

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**INFLUÊNCIA DA LUZ EM PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS DA
SIGATOKA-AMARELA DA BANANEIRA**

DJALMA MOREIRA SANTANA FILHO

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

ABRIL – 2012

INFLUÊNCIA DA LUZ EM PARÂMETROS EPIDEMIOLÓGICOS DA SIGATOKA-AMARELA DA BANANEIRA

DJALMA MOREIRA SANTANA FILHO

Engenheiro Agrônomo

Universidade Federal da Bahia, 2006

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Francisco Ferraz Laranjeira

Co-Orientador: Zilton José Maciel Cordeiro

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA

ABRIL - 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

S232

Santana Filho, Djalma Moreira.

Influência da luz nos parâmetros epidemiológicos da Sigatoka-amarela da bananeira / Djalma Moreira Santana Filho. Cruz das Almas, BA, 2012. 80f.; il.

Orientador: Francisco Ferraz Laranjeira.

Coorientador: Zilton José Maciel Cordeiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Banana – Doenças. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 634.772

Ficha elaborada pela Biblioteca Central UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
DJALMA MOREIRA SANTANA FILHO**

Dr. Zilton José Maciel cordeiro
Embrapa Mandioca e Fruticultura
(Coorientador)

Dr. Hermínio Souza Rocha
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dr. Jorge Teodoro de Souza
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em _____.

A meus pais, Djalma e Auristela, por todo apoio dado em toda minha vida.

Aos meus irmãos, Adriana, Aurenívia, e Diêgo, pelo apoio e carinho incondicional.

A minha namorada, Thayane, pelo amor dedicado na fase final desse trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo Dom da vida, pela força, e por estar sempre presente comigo, iluminando meus passos e minha mente, dando-me sabedoria para que eu pudesse concluir mais esta etapa da minha vida.

A todos os meus familiares pelo carinho e paciência, e por entender as ausências em momentos importantes da nossa família.

A todos os meus amados amigos, em especial a Jackeline e Evani, pelo apoio, força e carinho, e pelos incentivos na ampliação dos meus conhecimentos e exemplos que norteiam a minha vida. Sou eternamente grato a vocês.

Aos amigos Almir, Saulo, Neto e Darlan pelo bom convívio e amizade nesse período na República.

Ao Dr. Francisco Laranjeira, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pela confiança, amizade e conselhos, compartilhando seus conhecimentos, contribuindo para minha formação profissional.

Ao Dr. Hermínio Rocha e a Dra. Aparecida Araújo, pela amizade, paciência, incentivo e por estarem sempre dispostos a ajudar, por todos os ensinamentos e contribuições indispensáveis.

Ao Dr. Zilton Cordeiro, pela participação e dicas essenciais à realização do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFRB e Embrapa Mandioca e Fruticultura, pela oportunidade de realização do curso.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia, Milene, Décio, Shirley, Lília, Dani, Naíra, Rita, pela grande ajuda na execução do trabalho.

Ao Francisco Paulo, técnico do Laboratório de Fitopatologia, pela disponibilidade e ensinamentos práticos.

À analista Eliane e ao Chefe do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa, Dr. Hermes Peixoto Santos Filho.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram na realização desse trabalho.

A Capes, pela concessão da bolsa durante o período do curso.

Aos colegas do curso, pelo convívio e amizade.

“Aprende que o tempo não é algo que você possa voltar para trás; portanto, plante o seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.

E você aprende realmente que pode suportar que realmente é forte, e que pode ir muito longe...

Depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida”.

William Shakespeare

ÍNDICE

	Página
1.0 INTRODUÇÃO GERAL	01
2.0 REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Banana e bananicultura	04
2.2 Aspectos gerais da Sigatoka-amarela da bananeira	05
2.3 Parâmetros de Pré-Penetração e Monociclo	10
2.4 Fatores Ambientais e a Sigatoka- amarela	14
2.5 Variabilidade genética do Patógeno:	18
CAPÍTULO 1	
3.0 Estudo <i>in vitro</i> do crescimento micelial e esporulação de <i>M. musicola</i> em diferentes níveis de iluminância.	20
3.1 Resumo	21
3.2 Abstract	22
3.3 Introdução	23
3.4 Material e Métodos	25
3.5 Resultados	28
3.6 Discussão	32
CAPÍTULO 2	
4.0 Interferência da iluminância nos parâmetros monocíclicos do patossistema <i>Mycosphaerella musicola</i> – <i>Musa</i> spp.	35
4.1 Resumo	36
4.2 Abstract	37
4.3 Introdução	38
4.4 Material e Métodos	40
4.5 Resultados	44
4.6 Discussão	57
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
6.0 REFERÊNCIAS	63
7.0 ANEXOS	77

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

A banana é uma das frutas mais importantes do mundo, tanto no que se refere à produção quanto à comercialização. Além de ser um alimento complementar da dieta da população mundial, apresenta grande relevância social e econômica. A produção dessa fruta funciona como geradora de renda tanto para pequenos agricultores como para mega empreendimentos (FIORAVANÇO, 2003).

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (2011), em 2009 o Brasil era o 5^a maior produtor mundial da fruta. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2011), a região Nordeste se destacou nesse ano por ser a maior produtora com 40,4% da produção nacional, com o estado da Bahia como maior produtor nacional com 48,4% da produção do Nordeste.

A dificuldade de manejo ainda compromete a produção da fruta. Dentre os diversos problemas na manutenção dos pomares, destaque merecido deve ser dado aos problemas patológicos, causados principalmente por fungos, vírus, nematóides e bactérias (CORDEIRO; MATOS, 2000).

Entre os patógenos causadores dessas doenças na cultura da banana, sobressaem-se *Mycosphaerella musicola*, fungo causador da Sigatoka-amarela, *Fusarium oxisporum f. sp. cubense*, fungo causador do mal-do-Panamá, *Mycosphaerella fijiensis*, fungo causador da Sigatoka-negra, e a bactéria *Rashtonia salonacearum*, causadora do moko da bananeira (CORDEIRO; KIMATTI, 2005).

Também conhecida como Cercosporiose ou mancha foliar da bananeira, causada por *Mycosphaerella musicola* Leach (Stat. Conid. *Cercospora musae* Zimm.), a Sigatoka-amarela foi observada pela primeira vez nas proximidades de Buitenzorg, em Java no ano de 1902, por Zimmermann (PHILPOTT; KNOWLES, 1913) e ganhou notoriedade após os prejuízos causados no distrito de Sigatoka, na ilha de Viti Levu, em Fiji, onde foi observada pela primeira vez na forma epidêmica (MEREDITH, 1970).

A primeira epidemia no território brasileiro foi registrada em 1944, no Amazonas (KIMATI; GALLI, 1980). Hoje, o fungo *M. musicola* encontra-se disseminado por praticamente todas regiões do mundo que praticam a bananicultura (FOURÈ, 1994), se mostrando como uma das principais doenças

da fruteira, provocando sérios danos na região subtropical (MOURICHON, 2002). No entanto, a Sigatoka-amarela é uma doença endêmica, com surtos epidêmicos ao longo do tempo a depender das condições climáticas (FOURÈ, 1994).

Dois tipos de esporos são produzidos nas lesões, a depender do tipo de reprodução do fungo. Se a reprodução for assexuada, são produzidos conídios, se sexuada, ascósporos (STOVER, 1970).

Segundo Cordeiro, Rocha e Araújo (2011) estudos feitos na Jamaica por Leach (1946) mostraram que o clima interfere na produção de frutificações de *Mycosphaerella musicola*. As espermogônias, estruturas presentes na reprodução sexuada do fungo, são mais frequentes na face adaxial das folhas, em lesões com peritécios, hoje conhecidos como pseudotécios. Pseudotécios produzem os ascos, que por sua vez dão origem aos ascósporos. A produção dos ascósporos era reduzida em épocas do ano de clima frio e seco.

Outros autores como Fulton (1962), Price (1960) e Rocha (2008) associam maiores danos provocados pela doença a períodos chuvosos ou em que a umidade relativa é alta, quando há disponibilidade de água livre.

Os conídios são os esporos produzidos nos esporodóquios, na fase de reprodução assexuada de *M. musicola*. Para Wardlaw (1961) os conídios são primariamente formados na face abaxial das folhas. Esses esporos se formam em pequenas pontuações de coloração marrom e se tornam abundantes quando há disponibilidade de água. Calpouzos (1955), Stahel (1937), Wardlaw (1961) perceberam em seus trabalhos que os conídios estão associados a condições chuvosas ou de alta umidade.

A luminosidade também parece ser condição importante para o desenvolvimento da doença no campo. Em estudos recentes com o patossistema Sigatoka-negra em bananeira foi observado que a esporulação *in vitro* de *M. fijiensis* apresentou diferenças quando submetidas a diferentes tipos de luz e do padrão de vedação adotado para as placas de Petri utilizadas no experimento. Luz negra é melhor que a luz branca para induzir a esporulação de isolados de *M. fijiensis*. O número de colônias também foi significativamente maior sob luz preta que sob luz branca. (ETEBU et al, 2005). Entretanto, outros estudos mostraram que um regime de luz contínuo proporciona uma maior esporulação. Também houve superioridade na produção de conídios sob luz alternada em relação ao regime de escuro

contínuo, embora não tenha havido diferença significativa entre esses dois regimes (ALBUQUERQUE, 1993).

Mycosphaerella musicola, é um fungo da classe dos ascomicetos (CARLIER et al, 1994) que tem sua sobrevivência garantida devido à disponibilidade de tecidos o ano inteiro (AGRIOS, 2005). Apesar de não apresentar estruturas de sobrevivência, ascósporos podem perdurar por algum tempo, bem como as estruturas reprodutivas, em restos de plantas em decomposição no solo.

Durante a disseminação os esporos podem ser liberados e transportados pelo vento, pela chuva ou pelo orvalho da manhã. Ela ocorre basicamente por respingos da água sobre as folhas, ou pelo carregamento de esporos pelo vento como visto em Burt (2002) e Agrios (2005).

Conídios e ascósporos têm importância distinta na epidemiologia da Sigatoka-amarela, tendo em vista as diferenças que apresentam quanto à produção, disseminação, longevidade e deposição (CORDEIRO, 1997). A depender do tipo de esporo produzido podem ocorrer padrões diferentes de dispersão (STOVER, 1970).

Os sintomas são basicamente estrias amarelas, verde-amareladas, ou amarelo-pálidas em ambas as superfícies das folhas (KLEIN, 1960; MEREDITH, 1970). O desenvolvimento das lesões foi descrito por Meredith (1970) em seis estádios que vai desde o aparecimento de uma pequena lista, Estádio I, até que a mancha esteja plenamente desenvolvida, Estádio VI.

É uma doença que se caracteriza por reduzir a área fotossintética da planta, afetando assim o rendimento dos frutos (SIMMONDS, 1966). As perdas na produção, em locais onde o micro clima é muito favorável a Sigatoka-amarela, podem chegar a 100% se considerado que os frutos produzidos em áreas sem controle da doença não apresentam valor comercial (CORDEIRO; MATOS; MEISSNER-FILHO, 2004).

Estudos das diferentes fases do ciclo de desenvolvimento das doenças e dos fatores que influenciam em sua duração podem proporcionar um melhor entendimento tanto da dinâmica da doença, quanto do potencial para surtos epidêmicos (FOURÈ, 1994). O pouco conhecimento sobre a epidemiologia de *Mycosphaerella sp.* despertou a necessidade de estudos que melhorassem a compreensão dos diferentes componentes epidemiológicos do patógeno e dos fatores bióticos que também afetam partes do ciclo de infecção (MOURICHON, 2002).

Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar a ação da luz desde a pré-penetração até o monociclo do patossistema “*Mycosphaerella musicola* x *Musa* spp.”

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Banana e bananicultura

Não se pode afirmar com certeza a origem da bananeira. Atualmente admite-se que ela seja originária do oriente, Sul da China ou Indochina. Há referências de sua presença na Índia, Malásia e Filipinas há 4.000 anos (MOREIRA, 1987; OLIVEIRA, 2010). Constitui elemento importante na alimentação de populações de baixa renda, não só pelo alto valor nutritivo, mas também pelo baixo custo. Rica em vitamina C, A e B, muito potássio, pouco sódio (CORDEIRO; MATOS; MEISSNER-FILHO, 2004).

Caracteriza-se como fruta de alto volume de produção, fácil inserção no comércio mundial, constituindo-se em elemento estratégico para empresas e países que atuam nos mercados frutícolas (FIORAVANÇO, 2003). O Brasil era o 5^a maior produtor mundial da fruta, perdendo para Índia, China, Filipinas e Equador em 2009, com uma produção de 6.783.480 (MT) (FAO, 2011). Destaque para as regiões Nordeste e Sudeste, com respectivamente 40,4% e 30,6% da produção nacional. Nesse ano, a Bahia foi o maior produtor nacional com 48,4% da produção do Nordeste (IBGE, 2011).

Apesar da baixa produtividade, o país consegue superar grandes produtores devido à extensão de área plantada. A importância da atividade agrícola evidencia a necessidade de melhoria das condições de produção para alcançar melhores resultados.

Dentre os vários problemas que a bananicultura enfrenta, destacam-se as limitações fitossanitárias. Há registros de várias patógenos causando doenças na cultura da bananeira, dentre os quais se destacam vírus, bactérias, nematóides e fungos, em especial *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis*, fungos causadores do mal-do-Panamá, da Sigatoka-amarela e da Sigatoka-negra, respectivamente, e da bactéria *Ralstonia solanacearum*, que causa o moko da bananeira (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005).

A Sigatoka-amarela alcança grande importância econômica em regiões onde a Sigatoka-negra ainda não é encontrada, apresentando-se nestas regiões como uma das principais doenças da bananicultura (FERNANDES et al, 2006). A doença está presente em todos os pomares brasileiros, causando severas perdas de produtividade.

No Brasil, as perdas giram em torno de 50% do rendimento médio em pomares atacados por *M. musicola*, valor esse que pode aumentar em determinadas regiões do país, gerando frutos de baixíssima qualidade (ROCHA, 2008). Esse percentual é ainda mais alto em locais onde o micro clima é muito favorável, chegando a alcançar perdas de 100% quando considerado que os frutos produzidos em áreas sem controle da doença não apresentam valor comercial (CORDEIRO; MATOS; MEISSNER-FILHO, 2004).

