem prematuramente, significando que não atingem a maturação para servir de material de propagação. Estes frutos são considerados “defeituosos”.

As plântulas provenientes de frutos de coqueiros infectados não são portadoras do fitoplasma do ALC, mas uma vez provenientes de frutos (sementes) de coqueiros infectados, elas também não podem ser usadas como material de propagação.

Metade dos frutos provenientes de coqueiros infectados não germinou.

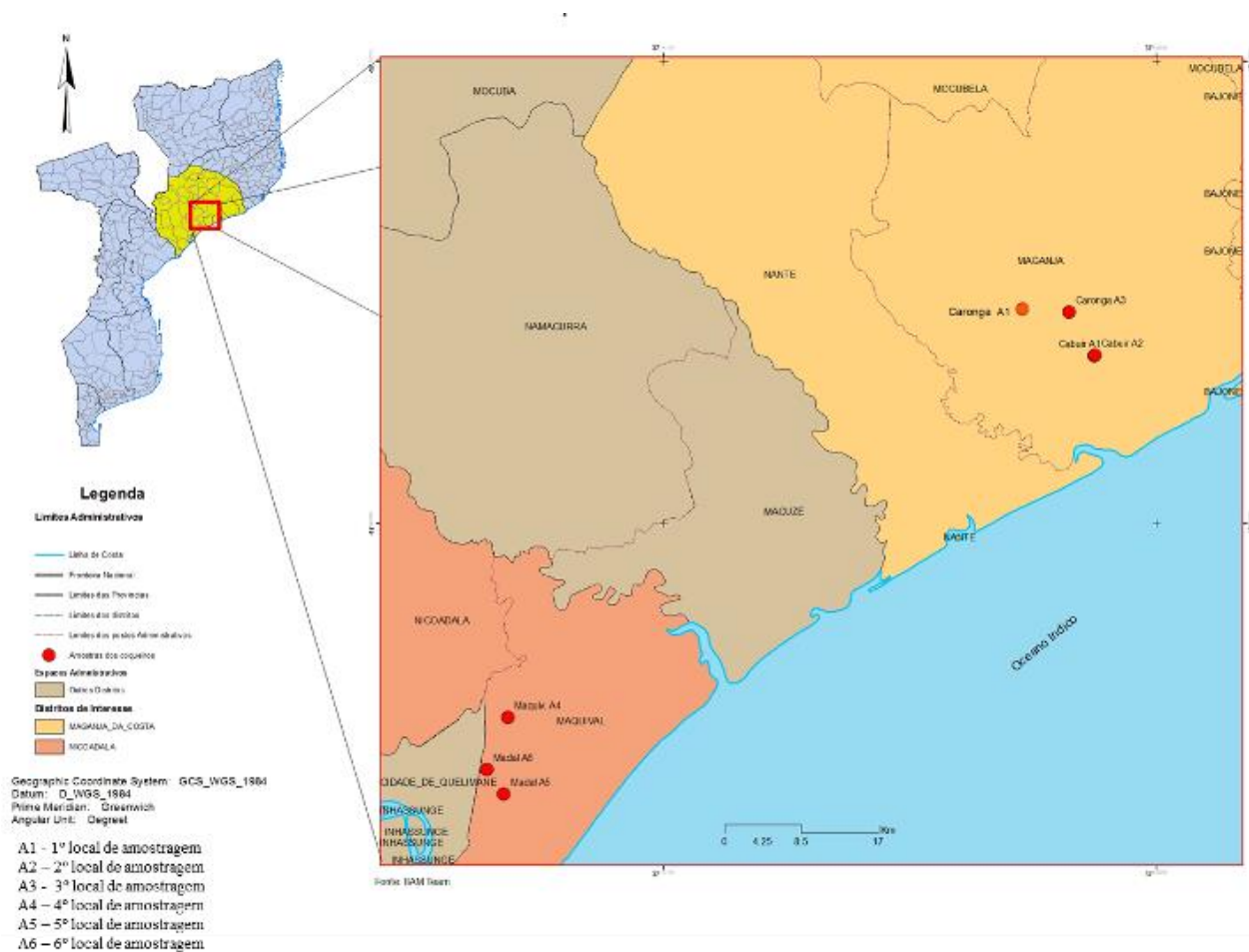
## 5.2. Recomendações

As recomendações que a seguir se descrevem são uma humilde contribuição para permitir uma redução da propagação da doença do amarelecimento letal do coqueiro nas províncias afectadas e baseiam-se nos resultados do presente estudo.

- ✓ Recomenda-se que sejam abatidos todos os coqueiros com sintomas típicos de amarelecimento letal, independentemente da posição em relação ao foco central.
- ✓ As plantas adjacentes à planta sintomática infectada devem ser permanentemente vigiadas para permitir uma identificação precoce dos sintomas e aplicar medidas de controlo.
- ✓ Recomenda-se que se façam estudos semelhantes, alargando o raio de plantas estudadas para 100 metros ou mais para se ter uma ideia mais clara da contaminação das plantas vizinhas. No mesmo estudo, deve-se aumentar o número de campos a serem observados para ter uma amostra mais representativa e prolongar o período de colecta de dados para permitir uma análise mais detalhada.
- ✓ Deve-se fazer estudos mais profundos relativamente a epidemiologia da doença, para se conhecer melhor o ciclo da doença.
- ✓ Deve-se criar Kits rápidos para diagnóstico preliminar do amarelecimento letal do coqueiro no campo para permitir uma intervenção de abate, mais rápida, reduzindo a dessiminação.
- ✓ Nunca se devem usar frutos de coqueiros infectados como semente para multiplicação de novas plantas.
- ✓ Recomenda-se que mudanças no germoplasma do coqueiro sejam conduzidas na forma de embrião em cultura de tecido, para afastar o risco da possibilidade de transmissão por semente, uma vez que alguns autores afirmam que 1% dos cocos de uma planta encontram-se infectados.
- ✓ Recomenda-se que em estudos semelhantes relativamente à transmissão através do fruto, sejam também recolhidos frutos caídos de plantas contaminadas não só os que se encontram ainda fixados aos coqueiros “mãe”.

## ANEXOS

### Anexo 1: Mapa de localização dos coqueiros em estudo nos Distritos da Maganja da Costa e Nicoadala



## **Anexo 2:** Protocolo de amostragem do material do tronco para extração de ADN e detecção de fitoplasma

### **Material e Ferramentas**

- Uma furadeira (broca) elétrica portátil e 6 ½ polegadas de comprimento x 5/16 polegadas de diâmetro (longa é melhor para os Coqueiros). Alternativamente, um suspensório de carpinteiro e pedaço de suspensório (exemplo, ½ polegada de diâmetro).
- Sacos de plástico limpos, e que se podem selar (por exemplo, sacos Ziploc, conservam-se melhor em temperaturas muito baixas).
- Garrafa plástica para conservar água.
- Ferramenta/ tubo em forma de T para preencher o buraco feito pela broca, com mais ou menos 5 polegadas de diâmetro de comprimento x ½ polegada de diâmetro. Martelo para colocar a ferramenta/tubo.
- Maçarico portátil.

### **Procedimentos**

#### (1) Obtenção da amostra do tronco (Figura C)

- Esterilização da broca com a chama da tocha, rodando e torcendo lentamente através da chama para eliminar quaisquer detritos ou DNA que podem aderir à sua superfície (Figura C1).
- Resfriamento da broca usando um esguicho de água de uma garrafa de esguicho (Figura C2).
- Fazer um buraco no tronco da palmeira. Qualquer parte do tronco é boa, mas deve ser muito pequeno por razões de estética da planta. O aglomerado de madeira interior (pelo menos 3 gramas, suficiente para encher uma caixinha de filme) retirado do buraco (Figura C3) será recolhido para um saco plástico e selado (Figura C4) (não pode ser sacos de papel). Deve-se evitar qualquer contacto manual com as lascas uma vez que este tecido é a amostra utilizada para a extração de DNA.

- Certificar-se de que a broca passou da base das folhas velhas para obter tecidos do tronco.
- Algumas amostras aparecem visivelmente descoloridos (marrom avermelhado), devido à deterioração no interior tronco. Estas amostras são muito menos confiáveis comparadas com amostras visivelmente não-descoloridos. As amostras descoloridas, devem ser evitados, se possível, bem como amostragem de coqueiros mortos.
- Etiquetar os sacos com alguns dados (variedade do coqueiro, data e local da amostragem), para permitir que se possa combinar resultados com a amostra.

## (2) Esterilização superficial da broca

- No final da operação, fazer a primeira lavagem com água para remover os detritos.
- A seguir, a broca é, novamente esterilizada com a chama da tocha de propano e resfriado novamente com água (Figuras C1 e C2).
- Esta operação será efectuada antes de furar um buraco no tronco de outra planta para evitar a contaminação das amostras de tecido.

## (3) Selagem do buraco

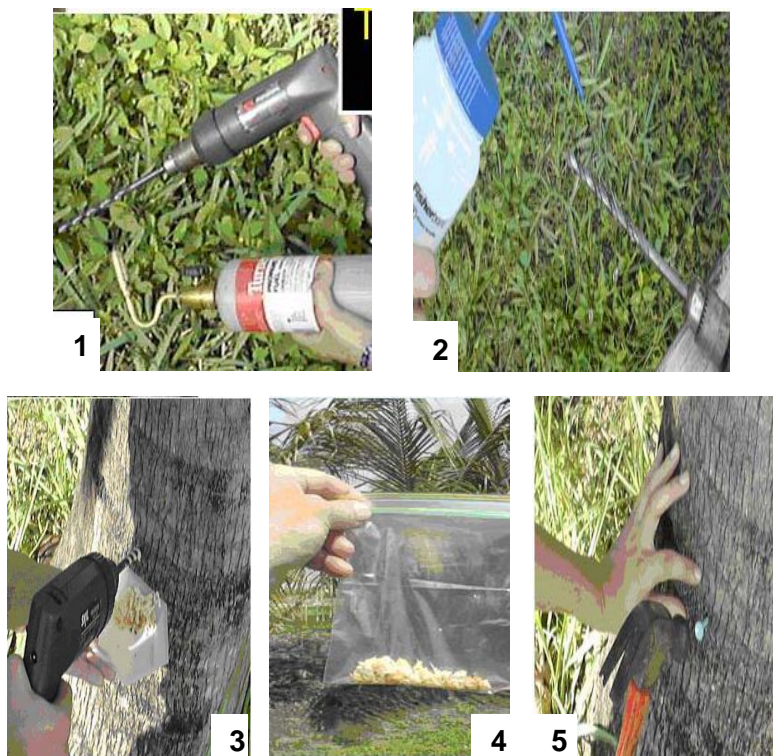
- Inserção de uma ferramenta em forma de T ou tarugo de madeira dentro do buraco da amostra, colocando-a rente ao tronco, com uma martelo (Figura C5).
- Isto serve para selar o buraco e prevenir o sangramento abundante da seiva, impedindo a penetração de pragas e ou outros agentes potenciais indesejáveis.

## (4) Manuseio e transporte das amostras

- Obtida a amostra do tronco (Figura C-4) deve-se manter refrigerada (por exemplo, num colman com gelo). O frio irá evitar a descoloração de amostras durante o transporte do local de colecta, para o local de armazenamento, antes do embarque.
- Não se deve congelar a amostra, e estas serão enviadas dentro de 24 horas após a colecta, para o Centro de Biotecnologia.



- As amostras serão enviadas ainda em seu saco de plástico original e selado. Não será necessário mantê-las em gelo durante o transporte, mas devem-se conservar em lugar fresco.



(1) Esterilização da broca com a chama da tocha.

(2) Lavagem da broca, após a esterilização no final de uma operação para evitar a contaminação de uma operação de amostragem subsequente.