Os efeitos são a redução do tamanho dos cachos e do número de mãos por cacho, frutos menores e mais leves que amadurecem prematuramente. A alta incidência na fase inicial do pomar pode causar declínio das plantas. Ocorre redução do vigor das plantas e conseqüente redução no rendimento em plantas de ciclo tardio, reduzindo a vida útil dos pomares (CORDEIRO; MATOS, 2001).

O uso de métodos de controle cada vez mais eficazes se tornou a única alternativa ao produtor. Até o final da década de 80, o custo de controle usando cinco aplicações por ano de fungicidas sistêmicos com óleo mineral foi responsável por 9% do custo total de produção. Já existem relatos de 10% desse total (CORDEIRO; MATOS, 2002). Isso mostra que a necessidade de aumento do número de pulverizações dos pomares para o controle da doença faz esse percentual sobre o custo de produção aumentar ao longo do tempo.

2.2 Aspectos gerais da Sigatoka-amarela da bananeira

Origem e distribuição

A Sigatoka-amarela foi observada pela primeira vez em Java, por volta de 1902, ganhando notoriedade em 1913 devido aos grandes prejuízos causados em lavouras no Vale de Sigatoka, Ilhas Fiji. De forma semelhante, no Brasil foi detectada em São Sebastião – SP em 1935, só ganhando destaque nove anos depois, em 1944 no Amazonas, onde ocorreram os primeiros prejuízos econômicos (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005).

A doença apresenta como hospedeiro as espécies *Musa acuminata*, *M. banksii*, *M. basjoo*, *M. liukuensis*, *M. paradisiaca*, *M. textiles*; distribuídas nas regiões produtoras de banana, das quais se destacam como maiores produtores a Índia, o Equador, o Brasil, a China, Filipinas, Indonésia, Costa Rica, México, Tailândia e Venezuela (CROUS et al, 2002).

Segundo Mourichon (2002) a Sigatoka-amarela está distribuída em todo o mundo, mas geralmente provoca poucos danos, exceto na região subtropical, como áreas da Austrália e África do Sul. Entretanto, Jácome (2002) relata que a doença é bem adaptada a áreas mais frias, e dominante em altitudes acima de 1200 metros. Segundo Cordeiro e Matos (2002), ela é encontrada em todas as regiões que cultivam banana, exceto em Israel, Egito e nas Ilhas Canárias (CORDEIRO; MATOS, 2002).

No Brasil, se encontra presente em todo território nacional, tendo as regiões de clima úmido, alta pluviosidade e temperaturas em torno de 25°C, condições mais propícias para o desenvolvimento da doença. O ciclo rápido e severidade elevada da Sigatoka-negra, em áreas onde há incidência dos dois patógenos, acabam mascarando os sintomas de Sigatoka-amarela (FERNANDES et al, 2006). Embora *M. musicola* seja endêmica em todas as regiões produtoras, pode apresentar surtos epidêmicos causando danos que comprometem muito a produção (ROCHA, 2008).

Sintomatologia

A Sigatoka-amarela é uma doença característica das folhas da bananeira, que se classifica como doença tipo V na classificação de MacNew, e, portanto afeta a fotossíntese das plantas atacadas pelo agente causal.

O fungo provoca nas folhas manchas de coloração amarelada, verde-amarelada ou amarelo-pálidas (KLEIN, 1960; MEREDITH, 1970).

Os sintomas se iniciam com uma leve descoloração do tecido em forma de ponto entre as nervuras secundárias da segunda a quarta folha a partir da “vela”, primeira folha contando de cima para baixo, considerada folha zero. O aumento das descolorações dá origem a estrias de tonalidade amarela, que com o tempo se tornam marrom, evoluindo para manchas pretas, necróticas, circundadas por um halo amarelo, tomando a forma elíptico-alongada (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005).

As características peculiares a cada fase do desenvolvimento da doença levou a classificação do desenvolvimento das lesões em seis estádios por Meredith (1970), como descrito a seguir: I - Estádio inicial de listra, onde a pontuação é perceptível a olho nu como uma leve mancha de descoloração verde-amarelada; II - Segundo estágio de listra, onde a mancha aumenta de tamanho, principalmente em comprimento, ainda com aparência de descoloração verde-amarelada; III - Terceiro estágio de listra, quando se inicia uma dilatação na largura e principalmente do comprimento da mancha, com o centro da lesão apresentando coloração tendendo ao vermelho, com aparência de ferrugem; IV – Primeiro estágio de mancha, onde a coloração das lesões é o marrom escuro, com um halo amarelo com aspecto de encharcamento nas folhas túrgidas aparecendo simultaneamente ou 24 h depois do aparecimento da cor. A observação do halo é melhorada quando as lesões são colocadas contra a luz solar. Há um aumento considerável do tamanho da mancha, que se apresenta com formato circular, chegando a um estágio em que é facilmente reconhecida.

O estágio V é o segundo estágio de mancha, onde ocorre o escurecimento do halo e presença de enrugamento e encolhimento da porção marrom escura da mancha. O estágio VI é o terceiro estágio de mancha, onde a mesma encontra-se desenvolvida, com o centro cinza e abaulado, com halo marrom escuro ou preto, formando anel ao redor da lesão, característico mesmo quando a folha está morta.

Agente causal

Meredith e Firman (1970) associaram *Mycosphaerella musicola* Leach ex *Mulder* à Sigatoka amarela, *M. fijiensis* Morellet a estrias negras das folhas, e *M. fijiensis* var. *difformis* à Sigatoka negra.

Hoje se sabe que existem três patógenos de *Mycosphaerella* sp., pertencentes à Classe dos Ascomicetes (MOURICHON et al, 1997), que causam doenças nas folhas de bananeira. São eles *M. fijiensis*, causador da Sigatoka-negra, *M. musicola*, causador da Sigatoka-amarela (CARLIER et al, 1994), e *M. eumusae*, antes conhecida como septoriose da bananeira (CARLIER et al, 2000). As interações patógeno-hospedeiro podem ser determinantes para a diferenciação dos mesmos (CARLIER et al, 2003).

Mycosphaerella musicola é um fungo que sobrevive na própria planta, devido à disponibilidade de tecidos vegetais o ano inteiro, sendo assim incomum mencionar estruturas de resistência para esse patógeno. Alguns autores citam os ascósporos como os responsáveis pela sobrevivência em caso de ausência de plantas suscetíveis. A disseminação é feita de forma variada, com destaque para vento e água, tanto da chuva como de sistemas irrigados. A água e o vento atuam tanto na liberação como na dispersão dos esporos. Os ascósporos são os principais responsáveis pela dispersão a longas distâncias, causando aloinfecções. Os conídios atuam de forma mais intensa causando as autoinfecções (AGRIOS, 2005).

A disseminação eólica de Sigatoka-amarela pode apresentar um padrão global de dispersão de leste a oeste. Registros da doença sugerem que alguma disseminação intra-continental pode ter ocorrido pelo vento. Porém, para esses estudos se faz necessário conhecer melhor a relação entre o vento e o movimento dos esporos (BURT, 2002).

Segundo Burt (2002), são necessários estudos que relacionem o fornecimento de inóculo às características como arquitetura da planta, a superfície foliar, micrometeorologia na folha, histologia de tecidos necrosados, condições naturais de viabilidade de esporos, e dispersão da doença a longas distâncias nos vários estágios de desenvolvimento de *Mycosphaerella musicola* na planta.

Ambos os tipos de esporos iniciam o processo de germinação depois de depositados na superfície do hospedeiro. Antes disso, ocorre uma fase de epifitismo que pode durar até 4 dias, em seguida seguem a germinação com a formação do tubo de infecção ou tubo germinativo, estruturas utilizadas pelo patógeno para invadir as folhas através dos estômatos. Colonizam o hospedeiro com crescimento das hifas entre as paredes das células, produzindo estruturas especializadas em retirar nutrientes da planta, os haustórios. O patógeno apresenta um alto grau de especificidade, caracterizado por sua baixa agressividade, com ataques que não provocam a morte da planta hospedeira, o que denuncia um grau maior de evolução dos mecanismos de parasitismo (AGRIOS, 2005).

Mycosphaerella musicola apresenta duas fases reprodutivas: uma teleomórfica, também conhecida como fase sexuada, onde são produzidos esporos denominados ascósporos. E outra fase anamórfica, que se caracteriza por ser a fase assexuada do patógeno em que são produzidos conídios. A fase anamórfica,

ou fase imperfeita da Sigatoka-amarela, foi descoberta por Zimmermann em 1902, e descrita como uma nova espécie, chamada de *Cercospora musae* Zimm. A fase teleomórfica ou perfeita foi descoberta por Leach em 1941, trabalhando na Jamaica, e denominada *Mycosphaerella musicola* (MEREDITH; FIRMAN, 1970).

Nas folhas atacadas pelo patógeno são produzidos três tipos de frutificação: esporodóquios, espermogônia e pseudotécios (STOVER, 1980). Na fase assexuada o fungo produz conidióforos, os quais originam mitosporos denominados conídios (AGRIOS, 2005). Essas estruturas são produzidas em fascículos densos, ou esporodóquios, sobre estromas de coloração marrom-escuro, medindo 15 a 35 micrômetros (μm), na face adaxial e abaxial do limbo com predominância para a face adaxial. São predominantemente retos, não apresentam septos, não geniculados, sem ramificação na base, não apresentam cicatrizes nos pontos de inserção dos esporos, são hialinos, com dimensões de 5-21 x 2-6 micrômetros. Os conídios são cilíndricos a obclavado-cilíndricos, retos ou curvos, apresentam 0 a 6 septos, sem a presença de hilo basal, de coloração claro a claro-oliváceo, com dimensões de 10-80 x 2-6 micrômetros (PEREIRA; GASPAROTTO, 2005).

O processo sexuado envolve a formação de espermagônios que produzem gametas masculinos denominados espermásias, e o órgão sexual feminino, uma hifa espiralada formada no interior de ascocarpos jovens, a tricogenis (CORDEIRO et al, 2011; WARDLAW, 1961). Primeiro ocorre o desenvolvimento de vários espermagônios nas lesões da face inferior da folha. Os espermagônios são escuros, um tanto erupente em forma de pêra. Em algumas condições essas estruturas podem exudar grandes quantidades de células reprodutivas masculinas, conhecidas como espermásias. As espermásias são finas, cilíndricas, e podem fertilizar hifas femininas receptivas, as tricogenis. Quando a fertilização se completa, os Pseudotécios formam-se nas lesões maduras, com seus ostíolos rompendo os tecidos. Estruturas em forma de sacos bitunicados, denominadas ascos, surgem na parede celular dos tecidos das folhas contendo 8 meiosporos, chamados de ascósporos, alinhados 2 a 2. Pseudoparafises ou elementos estéreis estão ausentes no pseudotécio. Os ascósporos são incolores e apresentam apenas 1 septo. Uma célula do esporo pode ser um pouco maior do que a outra, e eles podem ser ligeiramente constríctos no septo (BENNETT; ARNESON, 2003).

Essas diferenças dos esporos podem refletir na epidemiologia da doença. Ascósporos geralmente provocam lesão na região apical, enquanto que conídios

causam lesões na região basal. Nas folhas, os pseudotécios são encontrados em ambas as faces da folha, porém em maior quantidade na face superior (FERNANDES, 2006).

2.3 Parâmetros de Pré-Penetração e Monociclo

Infecção

A Infecção é o processo pelo qual o patógeno estabelece contato com células ou tecidos suscetíveis do hospedeiro à procura de nutrientes (AGRIOS, 2005). É definida por Gaumann (1950) como o processo que se estende da germinação do patógeno até o estabelecimento de relações parasitárias estáveis com a planta hospedeira, correspondendo, portanto, aos sub-processos de pré-penetração (germinação, crescimento do tubo germinativo), penetração e estabelecimento de relações parasitárias estáveis e colonização (AMORIM et al, 1995).

A infecção de *Mycosphaerella musicola* em bananeira normalmente ocorre por penetração indireta, através de aberturas naturais (estômatos), nas primeiras três folhas novas (contadas em sentido descendente), embora possa ocorrer penetração na 4ª folha em caso de surto severo da doença. O intervalo de tempo que vai da inoculação de plantas ao aparecimento dos primeiros sintomas da doença, nesse caso das primeiras estrias cloróticas, é chamado de período de incubação (MEREDITH, 1970). O período que vai da inoculação ao aparecimento da primeira lesão com esporos é chamado de período de latência.

Os ascósporos são depositados principalmente na superfície inferior das folhas durante a fase de charuto ou vela, produzindo um padrão de mancha de infecções na face adaxial, a qual é exposta pela primeira vez no processo de desenvolvimento das folhas. Esse formato cilíndrico facilita a deposição de esporos sobre a mesma, em oposição à folha inteiramente aberta, em forma de lâmina (MARIN et al, 2003). Assim, a folha no estágio de vela se caracteriza como a melhor armadilha de esporos (ROCHA, 2008).

Esporulação

Os fragmentos miceliares de *M. musicola* apresentam desenvolvimento *in vitro* bastante lento e, diferente de outros fungos, tem crescimento vertical, portanto as colônias ocupam áreas bem reduzidas no meio de cultura, o que possibilita

ter muitas colônias reunidas em uma só placa de Petri. Isso é bastante positivo, visto que permite uma substancial economia de espaço e de reagentes, para o cultivo de grandes quantidades de micélio.

Conídios e ascósporos têm importância distinta na epidemiologia da Sigatoka-amarela, tendo em vista as diferenças que apresentam quanto à produção, disseminação, longevidade e deposição. As manchas começam a produzir conídios quando apresentam coloração preta e cessam de fazê-lo quando seu centro se torna cinza. Essa fase tem duração de três a cinco dias. Entretanto, havendo orvalho, os conídios podem ser produzidos diariamente. A disseminação se dá, sobretudo pela água, ou ocasionalmente e a curta distância pelo vento, caso haja forte agitação das folhas. A disseminação se processa para as plantas inferiores. Os conídios são depositados na face inferior da folha vela ou da folha 1, ainda em formato de charuto (CORDEIRO, 1997).

Os ascósporos são expelidos dos pseudotécios e sua disseminação está associada à ocorrência de água livre. Nesse caso, a disseminação aérea é muito mais extensiva do que no caso dos conídios. Por sua vez, os ascósporos podem sobreviver dentro do pseudotécio por período superior a oito semanas e ainda permanecer viáveis, sobrevivendo a períodos curtos de estiagem. Nos períodos secos a quantidade de esporodóquios e pseudotécios produzidos é menor, o número de esporos decresce e, por conseguinte, diminui a infecção (ROCHA-JÚNIOR, 2007; SIMMONDS; STOVER, 1993;). Estudos realizados na América Central indicaram que a fase conidial desempenha uma maior contribuição de inóculo total para a manifestação da doença (MEREDITH, 1970).

Sob condições *in vitro*, Rosa e Menezes (2001) observaram que as condições, *in vitro*, mais propícias para o crescimento micelial de *Mycosphaerella musicola* é o meio BDA com pH ajustado para 4,5, enquanto que para a esporulação o meio BDA com pH ajustado para 6,5 apresentou melhores resultados. Araújo et al (2011), estudando o crescimento micelial do patógeno em diferentes meios de cultura, também obtiveram melhores resultados com meio BDA, porém um número maior de esporos foi observado em meio V8-ágar.

O fungo pode apresentar esporulação já aos três dias de idade da cultura, crescendo até os cinco dias, com uma ligeira queda aos 7 dias, voltando a crescer até o décimo primeiro dia, e de novo decrescendo até os treze dias. Em geral, iso-

lados de *M. musicola* produzem maior quantidade de esporos aos onze dias de idade do cultivo (ABREU, 2000).

No que se refere aos padrões de infecção, Stover (1980) observou que a depender do tipo de esporo as infecções de *M. musicola* podem resultar em padrões diferentes de manchas. São formados 75 a 125 esporodóquios por mancha na superfície superior da folha, cada um produzindo em média 5,3 grupos de 50 conídios. Estima-se que se a essa quantidade forem somados os esporos da superfície inferior das folhas (onde esporodóquios são menores), uma lesão de Sigatoka pode produzir mais de 30.000 conídios.

Em locais com estações bem definidas, a produção diária de inóculo pode ser relacionada com a presença de água sobre a folha e com níveis mínimos de temperatura, já que temperaturas máximas raramente são limitantes se houver água livre sobre as folhas (CORDEIRO, 1997).

No caso dos esporos sexuados, a formação de pseudotécios ocorre em ambas às faces da folha, porém com maior concentração na face superior. A produção é maior nas folhas que ocupam as posições de número 5 a 10 e na prevalência de períodos chuvosos combinados com temperaturas superiores a 21°C. O pico da produção ocorre no início da estação seca. A água da chuva é essencial para a liberação dos ascósporos, que são disseminados principalmente pelo vento. Esporodóquios, tufo de conidióforos, são produzidos em maior número que os pseudotécios em plantações comerciais. Por outro lado, onde o controle é bem feito, os conídios são provavelmente a maior fonte de inóculo contínuo. Durante a estação seca a produção de conídios diminui sensivelmente, embora estes se encontrem presentes em lesões foliares e sejam produzidos em noites com 10 a 12 horas de orvalho. Na ausência de um período chuvoso favorável à produção de ascósporos, os conídios tornam-se o principal inóculo, devido a serem menos exigentes que os ascósporos em relação à ocorrência de chuva. Por outro lado, a produção de conídios é muito sensível a temperaturas abaixo de 22°C (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005).

Período de incubação

É o tempo decorrido desde a inoculação até o aparecimento dos primeiros sintomas em quaisquer das folhas. A duração desse período varia de acordo com

as relações patógeno-hospedeiro, com o estágio de desenvolvimento do hospedeiro, com a umidade e a temperatura do ambiente (AGRIOS, 2005).

O período de incubação tem se mostrado extremamente variável em função do ambiente, havendo registros de 15 até 106 dias (MEREDITH, 1970). O período de incubação decresce com o aumento da temperatura e aumenta com a redução da intensidade luminosa (MEREDITH, 1970). Segundo Rocha (2008) o período de incubação da doença apresenta médias de 24,9 dias; 21,3 dias e 24,3 dias, nas temperaturas de 20, 24 e 28 °C, respectivamente.

Período de latência

É o tempo decorrido em dias desde a inoculação até o aparecimento da primeira lesão esporulada, estágio V, definido por Brun (1963) (ROCHA, 2008).

O período de latência é amplamente utilizado na literatura abordando esse patossistema, como sendo o "tempo de desenvolvimento da doença", e pode ser definido como o tempo entre a infecção e a formação de manchas maduras. Outro termo comum usado na literatura é "tempo de evolução dos sintomas" ou "período de transição", que é o tempo desde os primeiros sintomas até o aparecimento de manchas maduras. O tempo de evolução dos sintomas dá uma boa indicação de quão rápido a doença está progredindo nas folhas (GAUHL, 2000; MARIN, 2003).

Como o período de incubação, o período de latência também varia de acordo com as condições climáticas, suscetibilidade do hospedeiro, e intensidade de infecções (MARIN et al, 2003). Estudos com a variedade Grande Naine mostraram variações do período latente de 25 a 70 dias na Costa Rica, 44 dias para cultivar Curare (Subgrupo Plátano), 34 dias para a cultivar Valery (Subgrupo Cavendish) (FOURÉ et al., 1984; GAUHL, 1994; MARIN, 2003). Já segundo Rocha (2008) o período de latência apresenta média de 46,5 dias; 32 dias e 33,4 dias para *M. musicola* nas temperaturas de 20, 24 e 28°C, respectivamente.

Período de desenvolvimento da doença (PDD)

É o período que compreende a fase desde a inoculação até o aparecimento de pelo menos 10 lesões esporuladas, estágio V da escala de Brun (1963), nas diferentes folhas de cada planta (GAUHL et al., 2000; ROCHA, 2008). Rocha (2008) afirmou que na época seca se verificam os maiores PDDs.

2.4 Fatores Ambientais e a Sigatoka- amarela

O pouco conhecimento sobre a epidemiologia de *Mycosphaerella sp.* despertou a necessidade urgente de concentrar esforços em estudos que melhorassem a compreensão dos diferentes componentes epidemiológicos do patógeno, e outros fatores bióticos, como por exemplo, a resistência genética do hospedeiro ao patógeno, que também afetam partes do ciclo de infecção (MOURICHON, 2002).

Epidemiologia

Van der Plank (1963) conceituou essa ciência como sendo “a ciência da doença em populações”, enquanto Kranz, num conceito mais completo, define epidemiologia como “o estudo de populações de patógenos em populações de hospedeiros e da doença resultante desta interação, sob a influência do ambiente e a interferência humana” (BERGAMIM-FILHO, 1995).

Nos estudos epidemiológicos faz-se necessário a compreensão prévia dos conceitos de epidemia e endemia, justamente por estarem diretamente ligados aos conceitos de infecção e remoção. Podemos dizer que uma epidemia ocorre quando há um aumento da doença em intensidade e/ou extensão, e é representado por um desbalanço entre infecção e remoção. Nesse caso as infecções são maiores que as remoções. A endemia caracteriza-se por não estar em expansão, portanto, há um balanço perto do neutro entre os processos de infecção e remoção (POZZA; ALVES, 1999).

Na infecção as lesões aparecem e tornam-se infecciosas. A partir da produção de inóculo possibilitam o aparecimento de novas lesões. As lesões velhas não formam mais inóculo, e quando isso ocorre o tecido é considerado removido, ou seja, não contribui mais para novas infecções (POZZA, 2000).

A Sigatoka-amarela é uma doença que se caracteriza por sua natureza endêmica, com surtos epidêmicos ao longo do tempo a depender das condições climáticas locais e do manejo adotado. Fatores ambientais indubitavelmente afetam o desenvolvimento das manchas das folhas causadas por *M. musicola*. Uma alta correlação tem sido estabelecida entre parâmetros climáticos e o desenvolvimento das doenças. Estudos das diferentes fases do ciclo de desenvolvimento das doenças e dos vários fatores que influenciam a duração das fases propiciam

o melhor entendimento da dinâmica da doença nas zonas de produção de banana e o potencial para surtos epidêmicos em plantações. Os resultados de trabalhos que envolvam a biologia e epidemiologia dos patógenos, realizados por uma série de pesquisadores ajudam a aumentar o conhecimento sobre os causadores das doenças e conseqüentemente o planejamento de métodos mais eficazes de controle (FOURÉ, 1994).

A ocorrência de Sigatoka-amarela no campo está relacionada, principalmente, a três variáveis do clima. A chuva, o orvalho e a temperatura, fundamentais para a ocorrência da infecção, produção e disseminação do inóculo (CORDEIRO; MATOS; MEISSNER-FILHO, 2004).

A contribuição de conídios e ascósporos para o inóculo total e o padrão de infecção são bem conhecidos.

A porcentagem de pseudotécios produzidos varia ao longo do ano (STOVER, 1964). Em condições ótimas de temperatura, chuvas rigorosas e muitas infecções, os ascósporos de *M. musicola* se tornam maduros 4 semanas após o estágio de estria (STOVER, 1980). Os pseudotécios são produzidos durante períodos quentes e úmidos, e seus ascósporos se ejetam do interior dos ascos em resposta à umectação do pseudotécio (AGRIOS, 2005).

Tecidos infectados contendo ascósporos maduros, quando molhados pela chuva levam 10 minutos para iniciar a descarga de esporos, completando-a em 2 horas. Um padrão de liberação diurno é notado, dependendo da chuva e da umidade total (STOVER, 1964).

Rocha (2008) relatou a correlação entre a concentração de ascósporos com a severidade da doença após 29 dias de contagens em campo. A liberação desse tipo de esporo ocorre de forma predominante no início da manhã enquanto que conídios só são verificados após o escoamento do orvalho sobre as folhas.

Os ascósporos sobrevivem por 8 semanas à sombra, dormentes no tecido de folhas caídas. Esse tempo de sobrevivência nas folhas a sombra depende da taxa de decomposição. Folhas no solo sujeitas a chuvas intermitentes, orvalho, e a secagem contínua ou parcial durante o dia provoca declínio na quantidade de ascósporos em até 4 semanas. Apenas um grupo de ascósporos é produzido por pseudotécios, indicando que esses continuam a amadurecer no chão depois que as folhas são cortadas (STOVER, 1980).

Os conidióforos aparecem como manchas, evoluindo para lesões distribuídas abundantemente em ambas as superfícies das folhas, na forma de fascículos densos e escuros no estroma (esporodóquios). Caracterizados morfológicamente como retos, hialinos, a maioria sem septos, curvados ou ramificados, sem cicatrizes de esporos. Os conídios são cilíndricos na sua maioria, ocasionalmente obclavados, com 1 a 5 septos; mesma espessura em todo seu comprimento, sem hilo basal distinto (STOVER, 1980).

Rocha (2008) observou que as maiores quantidades de conídios foram vistas a partir das 7 h, com picos às 8 h da manhã. Esses resultados indicam que é necessário um filete de água na superfície das folhas para que os esporos sejam liberados. A liberação dos ascósporos se dá momentos depois da formação de água livre, enquanto que a liberação dos conídios depende da permanência dessa água livre por um maior período de tempo sobre as folhas.

Segundo Agrios (2005), os conídios são disseminados pelo vento e gotas ou *sprays* de água, sendo que sua liberação e germinação são dependentes da umidade presente nas folhas da planta, seja ela originada em condições chuvosas, ou simplesmente pela ocorrência de orvalho.

Para Stover (1970), em períodos de estiagem o esporo assexuado é o principal inóculo, com o orvalho se mostrando mais eficiente do que a chuva no acréscimo e permanência da doença em plantas de banana.

Uma maior produção de conídios pode ser vista na face superior das folhas da bananeira, se iniciando quando as lesões causadas por *M. musicola* mudam sua coloração de marrom claro para marrom escuro ou preto. Ocorre em noites sucessivas mesmo na ausência de chuvas, desde que haja presença de orvalho, cessando ou diminuindo drasticamente quando o centro da lesão se torna cinza, depois que um máximo de 12 grupos de conídios é produzido. As plantas jovens infectadas apresentam em média 5,3 grupos de conídios por lesão (STOVER, 1970).

Em áreas onde há a ocorrência de infecção em massa, ocorrem necroses em massa ("queima" da folha) e a produção de conídios é reduzida em 50%. Conídios maduros soltam-se facilmente dos esporodóquios com a presença de água livre (STOVER, 1970).

Nas condições de Coronel Pacheco – MG, Rocha (2008) observou que a concentração de ascósporos foi superior a de conídios em todas as avaliações da

Sigatoka-amarela. As armadilhas de esporos localizadas entre as plantas foi mais eficiente para quantificar ascósporos. Tanto na estação chuvosa como na época mais seca do ano, as maiores concentrações de ascósporos ocorreram durante as primeiras horas do dia, o que pode estar relacionado à alta umidade provocada pelo orvalho em folhas nas primeiras horas da manhã.

Ao avaliar a reação de genótipos de bananeira à Sigatoka-amarela, de setembro de 1996 a maio de 1997, observou-se que a doença era favorecida quando predominava condições de alta umidade relativa, precipitação pluvial de intensidade variável e temperatura média acima de 21 °C, com amplitude variando de 22,3 °C a 25 °C (MATOS, 2001).

Rocha (2008) aponta para os inúmeros relatos na literatura de uma relação direta entre a formação, distribuição e germinação de conídios e ascósporos e a presença de água livre nas folhas das plantas, o que resulta em epidemias de Sigatoka-amarela. Diante disso torna-se importante estar atento para a curva de progresso da doença e fatores climatológicos, principalmente previsão de chuva (FERREIRA; COERDEIRO; MATOS, 2003).

As condições de luminosidade também são importantes para o desenvolvimento da doença no campo. A literatura fornece indícios de que plantas sobre sistemas de sombreamento apresentam baixa severidade. Em estudos recentes foi observado que a esporulação de *M. fijiensis* apresentou diferenças quando submetidas a diferentes tipos de luz e do padrão de vedação adotado para as placas de Petri utilizadas no experimento. A esporulação foi significativamente maior sob luz negra do que sob luz branca. Relatos sobre a indução de esporulação utilizando luz mostraram que aquelas com comprimento de onda entre 300 a 380 nm (próximas ao UV) induzem melhor a esporulação que aqueles entre 200 e 300 nm (distante do UV). Consequentemente, luz negra é melhor que a luz branca para induzir a esporulação de isolados de *M. fijiensis*. O número de colônias também foi significativamente maior sob luz negra do que sob luz branca (ETEBU et al, 2005).

Albuquerque (1993) observou que um regime de luz contínua proporciona uma maior esporulação. Há uma superioridade na produção de conídios sob luz alternada, embora não tenha havido diferença significativa entre esse regime de luz e o regime de escuro contínuo (ALBUQUERQUE, 1993).