(3) Furando um buraco para obter tecidos no interior do tronco do qual será extraído o DNA.

(4) O material colectado é colocado num saco plástico. Evitar o contacto manual com a amostra.

(5) Inserindo uma ferramenta em forma de T, dentro do buraco da amostra, rente ao tronco, com auxílio de um martelo.

**Figura C.** Amostragem do tronco para detenção de fitoplasma por técnicas moleculares (Jones, 2005)

### **Anexo 3 : Protocolo de Extração do Ácido desoxiribonucleico (DNA) para Coqueiro**

O teste será feito com base nos procedimentos seguidos pelo Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane.

O isolamento do DNA foi feito usando a solução Tampão CTAB, como a seguir se descreve:

1. Pesar 500 mg de material de planta e colocar num almofariz contendo 4 ml de CTAB buffer (inicie com 2.5 ml e perfaça o volume a medida que for macerando) e 1% de PVP (ponta de uma espátula);
2. Macerar até formar uma mistura homogénea;
3. Transferir 2 ml do macerado para um tubo de igual volume;
4. Adicionar 2 µl de RNase A (20 mg/ml) a cada 2 ml do macerado e deixar na bancada por 5 min;
5. Incubar a mistura por 20 min à 65°C. Misturar 2 a 3 vezes durante a incubação por tubo invertido.
6. Centrifugar por 2 min à 13000 rpm e transferir 1 ml do sobrenadante para um novo tubo (de preferência de 2 ml);
7. Adicionar um ml de clorofórmio-álcool-isoamílico e e agitar manualmente por 20 segundos;  
Nota: este processo deve ser efectuado na camara de fumos.
8. Centrifugar por 15 min a 13200 rpm e transferir o sobrenadante para um novo tubo (de preferência de 2 ml);
9. Adicionar 1 ml de Isopropanol gelado e guardar a -20°C por 30 minutos;
10. Centrifugar por 15 min a 13200 rpm;
11. Descartar o sobrenadante;
12. Lavar duas vezes com etanol a 70% centrifugando a 13200 rpm por 10 a 15 minutos respectivamente (nas duas lavagens, descartar descartar cuidadosamente o etanol);
13. Secar o pellet a temperatura ambiente (30 minutos a 1 hora, dependendo da quantidade de etanol remanescente na última lavagem);
14. Ressuspender em 50 µl de dd H<sub>2</sub>O e guardar a 4°C até necessitado para uso.

Nota: a ressuspensão pode ser completada ou complementada incubendo as amostras a 37°C por 1-2 horas e depois guardar a a 4°C até a data de uso.

#### **Anexo 4:** Identificação do ALC por Polymerase Chain Reaction (PCR)

Para identificação do ALC no ADN isolado, foi realizado um PCR usando os primers P1/P7 e Gana 813f/ Awka SR, nas condições seguintes.

<b>Reagentes</b>	<b>Volume por reacção (µl)</b>	<b>Concentração Final</b>
	<b>1 X</b>	
Coral load PCR buffer	2.5	
dNTP's	0.5	
Primer P1	1.0	
Primer P7	1.0	
<i>Taq</i> polymerase (5U)	0.25	
Miliq Water	18.25	
DNA	1.5	
Volume por reacção	25	

Programa de PCR P1/P7

Temperatura	Tempo	Nr de ciclos
94°C	1 min 30 seg	1
94°C	30 seg	30
56°C	50 seg	
72°C	1 min 30 seg	
72°C	10 min e 4° C até ao final	1

Programa de PCR Ghana 813f/ Awka SR

Temperatura (°C)	Tempo	Nr de ciclos
94	1 min 30 seg	1
94	30 seg	35
52	50 seg	
72	1 min 30 seg	
72	10 min e 4° C até ao final	1

## **Anexo 5:** Preparação do Tampão de Extração CTAB e do Tampão de corrida TBE

### **Preparação do Tampão de Extração CTAB**

Procedeu-se a pesagem de 3 gramas (gr) de CTAB, 8.1gr de NaCl (1.4 Molar), 0.8 gr de EDTA (100mμ) e 1.21 gr de trisbase (100mμ). Todos os produtos químicos foram colocados num copo erlenmeyer e adicionou-se água destilada até completar o volume de 100 ml. Usando o Phmetro ajustou-se o PH para 8 e colocou-se a solução no misturador magnético a 75°C a 500-700 rpm, durante 30 minutos.

### **Preparação do Buffer TBE - Tampão de corrida**

Para preparação deste tampão procedeu-se com a pesagem de 108 gr de trisbase, 55 gr de Ácido Bórico e 7.44 gr de EDTA (40 ml, 0.5 M). Todos os produtos químicos foram colocados num frasco com tampa e adicionou-se água destilada até completar o volume de 1000 ml. Usando o Phmetro ajustou-se o PH para 8 e colocou-se na autoclave por cerca de 3 horas.

## **Anexo 6:** Escala da Severidade do ALC

### **Escala de Classificação dos Sintomas do Amarelecimento Letal do Coqueiro**



**Estágio 1**  
Nenhum sintoma



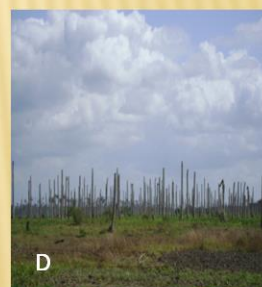
**Estágio 2**  
Queda prematura dos frutos (A) e necrose das inflorescências (B)