Condições de cultivo, como composição do meio, aeração e luz, são os fatores mais importantes que afetam a produção de fitotoxinas segundo Stierle et al (1992, apud PUCH-CEH et al, 2005). Lepoivre et al, (2003) estudando interações da banana com *M. fijiensis* perceberam que a produção de toxinas está associado à presença de luz.

Radiação ultravioleta também interfere na produção de inóculo de fungos fitopatogênicos nas palavras de Parnell et al (1998, apud JONES, 2002). Esse fator é limitante à produção de ascósporos de *M. musicola*, pois mata esse tipo de esporo (JONES, 2002).

2.5 Variabilidade genética do Patógeno

O sudeste da Ásia é o centro de origem dos três patógenos do gênero *Mycosphaerella* que causam doenças na bananeira, bem como do hospedeiro. Estudos mostram que as interações patógeno hospedeiro da doença nessa região diferem com o tipo de fungo, e isso pode ser explicado pela grande diversidade de hospedeiros. Essa área é uma fonte potencial de resistência, portanto, um estudo de populações de patógenos, nos sistemas naturais, deve fornecer informações para complementar a avaliação da importância relativa das diferentes forças evolucionárias (CARLIER et al, 2003).

Molina et al (2003) perceberam diferenças entre isolados de *M. musicola* em propriedades separadas por vales profundos e montanhas altas que funcionam como barreiras geográficas para o fluxo gênico. Isto pode explicar a separação das populações da Colômbia e da Venezuela na árvore de *M. musicola*, apesar das regiões avaliadas estarem localizadas na mesma serra. Há um consenso sobre a extensão da diversidade genética em *Mycosphaerella fijiensis* e *M. musicola*, e as implicações da capacidade dos dois fungos para evoluir. Assim, a diversidade genética deve ser levada em conta na elaboração de estratégias para melhorar a resistência à Sigatoka-amarela em banana.

Mycosphaerella musicola é mais bem adaptada a condições presentes em regiões de maior altitude segundo Carlier et al (2000a, apud JONES, 2002). Em trabalhos realizados na Nigéria, com o híbrido SH – 3362 (AA), resistente a *M. fijiensis* e suscetível a *M. musicola*, mostram que a Sigatoka-amarela provavelmente não desapareceu completamente de áreas dominadas pela Sigatoka-negra.

Nas Filipinas, a presença de *M. musicola* também tem sido relatada, apesar da dominância de *M. fijiensis* em plantações comerciais. A permanência de *M. musicola* nessas regiões pode estar relacionada ao fato da grande diversidade genética de bananas cultivadas nesses países, e conseqüentemente a presença de variedades suscetíveis a Sigatoka-amarela, e resistente à Sigatoka-negra (JONES, 2002).

Diante do fato da Sigatoka-amarela ainda ser uma patologia que provoca consideráveis perdas nos bananais brasileiros, e baseados nas inferências de que a doença ser menos severa em cultivo sob sistemas de sombreamento demonstrar menor, o objetivo desse trabalho foi observar os efeitos da luz sobre o patossistema Sigatoka-amarela bananeira. Foram testadas as hipóteses de que a intensidade luminosa interfere no ciclo de infecção de *Mycosphaerella musicola*; de que Baixos níveis de luminosidade poderiam influenciar a pré-penetração (crescimento micelial, germinação), a colonização ou a produção de esporos; e que o estudo dos parâmetros de pré-penetração e monocíclico sob tais circunstâncias seriam o primeiro passo para elucidar a questão.

CAPÍTULO 1

Crescimento micelial, esporulação, e germinação *in vitro* de *Mycosphaerella musicola* sob diferentes níveis de iluminância

3.1 RESUMO

Santana-Filho. D. M. Crescimento micelial, esporulação e germinação *in vitro* de *Mycosphaerella musicola* sob diferentes níveis de iluminância.

A Sigatoka-amarela é um dos principais problemas fitossanitários da cultura da bananeira. Condições climáticas são frequentemente associadas à severidade da doença. Há informações de que a doença é menos severa sob luminosidade baixa, mas não há estudos detalhados a respeito. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da luz sobre os aspectos do ciclo de vida do agente causal. Na condição *in vitro* foi testada a ação da luz sobre o crescimento micelial, esporulação, e germinação do fungo. Para o crescimento micelial foram transferidas 10 colônias para cada placa de Petri, sendo avaliada 1 placa a cada tempo. O peso fresco foi obtido, em mg, aos 0, 15, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo em função de níveis de iluminância (5383 lx.; 110 lx; 10,2 lx e 2 lx). A esporulação também foi quantificada sob os mesmos níveis de iluminância, com avaliações aos 5, 7, 11, 13 e 14 dias de cultivo. Para a germinação foram preparadas placas contendo o inóculo, e após 11 dias feita uma suspensão de esporos, a qual foi colocada em pequenos recipientes de vidro. Os recipientes de vidro foram acondicionados em mini-sombrites, os quais dosavam a quantidade de luz que incidia sobre os esporos do fungo. A cada 1 h um vidro era retirado do mini-sombrite e a germinação do esporo era paralisado com lactofenol. Os vidros eram conservados na geladeira até o momento da contagem do percentual de esporos germinados em cada frasco. Nesse mesmo tempo eram feitas medidas da iluminância, com o luxímetro, sob as estruturas. Para todos os experimentos foi utilizado meio V8 e incubação em BOD com fotoperíodo de 12 h a 25°C. Os dados não se mostraram significativos para o crescimento micelial. A esporulação foi significativa demonstrando uma relação linear positiva com o logaritmo dos níveis de iluminância. A germinação foi significativa para o efeito da iluminância, com um comportamento exponencial positivo em relação aos níveis de luz.

Palavras chave: *Musa sp.*, *M. musicola*, Ciclo de infecção, Intensidade luminosa.

3.2 ABSTRACT

Santana-Filho. D. M. Mycelial growth, sporulation and germination of *Mycosphaerellamusicola* *in vitro* under different illuminance levels.

The yellow Sigatoka is a major disease of banana plants. Weather conditions are often associated with its severity. There are reports that the disease is less severe under low light levels, but there are no detailed studies about it. The objective of this study was to evaluate the effect of light intensity on aspects of pathogen's life cycle. In laboratory experiments we tested the effect of light intensity on the mycelial growth, sporulation, and germination. For mycelial growth the fresh weight of ten colonies were determined at 0, 15, 21, 28, 35 and 42 days of cultivation, relating it to illuminance levels (5383 lx, 110 lx, 10.2 lx, and 2 lx). Sporulation was also measured under the same illuminance levels, with evaluation at 5, 11, 13 and 14 days of cultivation. For germination spore suspensions were prepared at 11 days of cultivation, and placed in glass containers. The glass containers were placed in shading boxes that controlled the light levels the spores were subjected to. At each hour one glass was removed, the spore germination was stopped with lactophenol, and the percentage of germinated spores was determined. V8 medium was used for all experiments, and the incubations were at 25°C and photoperiod of 12 h. No light effect was detected on mycelial growth. The sporulation was significantly, positively and linearly related to the logarithm of illuminance levels. Germination had a positive exponential relationship with light levels.

Keywords: *Musa* sp., *M. musicola*, Infection cycle, Luminous intensity.

3.3 INTRODUÇÃO

A banana é um importante constituinte da alimentação de populações de baixa renda, tanto pelo alto valor nutritivo, quanto pelo baixo custo. Rica em vitamina C, A e B, muito potássio e pouco sódio (CORDEIRO, 2004). Caracteriza-se como fruta de alto volume de produção (FIORAVANÇO, 2003) e o Brasil é um de seus maiores produtores, assim como Índia, China, Filipinas e Equador (FAO, 2012). Na região Nordeste, a Bahia se destaca com o maior volume produzido (IBGE, 2011).

Apesar do Brasil se destacar na produção de banana, o país ainda enfrenta sérios problemas de manejo, dentre os quais os fitossanitários se destacam. Doenças como o mal-do-Panamá (*Fusarium oxysporum f. sp. cubense*), Sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola*), Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*) e o moko da bananeira (*Ralstonia solanacearum*) se caracterizam como as principais doenças da cultura (CORDEIRO E KIMATI, 2005).

A Sigatoka-amarela alcança grande importância econômica em algumas regiões, apresentando-se como uma das principais doenças da bananicultura (FERNANDES et al, 2006). Ela está presente em todos os pomares brasileiros, causando severas perdas de produtividade nas regiões onde as condições ambientais a favorecem (CORDEIRO; MATOS, 2001; CORDEIRO; MATOS, 2002). O patógeno se adapta bem a áreas mais frias e altitudes acima de 1200 metros (JÁCOME, 2002). É encontrado em todas as regiões que cultivam banana, exceto em Israel, Egito e nas Ilhas Canárias (CORDEIRO; MATOS, 2002).

Não há muitas alternativas ao produtor senão adotar métodos de controle cada vez mais efetivos, ou as perdas de rendimento podem ser superiores a 50%, gerando frutos sem qualidade (ROCHA, 2008). O problema se torna ainda maior quando o micro clima é muito favorável. Os danos chegam a 100% se considerado que os frutos produzidos em áreas sem controle da doença não possuem valor comercial (CORDEIRO, 2004).

A doença caracteriza-se pelo aparecimento de estrias amarelas, verde-amareladas, ou amarelo-pálidas em ambas as superfícies das folhas segundo Klein (1960, apud MEREDITH, 1970).

Nas folhas atacadas pelo patógeno são produzidos dois tipos de frutificação: esporodóquios na fase assexuada, e pseudotécios na fase sexuada do fungo

(STOVER, 1980). Esporodóquios são fascículos densos onde são produzidos os conidióforos, os quais originam mitosporos denominados conídios (AGRIOS, 2005). Os esporos sexuais são produzidos em espermagônios que produzem espermacias e tricogenis segundo Wardlaw (1961, apud CORDEIRO; ROCHA; ARAÚJO, 2011). Quando ocorre a fertilização são formados pseudotécios. Daí, estruturas em forma de sacos, denominadas ascos, bitunicados, surgem na parede celular dos tecidos das folhas contendo 8 meiosporos, chamados de ascósporos, alinhados 2 a 2 (BENNETT; ARNESON, 2003). Conídios e ascósporos têm importância distinta na epidemiologia da Sigatoka-amarela, tendo em vista as diferenças que apresentam quanto à produção, disseminação, longevidade e deposição (CORDEIRO, 1997).

Estudos dos parâmetros de infecção se tornam cada vez mais importantes para entender esse patossistema. Estudos sobre o crescimento micelial e esporulação *in vitro* de *Mycosphaerella musicola*, mostrou que as condições mais propícias para o crescimento micelial foi o meio de cultura BDA com pH ajustado para 4,5 e para a esporulação o meio BDA com pH ajustado para 6,5 (ROSA; MENEZES, 2001). Araújo et al (2011) obtiveram resultados semelhantes quando avaliaram o diâmetro micelial em diferentes meios de cultura, porém a esporulação se mostrou mais eficiente em meio de cultura V8-ágar.

Os estudos sobre produção de esporos *in vitro* ainda precisam ser aprofundados. Há uma variação grande na literatura sobre o assunto. De acordo com Abreu (2000), esporulação pode oscilar, iniciando-se aos 3 dias de idade da cultura, aumentando até os 5 dias, com uma ligeira queda aos 7 dias, voltando a aumentar até o décimo primeiro dia, e de novo diminuindo até os treze dias .

Alguns trabalhos com *M. fijiensis* vem mostrando que a luz interfere na esporulação e no número de colônias desse fungo. Foi observado que o número de colônias de *M. fijiensis* é afetado por luz negra quando as placas foram seladas por 21 ou 14 dias (ETEBU et al, 2005). Albuquerque (1993) também observou que um regime de luz contínua proporciona uma maior esporulação. Há uma maior produção de conídios sob luz alternada, embora não tenha havido diferença significativa entre esse regime de luz e o regime de escuro contínuo. Lepoivre et al. (2003), estudando interações da banana com *M. fijiensis*, perceberam que a produção de toxinas está associada à presença de luz. Para Jones (2002), a radiação ultravioleta (UV) é um fator limitante à produção de ascósporos de *M. musico-*

la, pois mata esse tipo de esporo, o que explicaria a baixa esporulação em espectros próximos ao UV.

Observações feitas e relatadas em trabalhos de campo referem-se à baixa severidade da doença em sistemas de plantio de bananeiras sombreadas. Plantas sob esse tipo de sistema apresentam pouca ou nenhuma doença. A explicação para tal fato pode ser a redução ou não formação do orvalho e/ou a redução na incidência de luz (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005). A sombra produzida pelos estratos dominantes atuaria como um importante redutor dos danos ocasionados por *Mycosphaerella musicola* (VIVAN, 2002).

Para trabalhos em campo com a variável luz faz-se necessário a definição da grandeza a ser utilizada. Uma delas é a iluminância, que segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), é o limite da razão do fluxo luminoso recebido pela superfície em torno de um ponto considerado, para a área da superfície quando esta tende para o zero (NBR 5413/1992).

Entende-se por iluminância a quantidade de luz num ambiente, ou, o fluxo luminoso que incide numa determinada área. É a luminosidade incidente, não visível. Não é distribuída uniformemente em todos os pontos de uma determinada área, por isso é frequentemente adotado a iluminância média para determinar se valores adequados para o desempenho de determinadas atividades estão dentro dos padrões da ABNT (BORMANN, 2003).

O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento de parâmetros de pré-penetração do fungo sob diferentes níveis de iluminância. A hipótese a ser testada foi a de que maiores intensidades de luz induzem maior crescimento, esporulação e germinação dos conídios do patógeno.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura (Cruz das Almas, Bahia). Foram avaliados os parâmetros crescimento de colônias e esporulação do fungo *Mycosphaerella musicola*, sob diferentes iluminâncias.

Obtenção do isolado

O fungo foi isolado de folhas de bananeira 'Pacovan' que apresentavam sintomas característicos de Sigatoka-amarela. As coletas foram feitas em junho de 2010, na localidade de Laranjeiras (Muritiba, Bahia). O isolado foi obtido pelo método direto, pelo qual as folhas são lavadas em água da torneira utilizando-se uma esponja macia e detergente para retirada do excesso de sujeira, e depois cortadas em tamanho compatível para acomodação em câmara úmida em placas de Petri. Após 48 horas as placas foram levadas a uma lupa para observação dos esporodóquios. Com o auxílio de pinça os esporos foram retirados dessas estruturas e colocados em meio de cultura ágar-água a 2%. As placas foram observadas por 5 a 10 dias e, ao se constatar crescimento micelial, fazia-se a transferência para placas contendo meio malte.