**Estágio 3**  
Amarelecimento das folhas  
basais



**Estágio 4**  
Amarelecimento de todas  
as folhas, da base para o  
topo

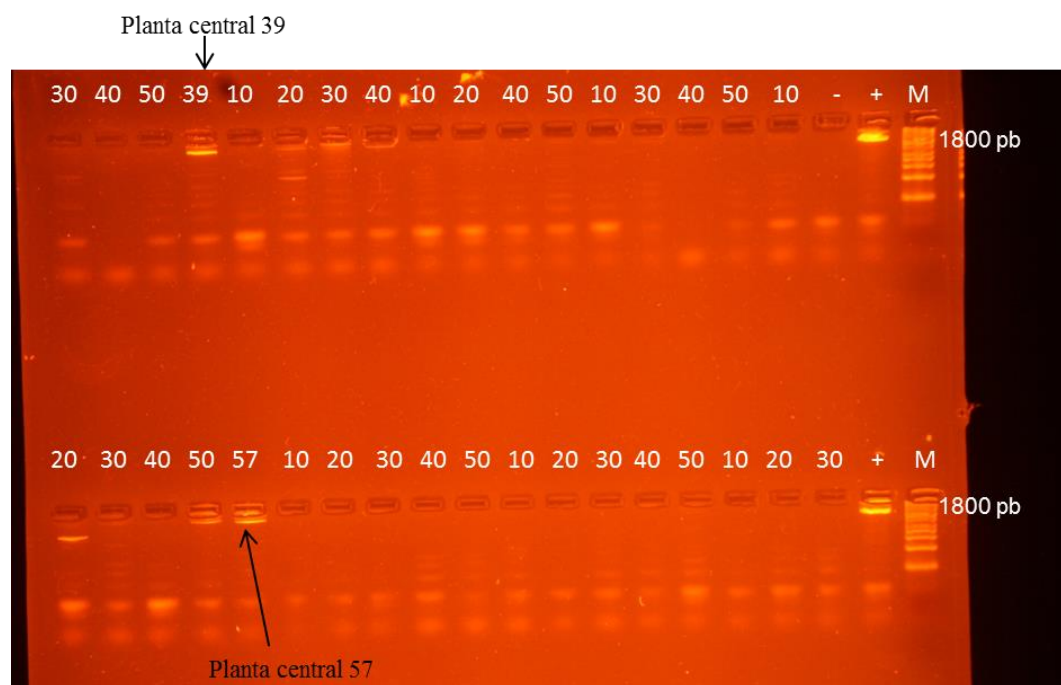
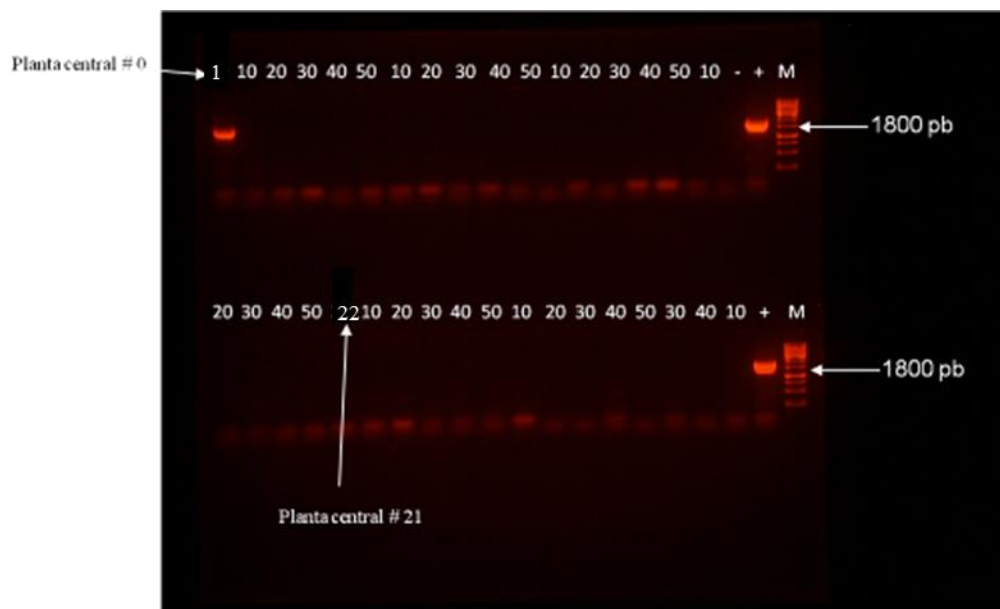


**Estágio 5**  
Morte apical da planta (C) e morte de toda planta (D)

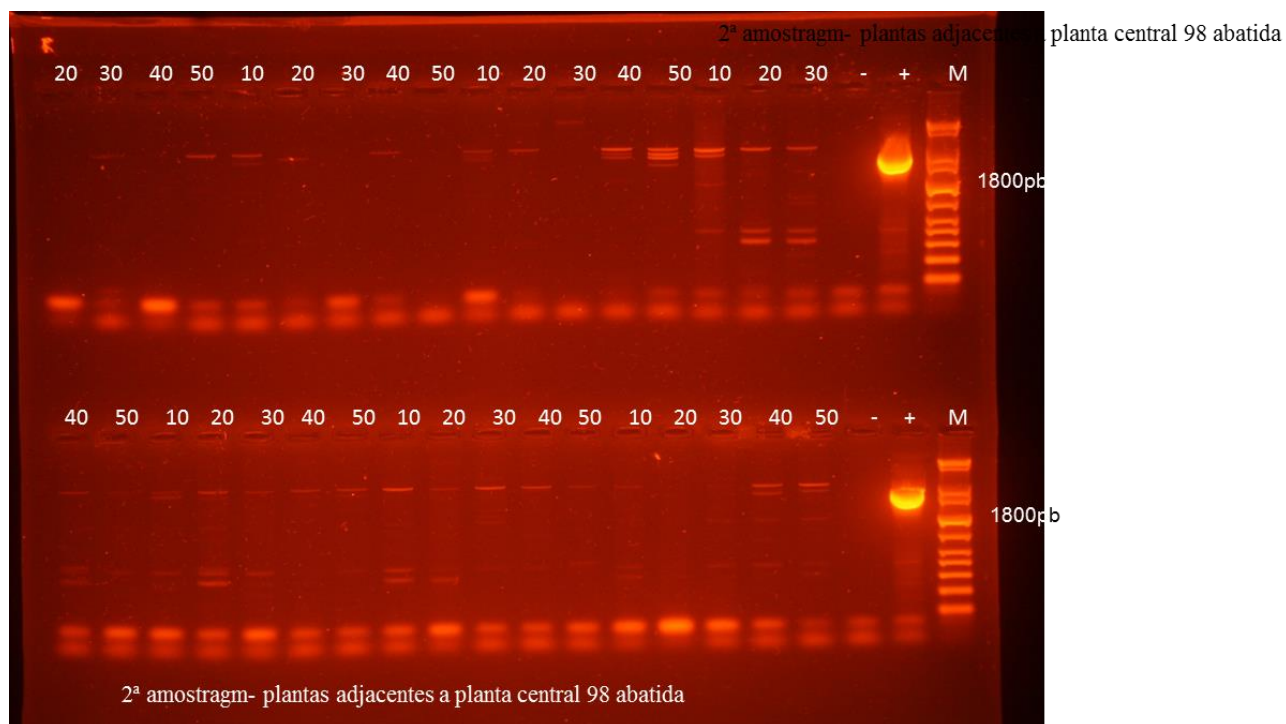
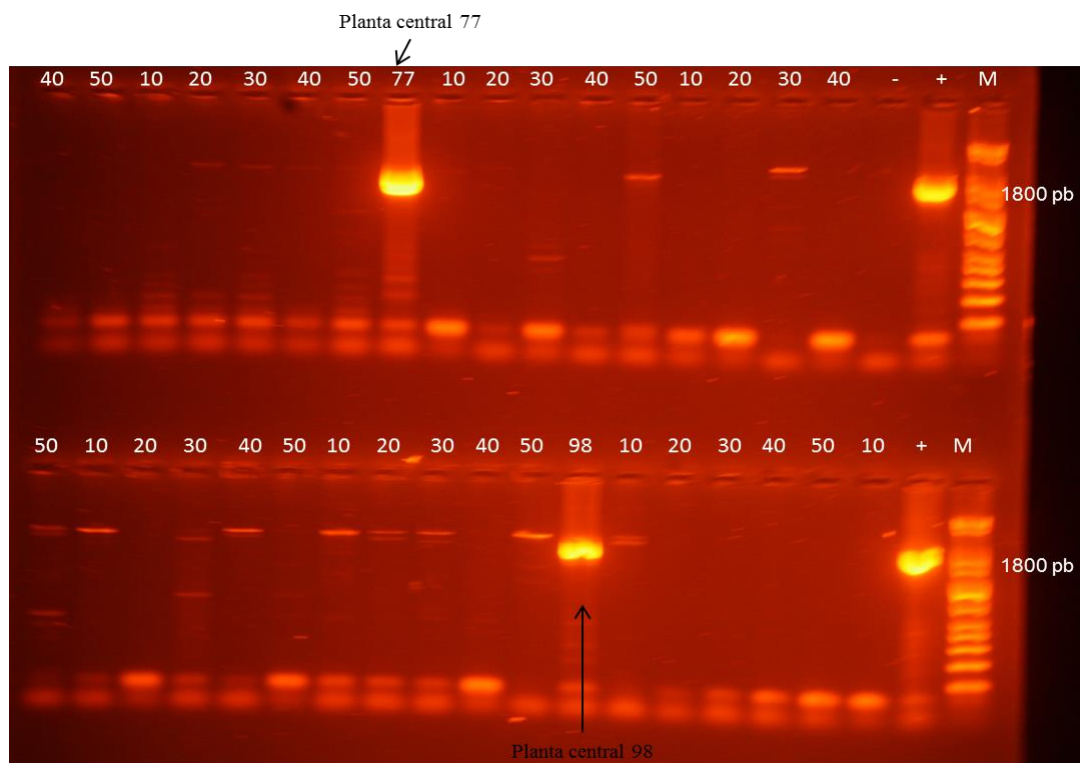


## Anexo 7: Resultados de PCR de todas as amostras colhidas e analisadas

### Primeira amostragem



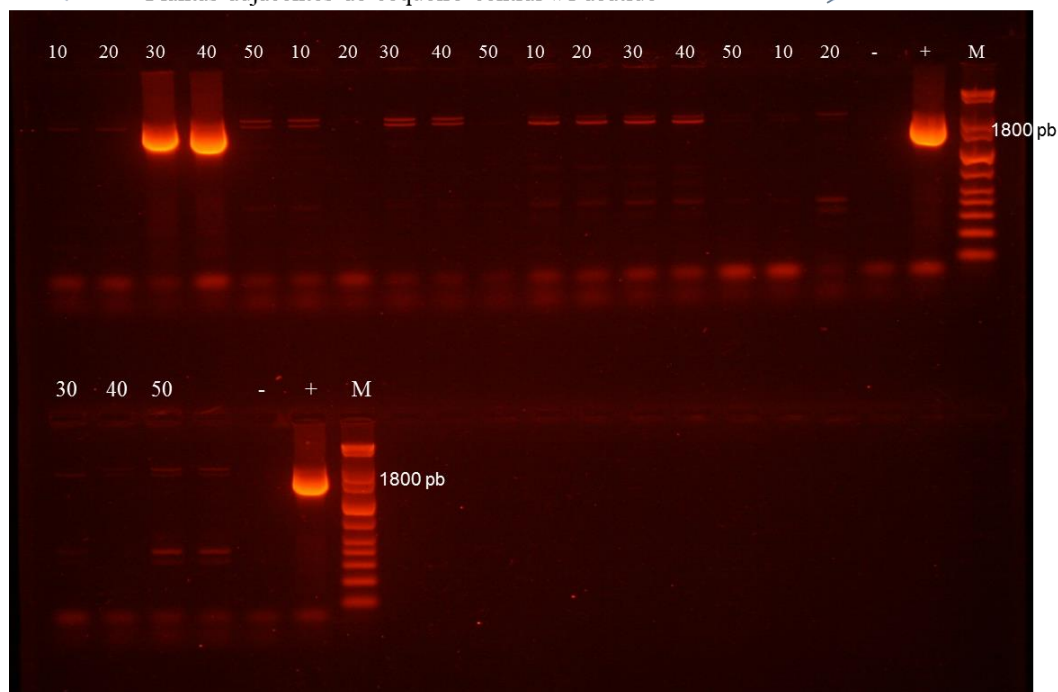
**Legenda:** 10, 20, 30, 40, 50 – Distância entre das plantas adjacentes em relação a planta central