Indução da esporulação

Colônias do isolado obtido, quando atingiram a coloração cinza, foram retiradas das placas de Petri, com auxílio de um estilete, e colocadas num almofariz, onde foram umedecidas e maceradas com pistilo até que se tornassem uma massa pastosa de aspecto uniforme e sem a presença de grumos. Obtendo-se a massa, adicionou-se água estéril suficiente para preparar o volume de suspensão desejado. Placas de Petri contendo meio V8 (200 ml/L suco industrializado V8, 2 g/L carbonato de cálcio, 18 g/L ágar) foram semeadas com 700 µL de suspensão de inóculo. O inóculo foi espalhado nas placas com a ajuda de uma alça de Drigalsk. As placas foram conservadas em estufas tipo B.O.D. a 25° C sob regime de 12 h de luz e 12 h de escuro.

Efeito da iluminância sobre o crescimento micelial *in vitro* de *Mycosphaerella musicola*

Para o experimento foram preparadas 36 placas com meio de cultura V8, onde foram colocadas 10 colônias de *Mycosphaerella musicola* por placa, selecionadas com maior uniformidade possível. Os tratamentos foram quatro níveis de iluminância 5383 Lux; 110 Lux; 10,2 Lux; 2 Lux. No tempo zero (testemunha) um total de 80 colônias, 2 placas por tratamento, foram pesadas com balança de precisão obtendo-se o peso fresco. A média do peso fresco de todos os tratamentos originou o dado para esse tempo. As outras avaliações foram feitas nos tempos

15, 21, 28, 36 e 42 dias de cultivo do fungo. Nessa ocasião, era retirada uma placa de cada tratamento, e logo em seguida as 10 colônias eram pesadas com o auxílio de uma balança de precisão. Avaliou-se o peso das colônias em quatro níveis de iluminância, sob temperatura de 25° C e fotoperíodo de 12 horas de luminosidade. A iluminância foi obtida através do luxímetro.

Efeito da iluminância sobre a esporulação *in vitro* de *Mycosphaerella musicola*

O experimento consistiu de 4 tratamentos com 3 repetições cada, sendo cada placa uma repetição. Os tratamentos foram diferentes iluminâncias (3380, 250, 30 e 1 lux) incidindo em fotoperíodo de 12h sobre as placas. Os níveis de luz foram obtidos colocando-se as placas sob caixas fabricadas com diferentes tipos de malha sombrite. As avaliações foram feitas aos 5, 7, 11, 13 e 14 dias após a suspensão ser semeada. As suspensões foram preparadas submergindo o crescimento fúngico em 10 ml de água estéril por 10 minutos, esfregando-se o material com escova de dente para liberação dos esporos e filtrando a seguir em gaze. Com uso de pipeta Paster foram preparadas duas lâminas em câmaras de Neubauer para cada tratamento e em seguida foram levadas ao microscópio óptico estereoscópico para contagem do número de esporos/ml, sendo contados sempre os dois campos da mesma, perfazendo um total de quatro campos observados.

Efeito da iluminância sobre a germinação *in vitro* de *Mycosphaerella musicola*

Neste experimento, foram preparadas placas contendo o inóculo de *M. musicola* que em seguida foram acondicionadas em BOD por 11 dias a 25° C e regime luminoso de 12 h. No 11º dia, suspensões de esporos foram preparadas adicionando-se 5 ml de água destilada, com Tween 20, a cada placa com inóculo, deixando o sistema descansar por 10 a 20 minutos para a liberação dos esporos. Em seguida foi feita uma raspagem das colônias na tentativa de obter o máximo de esporos. As placas foram vertidas em um béquer para uniformizar a suspensão obtida, em seguida, procedeu-se a filtragem da suspensão obtida, com subsequente retirada de alíquota de 5 ml de suspensão e colocadas em frascos tipo penicilina. Os frascos foram colocados em versões de telados em miniatura produzidos com telas do tipo clarite, sombrite 25%, sombrite 50%, sombrite 75%, e

uma estrutura coberta com 3 camadas de sombrite 75%. Nessas réplicas foram colocados 6 frascos por estrutura, com total de 30 frascos de vidro contendo a suspensão de esporos. A cada 1 hora 1 frasco de cada tratamento era retirado e levado ao laboratório para paralisar a germinação do fungo através do lactofenol, nesse mesmo momento em que os frascos eram retirados avaliava-se a iluminância incidente nos frascos mantidos sob as miniatura realizando-se 20 medidas com luxímetro. Os vidros foram acondicionados na geladeira até serem levados ao microscópio para avaliar o número de esporos germinados em função dos níveis de iluminância testados. Para a contagem foram preparadas 4 lâminas por frasco, as quais foram levadas ao microscópio estereoscópico para a contagem dos esporos germinados. O percentual de esporos germinados era obtido da contagem de 100 esporos.

Estatística

Os dados foram analisados por regressão linear simples, por se tratar de um modelo de regressão no qual se procura prever o valor de uma variável dependente (Y) a partir de uma variável independente ou preditora (X), pressupondo-se que elas assumam um modelo linear. Para tal análise foi utilizado o programa BioStat 5.0. Nos três casos, tanto para crescimento das colônias como para a esporulação e germinação do fungo, a variável independente foi a iluminância. Para o crescimento das colônias os tratamentos consistiram de 5383 lx, 110 lx, 10,2 lx, 2 lx; para a esporulação 3380 lx, 250 lx, 30 lx e 1 lx; e para germinação 4.181,20 lx; 24.672,67 lx; 27.327,49 lx; 44.373,45 lx; 58.975,52 lx. A variável dependente para cada caso foi o peso das colônias em mg, o número de esporos/ml, e o percentual de germinação dos esporos, respectivamente. Para a variável esporulação os dados ainda passaram por uma transformação logarítmica por se tratar de dados multiplicativos.

3.5 RESULTADOS

Crescimento das colônias

Para a variável resposta crescimento micelial a análise de regressão linear foi significativa ($p=0,039$), para o cultivo sob uma iluminância média de 10,2 lx. Os demais tratamentos não foram significativos para essa variável. Ao realizar a re-

gressão linear para os dados de crescimento em função do tratamento 10,2 lx para os dias de cultivo foi observado que o crescimento nesse tratamento é linear.

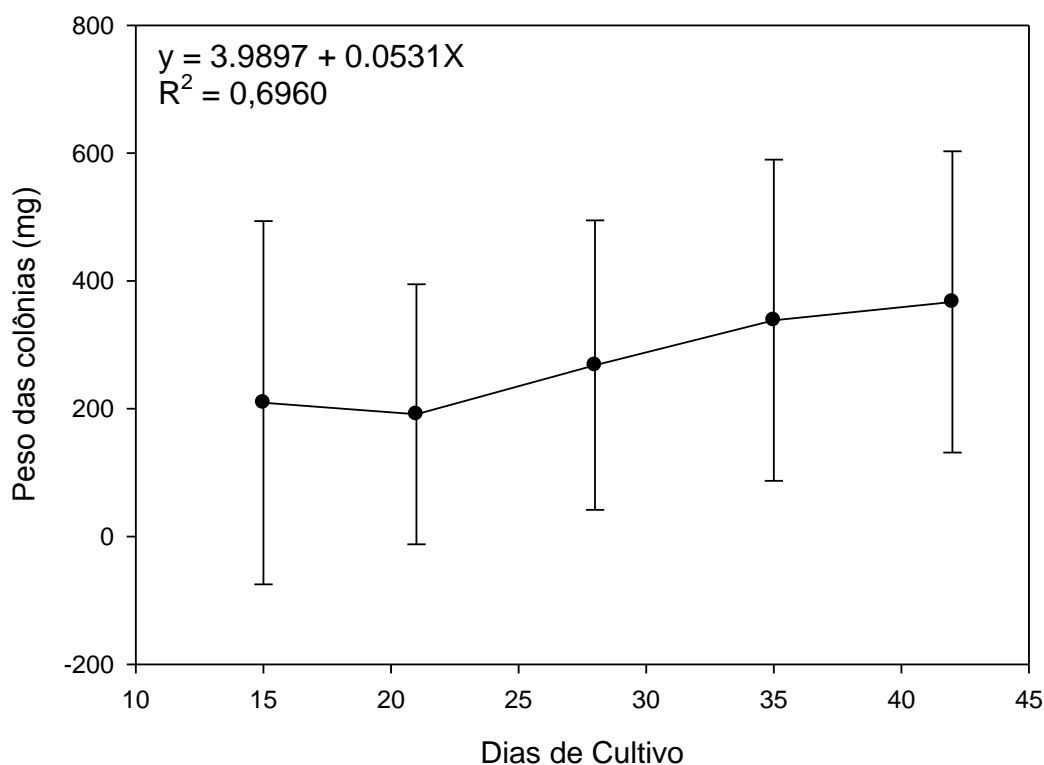


Figura 01. Peso das colônias de *Mycosphaerella musicola*, em miligramas, em função de 15, 21, 28, 35 e 42 dias de cultivo sob iluminação de 10,2 lux. A equação foi obtida através do modelo de regressão linear utilizando o programa BioStat 5.0.

Observou-se que 69,60% ($r^2 = 0.6960$) do crescimento das colônias pode ser explicado pela presença de 10,2 lx de iluminação, podendo-se fazer a estimativa desse crescimento com a equação $Y' = 3.9897 + 0.0531X$, como mostra a figura 01. Porém, a regressão para peso em função de diferentes níveis de iluminação não apresentou evidências de que a intensidade luminosa afeta o crescimento das colônias, qualquer que tenha sido o dia de avaliação.

Esporulação

Para a variável esporulação, a análise de regressão linear foi significativa ($p=0,0127$), para os tratamentos testados. Os diferentes níveis de iluminância interferem na esporulação do patógeno. Esse efeito pode ser observado através da equação $Y' = 0.6320 + 0.1343X$, sendo que 96,83% ($r^2=0,9683$) da esporulação pode ser explicado pelos diferentes níveis de iluminância. A figura 02 mostra que a esporulação aumenta quando o nível de luz aumenta, obtendo-se nesse

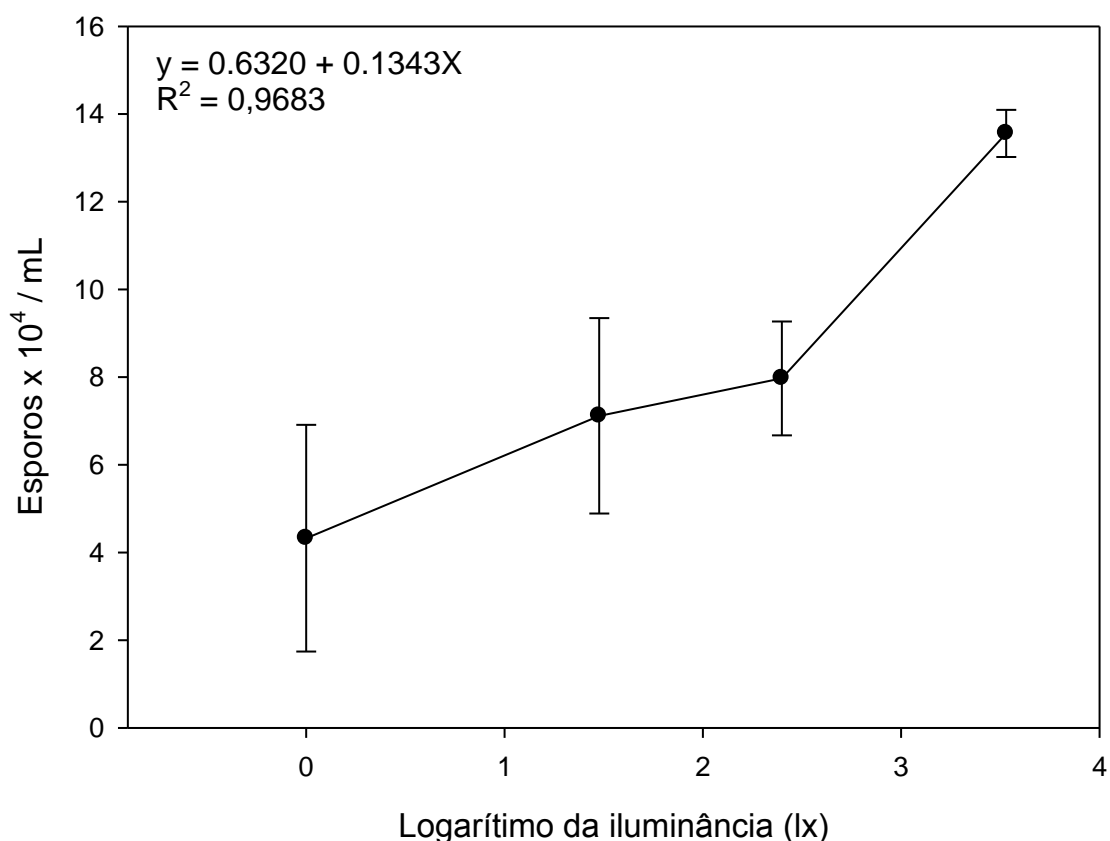


Figura 02. Número de esporos por mililitro de suspensão de esporos preparada com o fungo *Mycosphaerella musicola* cultivado em placas de petri sob iluminâncias de 3380 lx, 250 lx, 30 lx e 1 lx. Os dados sofreram uma transformação logarítmica por se tratar de dados multiplicativos, obtendo-se $\text{Log } 3380 \text{ lx} = 3.53$, $\text{Log } 250 \text{ lx} = 2.40$, $\text{Log } 30 \text{ lx} = 1.48$, $\text{Log } 1 \text{ lx} = 0.00$. A equação foi obtida através do modelo de regressão linear utilizando o programa BioStat 5.0.

experimento médias de $13,559 \times 10^4$ esporos/ml de suspensão para uma iluminância média de 3480 lx; $7,971 \times 10^4$ esporos/ml em 250 lx; $7,117 \times 10^4$ espo-

ros/ml em 30 lx; e 4.325×10^4 esporos/ml quando a iluminância foi igual a 1 lx. Observando-se o desvio padrão das médias, percebe-se que 3380 lx é a melhor iluminância para produção de esporos, sendo esse tratamento significativamente diferente dos demais. O tratamento 250 lx foi significativamente diferente do tratamento 1 lx, porém não houve diferença significativa entre os tratamentos 30 lx e 250 lx.