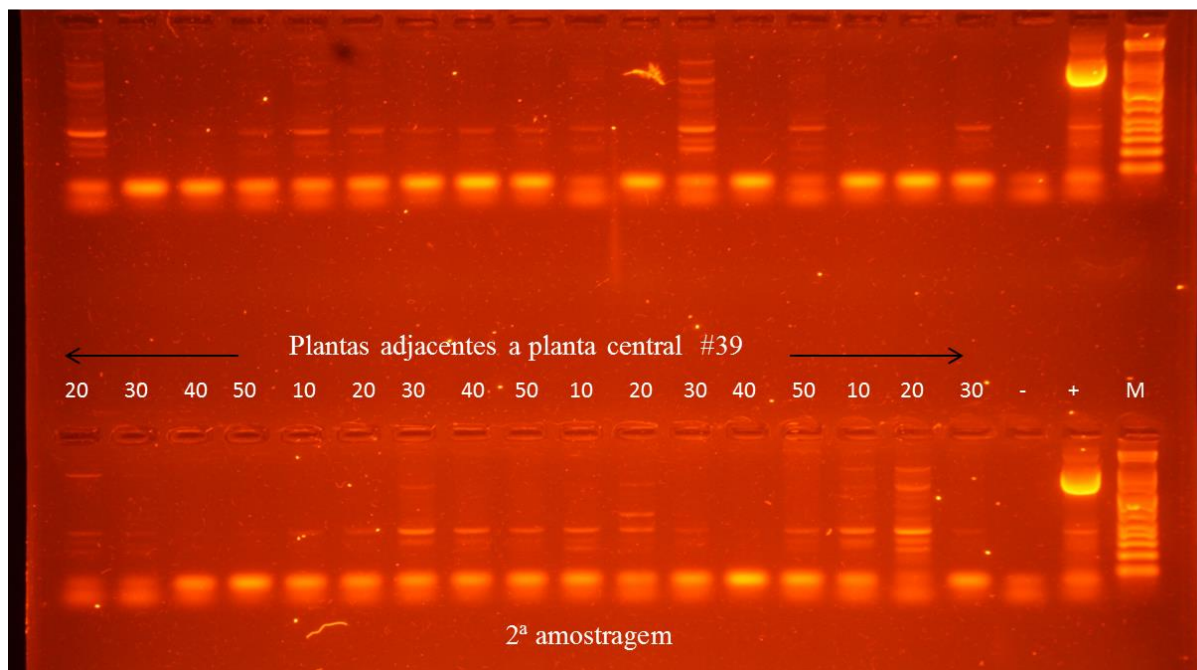
## Segunda Amostragem

← Plantas adjacentes ao coqueiro central #1 abatido →

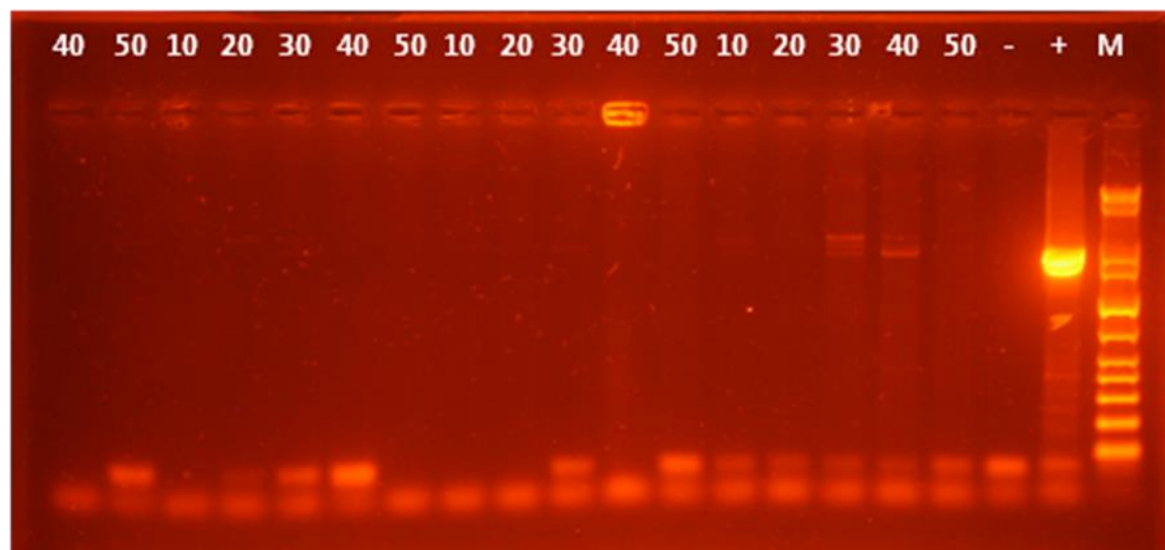


← Plantas adjacentes a planta central #22 →