Germinação

Para a variável germinação em função dos níveis de iluminância a regressão não linear foi significativa ao nível de 5%. Com o coeficiente de regressão ($r^2 = 0,971$)

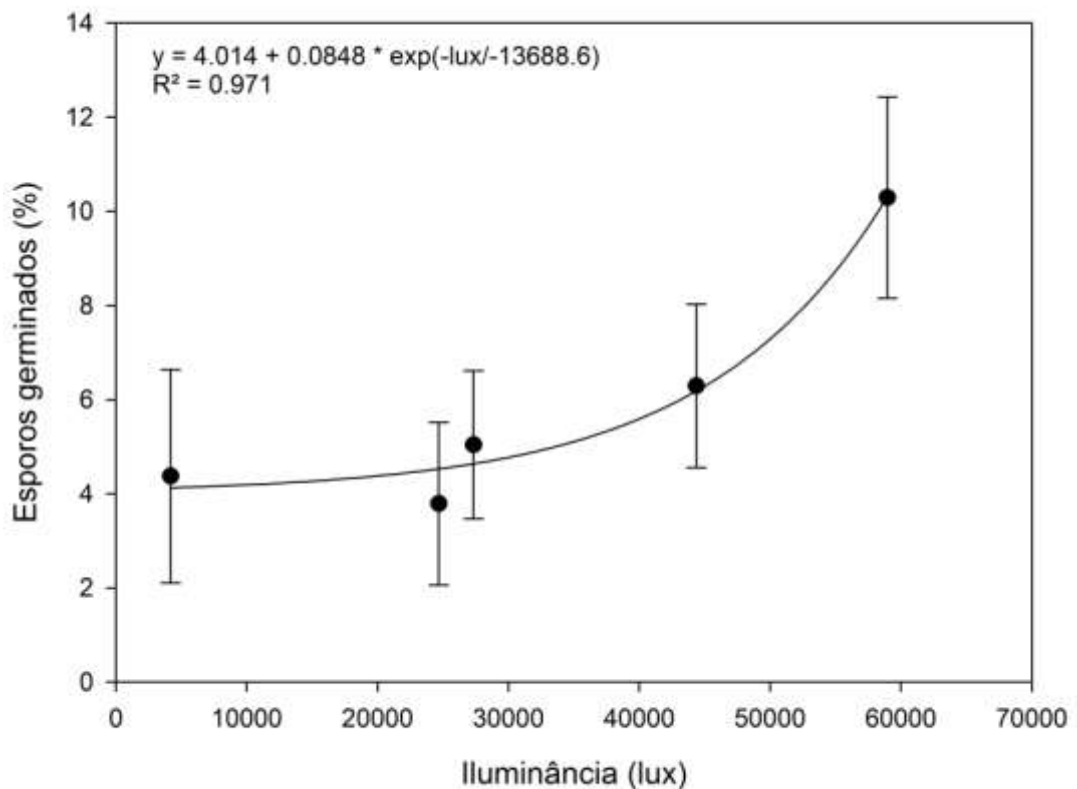


Figura 03. Percentual de esporos germinados *in vitro* de *Mycosphaerella musicola* sob níveis de iluminância de 4.181,20 lx; 24.672,67 lx; 27.327,49 lx; 44.373,49 lx e 58.975,52 lx. O gráfico apresenta equação do modelo obtido através de uma função exponencial de três parâmetros, ajustado por regressão não-linear usando o programa TableCurve 2D v5.01.

é possível inferir que há uma relação exponencial entre as variáveis, e o efeito positivo da variável sobre a germinação pode ser verificado pela equação $Y = 4.014 + 0,0848 \cdot \exp.(-lux/-13688,6)$. A figura 03 mostra um maior percentual de germinação quando a suspensão de esporos é mantida em condições onde a iluminância média é 58.975.53 lx, com intervalo de confiança de 95%. Pode ser observado também que o percentual de germinação em 6 h gira em torno de 10%, demonstrando que a germinação do fungo pode levar mais tempo que o testado nesse experimento.

3.6 DISCUSSÃO

Crescimento das colônias

Os resultados obtidos não apontaram qualquer evidência de que o crescimento em massa de colônias de *Mycosphaerella musicola* seja afetado por níveis de iluminância. Nossos resultados, contrariam os obtidos por Montarroyos et al. (2007), que avaliando o crescimento radial das colônias de *Mycosphaerella musicola* obtiveram melhores resultados em cultivos mantidos num regime de escuro contínuo, com menores médias foram observadas no regime luminoso claro contínuo. Rosa e Menezes também avaliaram o crescimento micelial, diâmetro em milímetros, de diferentes isolados do fungo em diferentes meios de cultura e pH por 7 dias de incubação com 12 h de luz 12 h de escuro. Leite de coco, BDA e aveia, sob pH 4,5, induziram maior crescimento micelial, com diferenças significativas também para diferentes isolados. No entanto, avaliação de diâmetro das colônias para *M. musicola* não deve ser a melhor variável a ser quantificada nesse tipo de trabalho. O agente causal da Sigatoka-amarela apresenta crescimento vertical do micélio e, portanto, a avaliação de sua massa é mais adequada. Pode-se inferir que não há interferência da luz no crescimento micelial do fungo. Estudos mais detalhados sobre a fisiologia do fungo em função da luz podem dar novas diretrizes relacionadas à ação desse fator sobre a variável crescimento micelial, e proporcionar interpretação mais plausíveis sobre a ação do fungo na planta.

Esporulação

Ao contrário do observado para o crescimento das colônias, a iluminância teve efeito significativo na esporulação de *M. musicola*. A maior esporulação ocorre quando uma maior quantidade de luz incide sobre o fungo. As maiores médias foram obtidas onde a iluminância foi maior, por volta do 10º dia após a indução da esporulação.

Esses resultados corroboram com os relatos de Hanada, Gasparotto e Pereira (2002), em seus estudos sobre esporulação de *M. fijiensis* sob diferentes regimes de luminosidade, tendo verificado que o fungo não esporulou em regime de escuro contínuo. Sepúlveda et al (2009) também observaram que o fotoperíodo tem influência significativa na produção de conídios de *M. fijiensis*. Seus dados mostram uma maior produção de esporos no tratamento com luz contínua, seguido daquele com fotoperíodo de 12 h, e menor esporulação em escuro contínuo. A produção de conídios foi muito baixa ou não existente em condições de escuro.

Os resultados referentes à esporulação do fungo possibilitam inferir que a iluminância interfere na reprodução do fungo. Embora a sobrevivência também possa ser afetada, já que na ausência de tecido suscetível, os esporos do fungo e suas estruturas reprodutivas podem permanecer por alguns dias sobre materiais em decomposição. Logo, sob baixa luminosidade, com uma esporulação reduzida, a ausência de inóculo poderá interferir nesse parâmetro do ciclo de vida do fungo. Com isso, a disseminação do fungo também é reduzida, diminuindo assim a probabilidade de infecções em plantas. O ciclo secundário da doença fica prejudicado. Os resultados mostram que o número de esporos produzidos é menor em placas com menores níveis de iluminância.

Germinação

Para a variável germinação, a análise estatística mostrou que o modelo mais adequado para a germinação em função da iluminância foi o modelo exponencial de três parâmetros. O baixo percentual de germinação demonstra a necessidade de ajuste da metodologia aplicada no que se refere ao tempo de avaliação da germinação, levando-se em conta que alguns autores colocam que o fungo pode viver em saprofitismo por alguns dias antes de germinar e infectar a planta (ROCHA, 2008). A iluminância interfere na germinação do fungo e compromete a infecção. Observações de plantas em campo levam a hipótese de que

plantas sob sistema de sombreamento apresentam menor número de lesões. Isso pode estar relacionado tanto aos baixos padrões de esporulação, que diminuem as autoinfecções, como ao menor número de estômatos apresentados por plantas aclimatadas nas condições de sombra.

Mais informações sobre a fisiologia desse fungo ou de fungos similares são necessárias para esclarecer o porquê à luz interfere nesse parâmetro de pré-penetração.

CAPÍTULO 2

**Interferência da iluminância nos parâmetros monocíclicos do patossistema
Mycosphaerella musicola – *Musa* spp**

4.1 RESUMO

Santana-Filho, D.M. Interferência da iluminância nos parâmetros monocíclicos do patossistema *Mycosphaerella musicola* – *Musa* spp.

A bananicultura está distribuída em praticamente todo o mundo. Há informações de que a Sigatoka-amarela é menos severa sob luminosidade baixa, mas não há estudos detalhados a respeito. O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese de que a iluminância interfere nos parâmetros monocíclicos do patógeno. As folhas 1 e 2 de mudas micropropagadas da variedade Grande Naine foram inoculadas. Os tratamentos consistiram de mudas no sistema de cultivo ao sol aclimatadas no sol, mudas no sistema de cultivo ao sol aclimatadas na sombra, mudas no sistema de cultivo à sombra aclimatadas ao sol e mudas no sistema de cultivo à sombra aclimatadas à sombra. Foram feitas avaliações diárias durante 60 dias dos períodos de incubação, latência, infeccioso e de desenvolvimento da doença (PDD), e a cada 8 dias da severidade de acordo com escala diagramática. Foi utilizada análise de sobrevivência e regressão logística para avaliação dos dados. A iluminância interferiu no período de incubação, latência, infeccioso, de desenvolvimento da doença, e na severidade de *M. musicola*. As variáveis explanatórias aclimação, sistema de cultivo e tipo de folha apresentam-se significativas a depender do parâmetro avaliado. Porém, a variável condição pós-inoculação foi a que mais demonstrou interferir no ciclo de vida do fungo, com o sombreamento retardando o desenvolvimento do patógeno. O fungo coloniza mais rapidamente plantas em ambientes com maior iluminância em relação aqueles com menor iluminância.

Palavras chave: Banana, luz, infecção.

4.2 ABSTRACT

Santana-Filho, D.M. Interference of illuminance on the parameters of the monocyclic pathosystem *Mycosphaerella musicola* – *Musa spp.*

The banana is almost worldwide produced. There is information that yellow Sigatoka disease is less severe under low light, but there are no detailed studies about it. The objective of this study was to test the hypothesis that illumination interfere with monocyclic parameters of the pathogen. The treatments consisted of Grand Naine seedlings kept in no shading conditions (post-inoculation) but originally grown under shade or not (acclimatizing conditions), and seedlings kept under shade but grown in one of those conditions. Only the leaves 1 and 2 were inoculated. Daily evaluations were performed for 60 days. The incubation period, latency period, infectious period and period of disease development (PDD) were determined for each leaf of each plant. At every 8 days the severity was determined according to a diagrammatic scale. Survival analysis and logistic regression were used to analyze the data. The illuminance affected the incubation period, latency period, infectious period, period of disease development and severity. The explanatory variables acclimatizing conditions, post-inoculation conditions and leaf type were significant depending on the evaluated parameter. It was found the post-inoculation condition interferes with the pathogen cycle and shading conditions slows the pathogen development. The seedlings under sunlight showed symptoms faster than plants under the shade. The fungus colonized faster under higher illuminance conditions than under low illuminance.

Keywords: Banana, light, infection.

4.3 INTRODUÇÃO

Estimativas da FAO (2011) classificam o Brasil como 5º maior produtor mundial de bananas. Com destaque para a região Nordeste, pela sua maior produção, e para a Bahia por ser o estado de maior produção (IBGE, 2011). O baixo custo, aliado ao alto valor nutritivo torna a banana uma cultura de grande importância, principalmente para populações de baixa renda (BORGES; SOUZA, 2004). Seu alto consumo tanto processada como *in natura* torna a bananicultura uma das mais importantes atividades agrícolas do Brasil e do mundo (CORDEIRO; KIMATI, 2005). A fruta se caracteriza por seu alto volume de produção e fácil comércio, o que a torna elemento chave tanto para pequenos como para grandes produtores (FIORAVANÇO, 2003).

Os problemas fitossanitários ainda são o maior obstáculo para o aumento da produtividade da cultura em diversos países do mundo. A Sigatoka-amarela, doença causada por *Mycosphaerella musicola* (CARLIER et al, 1994), tem destaque nos países de clima tropical. Essa doença está distribuída em todo o mundo (MOURICHON, 2002), tendo como hospedeiro várias espécies do gênero *Musa ssp.* (CROUS et al, 2002). No Brasil está presente em todos os pomares, reduzindo a produtividade nas regiões onde as condições ambientais favorecem o seu desenvolvimento (CORDEIRO; MATOS, 2001; CORDEIRO; MATOS, 2002).

A doença caracteriza-se pelo aparecimento de estrias amareladas em ambas as superfícies das folhas (KLEIN, 1960; MEREDITH, 1970). Essas estrias assumem uma coloração marrom e, posteriormente, evoluem para manchas escuras necróticas no estágio mais avançado da doença, quando um halo amarelo, de forma elíptico-alongada é visualizado em torno das lesões (FERNANDES et al, 2006).

Segundo Pereira e Gasparotto (2005), os sintomas aparecem nas folhas 3 a 5 em forma de manchas que assumem o formato piriforme ou de lesões elípticas dispostas entre as nervuras secundárias. Nas folhas onde são formadas tais lesões, ocorre morte prematura do limbo foliar. O patógeno apresenta duas fases reprodutivas: A fase sexuada (teleomórfica), quando são produzidos os ascósporos, e a fase assexuada (anamórfica) quando são produzidos conídios (MEREDITH; FIRMAN, 1970).

As principais formas de disseminação são o vento e água, os quais podem atuar na liberação ou na dispersão dos esporos. Os ascósporos são predominantemente os responsáveis pela dispersão a longas distâncias, contaminando assim plantas saudáveis, e causando as aloinfecções. Os conídios atuam de forma mais intensa a curtas distâncias, com predomínio desse tipo de esporos causando as autoinfecções (AGRIOS, 2005).

A infecção normalmente ocorre através dos estômatos, nas primeiras três folhas novas, embora possa ocorrer penetração na 4ª folha em caso de surto severo da doença (AGRIOS, 2005). Os primeiros sintomas ocorrem 3 a 4 semanas após chegar à superfície de tecidos suscetíveis (HOSS; HELBING; BOCHOW, 2000).

Geralmente são estudados o período de incubação, de latência, de desenvolvimento da doença e a severidade para obter informações sobre a dinâmica da doença em campo. A duração desses períodos varia de acordo com as relações patógeno-hospedeiro, com o estágio de desenvolvimento do hospedeiro, com a umidade e a temperatura do ambiente (AGRIOS, 2005).

O período de incubação tem se mostrado extremamente variável em função do ambiente (MEREDITH, 1970; STOVER; SIMMONDS, 1993; CORDEIRO, 1997). Como o período de incubação, o período de latência também varia de acordo com as condições climáticas, suscetibilidade do hospedeiro, e intensidade de infecções (MARIN, 2003). O ambiente também tem papel importante no período de desenvolvimento da doença (PDD) e na severidade da doença.

A Sigatoka-amarela é uma doença que se caracteriza por sua natureza endêmica, com surtos epidêmicos ao longo do tempo a depender das condições climáticas locais e do manejo adotado. Fatores ambientais afetam o desenvolvimento das lesões causadas por *M. musicola* (FOURÉ, 1994). A ocorrência de Sigatoka-amarela está relacionada, principalmente, a três variáveis do clima, a chuva, o orvalho e a temperatura, que são considerados fundamentais para a ocorrência da infecção, produção e disseminação do inóculo (CORDEIRO et al., 2004).

As condições de luminosidade também parecem interferir no desenvolvimento da doença no campo. Meredith (1970), por exemplo, relata um aumento no período de incubação para infecções ocorridas sob menores intensidades de luz.

Existem indícios de que plantas sobre sistemas de sombreamento apresentam baixa severidade. Isso é observado tanto por pesquisadores como por produtores que trabalham com sistema de plantio sob sombreamento. Plantas sob esse tipo de sistema apresentariam pouca ou nenhuma doença. A explicação para tal fato poderia ser a redução ou não formação do orvalho e/ou a redução na incidência de luz (CORDEIRO et al, 2005). A sombra produzida pelos estratos dominantes atuaria como um importante redutor dos danos ocasionados por *M. musicola* (VIVAN, 2002).

Apesar das observações, a literatura não fornece dados suficientes para entender como a luminosidade interfere no desenvolvimento da doença. Para tanto, primeiro faz-se necessário a definição do fator a ser utilizada.

Nesse trabalho o fator adotado foi a iluminância, que segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), é o limite da razão do fluxo luminoso recebido pela superfície em torno de um ponto considerado, para a área da superfície quando esta tende para o zero (NBR 5413/1992). De forma mais clara, a iluminância pode ser definida como a quantidade de luz num ambiente, ou, o fluxo luminoso que incide numa determinada área. É a luminosidade incidente, não visível (BORMANN, 2003).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a interferência da iluminância em parâmetros monocíclicos da Sigatoka-amarela.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em área experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em Cruz das Almas, Bahia (12°40'39" Sul, 39°40'23" Oeste, e altitude média de 180 m acima do nível do mar).

Produção e acondicionamento das mudas

Foram utilizadas mudas micropropagadas da variedade Grande Naine, fornecidas pela Empresa Campo - Companhia de Promoção Agrícola. As mudas permaneceram desde o enraizamento até o final do experimento sob duas condições, sombra ou pleno sol. Na etapa de enraizamento os frascos contendo os explantes foram transferidos para estufa, onde uma parte dos frascos foi mantida sob a ação direta da luz natural que entrava na estufa e outra parte sob a ação da

luz filtrada por um sombrite de 50%, permanecendo nessas condições por 30 dias. Após o enraizamento as mudas foram transferidas para tubetes e mantidas sob telado por 10 dias. Em seguida os tubetes foram colocados em estufa plástica por 60 dias. As mudas foram então transferidas para sacos plásticos e colocadas em estufa por 30 dias, quando apresentaram tamanho adequado para uso experimental. Em todas essas etapas as condições de sombreamento foram mantidas, ou seja, as plantas permaneceram sob a ação da luz ambiente incidindo direto sobre as plantas ou sob sombrite 50%.

Delineamento Experimental

Foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, caracterizado por sua simplicidade, flexibilidade e alta precisão (FERREIRA, 1996). Em campo as mudas foram dispostas em 4 blocos casualizados, submetidas ao um sistema de cultivo a pleno sol (incidência de luz direta sobre as plantas) e um sistema de cultivo à sombra (incidência de luz indireta, filtrada por sombrite 75%). O experimento consistiu de esquema fatorial 2x2, com 4 tratamentos básicos: Sistema de cultivo ao sol com mudas aclimatizadas no sol, sistema de cultivo ao sol com mudas aclimatizadas na sombra, sistema de cultivo à sombra (sombrite 75%) com mudas aclimatizadas ao sol e sistema de cultivo à sombra com mudas aclimatizadas à sombra. O sombrite foi feito com cobertura fixa, e tela móvel dos lados para que nos momentos de alta temperatura e à noite fosse removida para não haver interferência da temperatura e umidade.

No sistema de cultivo ao sol, foram colocadas 60 plantas inoculadas que foram aclimatizadas em estufa a sol, 60 plantas inoculadas que foram aclimatizadas em estufa a sombra, 40 plantas não inoculadas aclimatadas em estufa a sol, 19 plantas não inoculadas aclimatadas em estufa a sombra. No sistema de cultivo à sombra foram colocadas 60 plantas inoculadas aclimatadas em estufa ao sol, 40 plantas inoculadas aclimatadas em estufa a sombra, 40 plantas não inoculadas aclimatadas em estufa ao sol, 19 plantas não inoculadas aclimatadas em estufa a sombra, perfazendo um total de 338 plantas.

Obtenção do isolado, produção do inóculo e inoculação

O fungo foi isolado das folhas sintomáticas de bananeira Pacovan coletadas em Junho de 2010, no Sítio Nova Esperança, situado na localidade de Laran-

jeiras (Muritiba, Bahia), e depositado na coleção micológica da Embrapa CNPMF sob o código CNPMF 06/10. No laboratório o isolamento foi feito pelo método direto, pelo qual as folhas são lavadas com água de torneira utilizando-se uma esponja macia e detergente para retirada do excesso de sujeira, e depois cortadas em tamanho compatível para acomodação em câmara úmida. Dentro das placas de Petri utilizadas para fazer as câmaras úmidas, foram colocadas folhas de papel de filtro umedecido com água destilada para manutenção de umidade suficiente para garantir a esporulação do patógeno. Após 48 horas as placas foram levadas ao microscópio estereoscópico para observação dos esporodóquios. Com o auxílio de uma pinça os esporos foram retirados dessas estruturas e colocados em meio de cultura ágar-água a 2%. As placas foram observadas por 5 a 10 dias e, ao se constatar crescimento micelial, realizava-se a transferência para placas contendo meio malte.

Quando foram obtidas colônias suficientes com características propícias à esporulação (cor cinza), elas foram retiradas das placas de Petri e transferidas para um almofariz, onde foram umedecidas e maceradas com auxílio de um pistilo até obter-se uma massa pastosa de aspecto uniforme e sem a presença de grumos. Adicionou-se água estéril à massa, suficiente para preparar o volume de suspensão desejado. 700 µl de suspensão de inóculo foram colocados em placas de Petri contendo meio de cultura V8 (200 ml/L suco industrializado V8, 2 g/l carbonato de cálcio, 18 g/l ágar), e espalhados com auxílio de alça de Drigalsk. As placas contendo o isolado foram conservadas em estufas tipo B.O.D. sob condições controladas de temperatura (25°C) e fotoperíodo (regime de 12 h de luz 12 h de escuro).

Uma suspensão de esporos foi preparada adicionando-se 10 ml de água estéril por 10 minutos, para que os esporos se soltassem com maior facilidade, em seguida foi feita uma raspagem do material com escova de dente para liberação dos esporos. A suspensão de esporos foi filtrada para um becker. Em seguida foram preparadas lâminas de Neubauer para contagem e ajuste do número de esporos da suspensão para uma concentração de 4×10^4 conídios/ml. As folhas 1 e 2 das plantas foram então inoculadas na superfície abaxial das folhas, usando atomizador manual, até o escorrimento da suspensão.

Avaliações e análise estatística

No momento da transferência das mudas, do local de aclimatização para a área do experimento, foram feitas impressões digitais das folhas para obtenção da densidade de estômatos (estômatos/tipo de aclimatação) das plantas de cada tratamento. Para isso, foi colocada pequena quantidade de adesivo instantâneo universal nas lâminas e em seguida a área foi encostada rápida e cuidadosamente na superfície das folhas da planta. A densidade estomática foi avaliada fotografando-se as lâminas sob objetiva de 10x em microscópio estereoscópico. As lâminas foram posicionadas numa região em que se observavam claramente os estômatos, e em seguida essas áreas eram fotografadas com câmera digital. As imagens foram transferidas para um computador onde se procedeu as contagens dos estômatos.

No sistema de cultivo adotado, após a inoculação, e a cada 8 dias, cada uma das folhas foi avaliada conforme a escala de Stover (1971) modificada por Gahul (1994), composta por notas que variam de 0 à nota traço (0: sem sintomas; 1: até 10 manchas na folha; 2: entre 1 e 5% do limbo foliar apresentando manchas; 3: entre 6 a 15% do limbo foliar apresentando manchas; 4: entre 16 a 33% do limbo foliar apresentando manchas; 5: entre 34 a 50% do limbo foliar apresentando manchas; 6: acima de 50% do limbo foliar apresentando manchas; Traço: folha totalmente necrosada, ainda retida junto ao pseudocaule) (ROCHA, 2008).

As folhas 1 e 2 de cada planta foram avaliadas diariamente, anotando-se as seguintes variáveis: dias até o aparecimento da primeira lesão (período de incubação), dias até o aparecimento da primeira lesão esporulada (período de latência), dias até o aparecimento de 10 lesões esporuladas (período de desenvolvimento da doença, PDD), dias até que a folha chegasse à nota 4 (severidade), dias até que a folha apresentasse nota traço (necrose). Considerou-se como período infeccioso o tempo decorrido desde a latência até a necrose. Esses parâmetros foram avaliados em função de três variáveis: 1- Aclimatação, que consiste no tipo de condição na qual as mudas foram submetidas desde o enraizamento até estarem aptas a ir para o campo (iluminância em sombrite 50% ou iluminância no sol); 2- Sistema de cultivo, a condição na qual as mudas permaneceram após a inoculação das mudas (iluminância no sistema de cultivo á sombra

e iluminância no sistema de cultivo ao sol); 3- Tipo de folha inoculada (folha1 ou 2, contadas a partir da folha enrolada em formato cilíndrico – folha zero).

Os dados foram avaliados estatisticamente por análise de sobrevivência utilizando o modelo Cox, no programa Statistica Release 7, e por regressão logística, por meio do programa Bioestat 5.0. A análise de sobrevivência, tanto para esse parâmetro como para os outros estudados nesse trabalho, foi feita para modelar o efeito das variáveis independentes (aclimatação, sistema de cultivo e tipo de folha) no tempo em dias até a ocorrência de determinado evento (períodos de incubação, latência, PDD, etc.). A regressão logística foi usada para modelar o risco imposto por aquelas variáveis na ocorrência dos eventos de interesse. Esses dois tipos de análise são especialmente robustos para lidar com dados obtidos em tratamentos com número diferente de repetições. A análise de sobrevivência, além disso, incorpora os dados de repetições perdidas ao longo dos experimentos. As interpretações foram feitas avaliando-se os resultados da odds ratio, que é um teste para proporções dispostas em tabelas de contingências 2 x 2, ou seja, para duas amostras dicotomizadas, mensuradas a nível nominal, o qual calcula a vantagem ou desvantagem de um dos eventos (sucesso) em relação ao outro. E das equações logísticas obtidas pelo modelo, que nesse trabalho, considerou para a condição de no sol tanto para acondicionamento das mudas como para sistema de cultivo, e folhas tipo 1, $X_1=1$ e para a condição de sombra em qualquer das variáveis e folhas tipo 2, $X_1=0$.

4.5 RESULTADOS

A relação iluminância Sombra/Sol foi de 0,258 (Figura 1), com essa variável apresentando valores inferiores a 20% em alguns dias do período avaliado.

Ou seja, a iluminância incidente sobre as plantas no sistema de cultivo à sombra foi em média, aproximadamente 25,8% do total daquela incidente sobre as plantas no sistema de cultivo ao sol. A variação na quantidade de luz incidente num determinado local ao longo do dia foi grande, pois a luz pode ser facilmente bloqueada tanto por objetos como por nuvens, animais, etc.

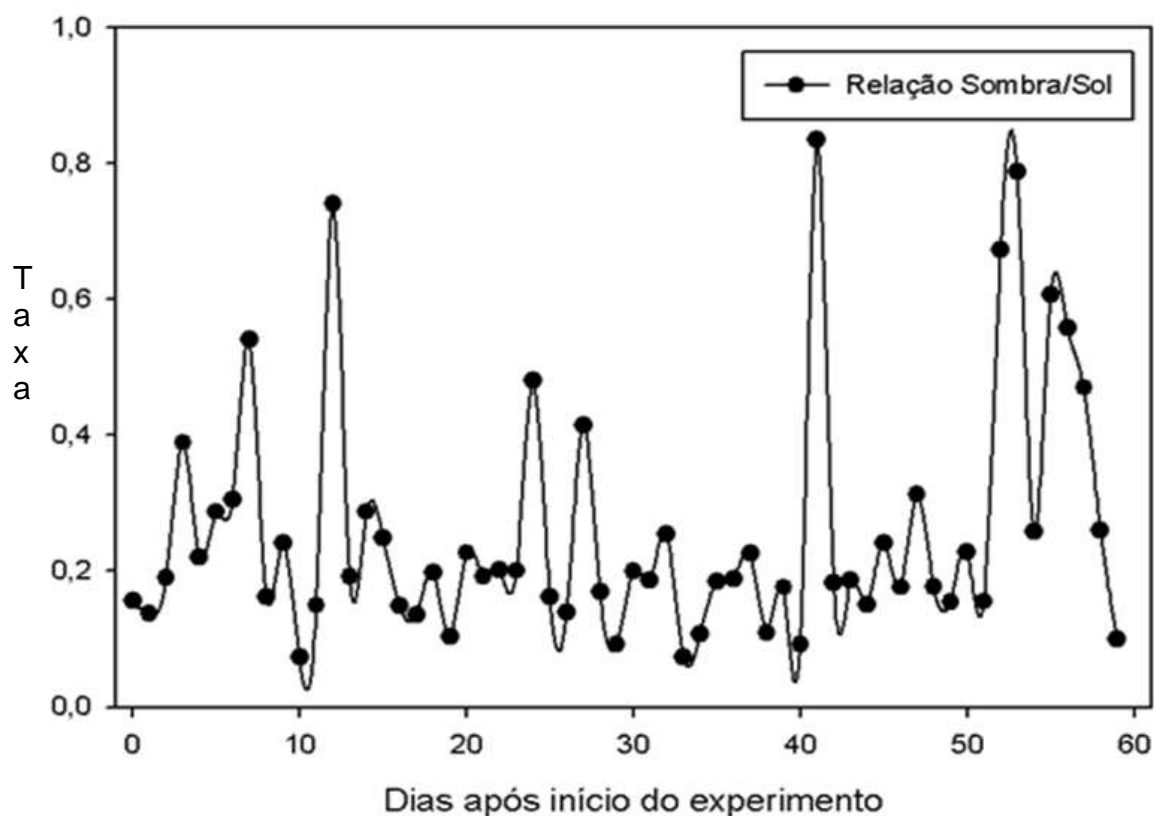


Figura 01. Taxas obtidas da relação entre medidas de iluminância no sistema de cultivo à sombra e ao sol (Sombra / Sol), com auxílio do luxímetro ao longo dos dias após o início do experimento.