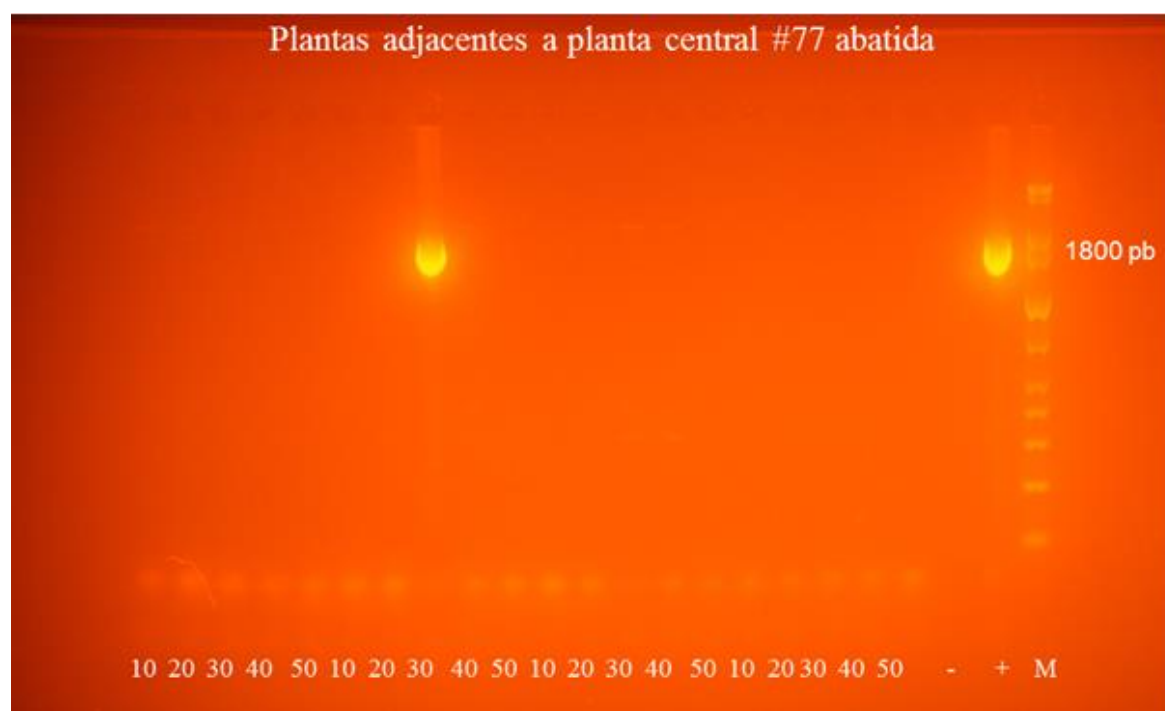
22 10 20 30 40 50 10 20 30 40 50 10 20 30 40 50 10 - + M



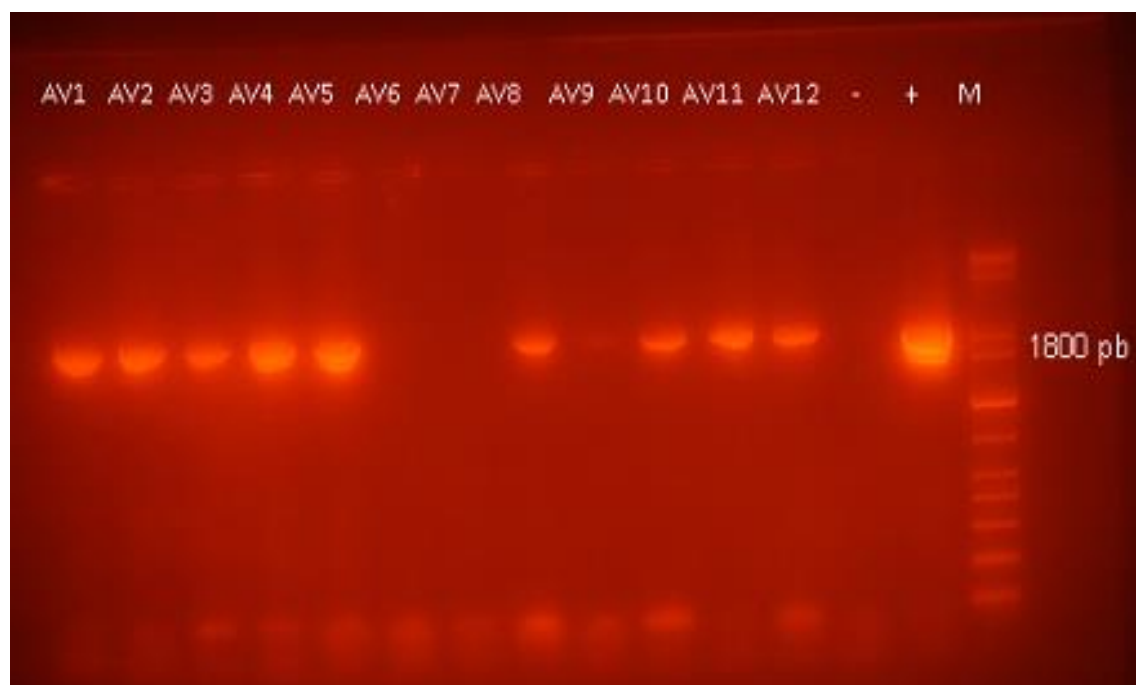
## Plantas adjacentes a planta central #56



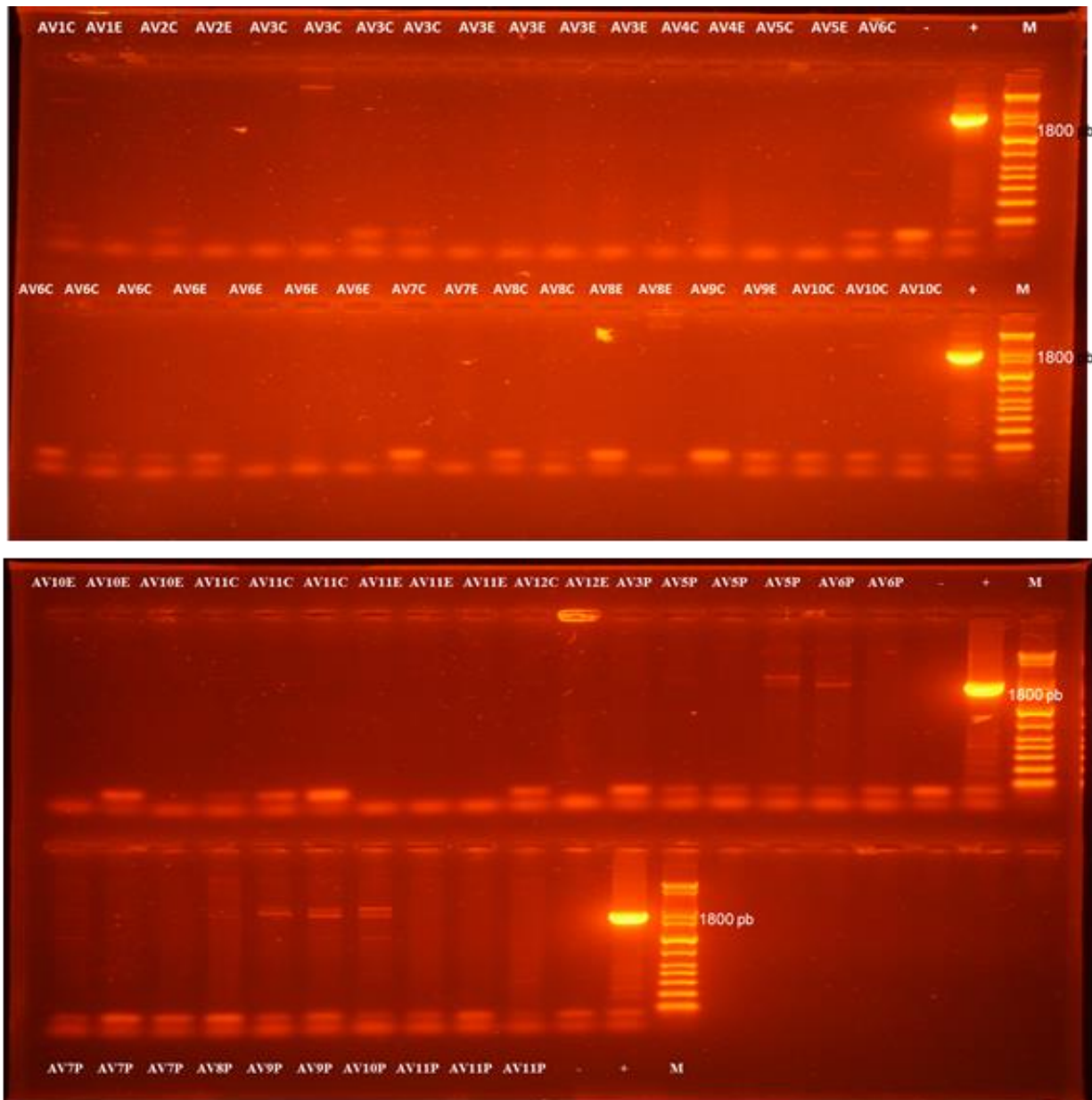
## Plantas adjacentes a planta central #77 abatida



Amostragem da planta mãe para o estudo da transmissão do ALC pelo fruto



Amostragem para o estudo dos frutos, caíro, embrião e plântula



**Anexo 8: Ficha de Registo de dados de recolha de amostras da doença do amarelecimento letal do coqueiro**

Levantamento #: \_\_\_\_\_ Data de amostragem \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
 Província \_\_\_\_\_ Distrito \_\_\_\_\_  
 Localidade \_\_\_\_\_ Proprietário \_\_\_\_\_  
 Área(ha) \_\_\_\_\_ Tipo de cultivo (puro ou consociado) \_\_\_\_\_ Se  
 consociado, com que culturas \_\_\_\_\_ Tipo de levantamento  
 (inicial/aleatório ou sistemático) \_\_\_\_\_ Densidade de  
 palmeiras ao redor do local de colecta \_\_\_\_\_ Nome completo do colector  
 \_\_\_\_\_ Assinatura do colector \_\_\_\_\_

#Planta	Coordenadas geográficas		<sup>(1)</sup> Incidência (0 ou 1)	<sup>(2)</sup> Sintomas do ALC (1 à 5)	Código da amostra	Raio	Variedade	Observação
	Lat	Long						
0								
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								

**Legenda**

<sup>(1)</sup>: 0 – ausente; 1- presente

<sup>(2)</sup>: 1- Planta sem sintomas; 2- Planta com sintomas iniciais do ALC (queda de frutos e necrose das inflorescências); 3- Amarelecimento das folhas basais e/ou necrose, associados aos sintomas descritos em 2.; 4- Sintomas severos (amarelecimento de todas as folhas da base ao topo); 5- Morte apical e de toda planta (tronco nú).

**Anexo 9: Ficha de Registo de dados de recolha de amostras da doença do amarelecimento letal do coqueiro**

Levantamento #: \_\_\_\_\_ Data de amostragem \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
 Província \_\_\_\_\_ Distrito \_\_\_\_\_  
 Localidade \_\_\_\_\_ Proprietário \_\_\_\_\_  
 Área(ha) \_\_\_\_\_ Tipo de cultivo (puro ou consociado) \_\_\_\_\_ Se consociado, com que culturas \_\_\_\_\_ Tipo de levantamento (inicial/aleatório ou sistemático) \_\_\_\_\_ Densidade de palmeiras ao redor do local de colecta \_\_\_\_\_ Nome completo do colector \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ Assinatura do colector \_\_\_\_\_

# Planta	Coordenadas geográficas		(*) Incidência (1 ou 2)	(2) Sintomas do ALC (1 à 5)	Código da amostra	# total frutos colhidos	# frutos/parte colhida			
	Lat	Long					Tronco	Embrião	Cairo	Plântula
0										
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										
20										

**Legenda**

(1): 0 – ausente; 1- presente

(2): 1- Planta sem sintomas; 2- Planta com sintomas iniciais do ALC (queda de frutos e necrose das inflorescências); 3- Amarelecimento das folhas basais e/ou necrose, associados aos sintomas descritos em 2.; 4- Sintomas severos (amarelecimento de todas as folhas da base ao topo); 5- Morte apical e de toda planta (tronco nú).