Período de incubação

A regressão logística múltipla não foi significativa ($p=0,8520$) para a ocorrência de sintomas (Tabela 02). Isso significa que o risco de aparecimento de sintomas da doença na planta não está relacionado à aclimação, sistema de cultivo ou tipo de folha.

As variáveis aclimação ($p=0,0308$) e sistema de cultivo ($p<0,0001$), foram consideradas significativas para o modelo de sobrevivência de Cox de riscos proporcionais, demonstrando que essas variáveis, exercem efeito sobre o período de incubação de *M. musicola*. A variável tipo de folha ($p=0,1749$) não foi significativa (Tabela 05).

O modelo de Cox de riscos proporcionais, apresentado na tabela 06 desse trabalho, para as variáveis aclimação e sistema de cultivo é descrito pela função de risco $h(t) = h_0(t) \exp. (0,267 * \text{Aclimação} + 0,798 * \text{Sistema de cultivo})$. A análise da função mostra maior efeito do sistema de cultivo sobre o período de incubação do fungo.

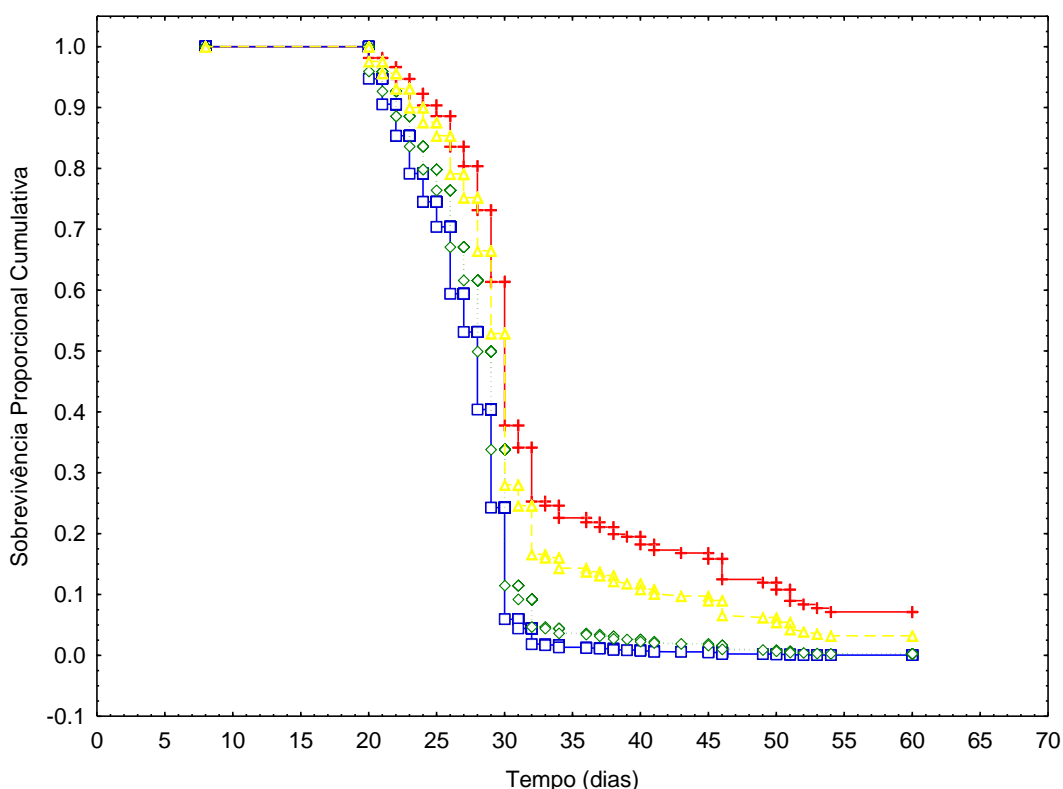


Figura 02. Percentual de plantas que completaram o Período de incubação em função do tempo quando acimatadas na sombra sob sistema de cultivo à sombra (+), quando acimatadas no sol sob sistema de cultivo ao sol (□), quando acimatadas na sombra sob sistema de cultivo ao sol (◇) e quando acimatadas no sol sob sistema de cultivo à sombra (△).

O coeficiente de regressão (β) positivo para ambas as variáveis indica que a exposição ao sol nessas condições em relação à sombra diminui o tempo de incubação do patógeno. Plantas acimatadas ao sol têm 1.3 vezes mais chance de alcançarem o período de incubação que plantas acimatadas na sombra. Já as plantas mantidas no sistema de cultivo ao sol após-inoculação tem 2 vezes mais chance de chegarem ao período de incubação que plantas mantidas na sombra.

Com as curvas Kaplan-Meyer (KM) é possível perceber que plantas acimatadas na sombra e mantidas na sombra apresentam um período de incubação mais longo (figura 02) que para os demais tratamentos. Também pode ser visto que 90% das plantas acimatadas ao sol sob sistema de cultivo ao sol, acimatadas a sombra sob sistema de cultivo ao sol, e acimatadas no sol sob sistema de cultivo à sombra chegaram ao período de incubação antes dos 42 dias. Cerca de

90% das plantas aclimatadas na sombra sob sistema de cultivo à sombra venceram o período de incubação aos 51 dias. Esses resultados podem ser vistos na tabela 04, em anexo nesse trabalho.

Utilizando o modelo para calcular o efeito isolado do sistema de cultivo, observou-se que essa variável foi a mais significativa para o modelo de sobrevivência. As primeiras plantas de sol cumpriram o período de incubação aos 20 dias, enquanto que plantas de sombra o fizeram por volta de 25 dias após a inoculação. As médias para o período de incubação em função das variáveis estudadas nesse trabalho podem ser vistas na tabela 01, em anexo.

Período de Latência

A regressão logística para o período de latência não foi significativa ($p=0,0725$) quando o modelo considerou a ação das três variáveis (aclimação, sistema de cultivo e tipo de folha) em conjunto. Porém, um modelo mais simples, considerando apenas o sistema de cultivo, foi significativo ($p = 0,0299$). O risco de plantas sob sistema de cultivo ao sol apresentarem lesões com esporos é cerca de 4 vezes maior que o das plantas sob sistema de cultivo à sombra (odds ratio = 3,9667). Isso pode ser observado na tabela 03 em anexo. A equação logística obtida através da regressão logística foi $\text{Logit } \pi = 2.3026 + (1.3779 X1)$. Logo foi possível observar que plantas que sob sistema de cultivo ao sol têm 98% de chance de apresentarem lesões com esporos, enquanto que plantas sob sistema de cultivo à sombra tem risco de 91%.

A análise de sobrevivência não foi significativa para tipo de folha ($p=0,087$). Porém, ao contrário da regressão logística, foi altamente significativa para as variáveis aclimação ($p=0,0041$) e sistema de cultivo ($p<0,0001$). O modelo de riscos proporcionais de Cox indica que as variáveis aclimação e sistema de cultivo exercem efeito sobre o período de latência do fungo. A função de risco é dada por $h(t)=h_0(t) \exp. (0,353 * \text{Aclimação} + 0,915 * \text{sistema de cultivo})$. O risco de plantas aclimatadas no sol cumprirem o período de latência é de 1.4 vezes maior em relação a plantas na condição de sombra. Para a variável sistema de cultivo, plantas ao sol apresentam um risco de cumprirem o período de latência 2.5 vezes maior que as plantas à sombra.

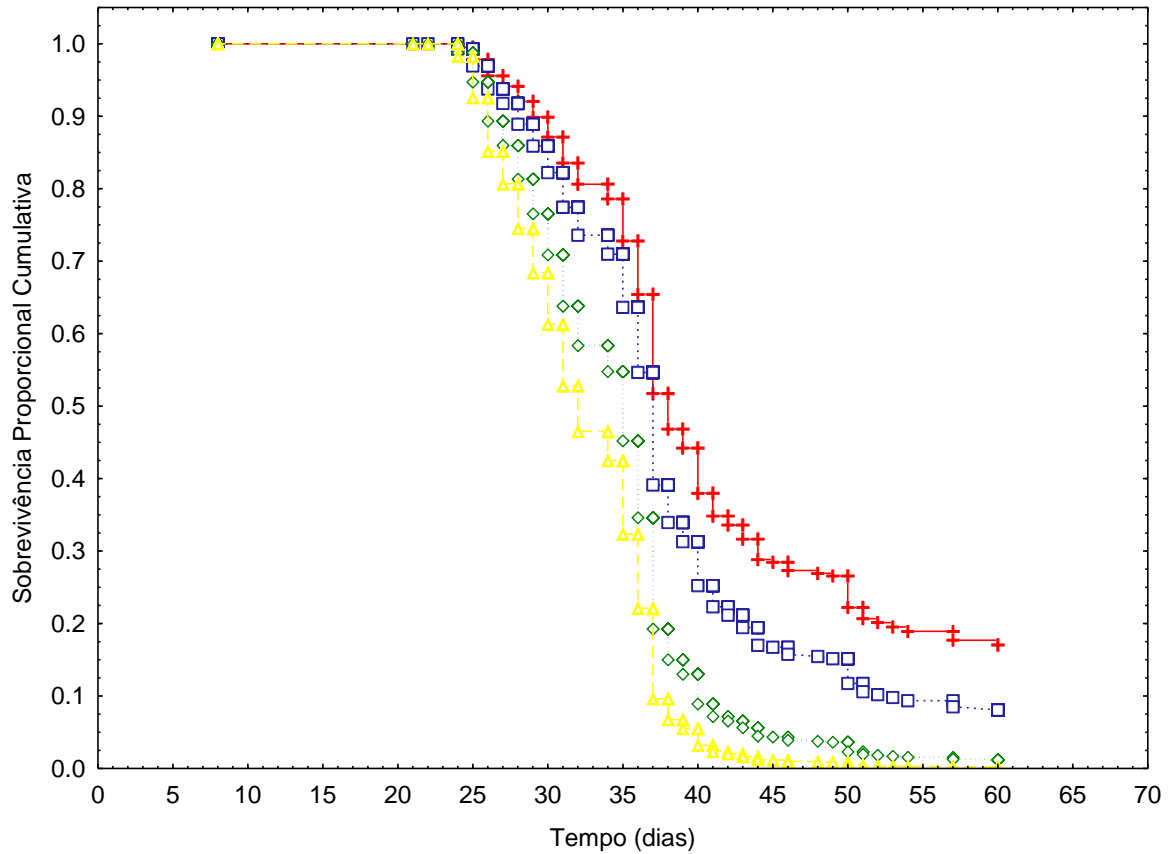


Figura 03. Percentual em função do tempo de plantas que cumpriram o Período de latência quando acimatadas na sombra sob sistema de cultivo à sombra (+), acimatadas no sol sob sistema de cultivo à sombra (□), acimatadas na sombra sob sistema de cultivo ao sol (◇) e acimatadas sob sol no sistema de cultivo ao sol(△).

Observando as KMs (figura 03) foi possível verificar que 50% das plantas acimatadas na sombra sob sistema de cultivo à sombra, apresentaram lesões com esporos aos 38 dias. Nessa mesma condição, ao fim dos 60 dias de avaliação cerca de 80% das plantas apresentaram o evento.

As plantas acimatadas no sol e mantidas sob sistema de cultivo à sombra venceram o período de latência aos 37 dias, plantas acimatadas à sombra sob sistema de cultivo ao sol 35 dias, e plantas acimatadas no sol sob sistema de cultivo ao sol 32 dias. No final do experimento mais de 90% das plantas mantidas nessas três condições apresentaram folhas com lesões esporuladas.

Usando o modelo para calcular o efeito isolado do sistema de cultivo verificou-se que as primeiras plantas ao sol a apresentam lesões esporuladas aos 24 dias enquanto que plantas à sombra o fazem após os 30 dias.

A diferença de resultados entre os dois tipos de análise estatística é explicada pelo fato da regressão logística determinar a relação existente entre a ocorrência de um fato (lesões esporuladas, por exemplo) ao final do experimento e as variáveis independentes. No caso do período de latência, o que ocorre é um aumento do período em função das variáveis independentes. Desse modo, é possível verificar a diferença entre as variáveis testadas com a análise de sobrevivência, porque essa análise avalia os dias até que o evento de interesse aconteça.

Período de desenvolvimento da doença (PDD)

A regressão logística dos dados de PDD foi significativa para aclimação e tipo de folha ($p = 0,0531$). O risco das plantas completarem o período de desenvolvimento das lesões foi cerca de 2 vezes maior quando as plantas foram expostas ao sol durante a aclimação das mudas (odds ratio = 1,7470).

Com a equação logística, $\text{Logit } \pi = 2.9122 + (0.5579 X1) - (0.693 X2)$, foi possível estimar que há 97% de chance das plantas aclimatadas no sol completarem o período de desenvolvimento da doença em folhas do tipo 1 e 94% de chance em folhas tipo 2. Para plantas aclimatadas na sombra, a estimativa é de que há 95% de chance de folhas do tipo 1 completem o período de desenvolvimento da lesão e 90% para folhas do tipo 2.

A análise de sobrevivência foi significativa para todas as variáveis (aclimação, $p=0,0144$; sistema de cultivo, $p<0,0001$; e tipo de folha, $p=0,0485$). O modelo de riscos proporcionais de Cox demonstrou que todas as variáveis explanatórias exercem efeito sobre o período até a ocorrência de 10 lesões esporuladas (PDD). A função de risco é dada por $h(t) = h_0(t) \exp. (0,300 * \text{Aclimação} + 0,881 * \text{sistema de cultivo} + 0,234 * \text{Tipo de folha})$.

A probabilidade de ocorrência desse evento, para mudas que foram aclimatadas no sol é 1.35 vezes maior que aquelas aclimatadas na sombra. Para a variável sistema de cultivo o risco de plantas ao sol apresentar PDD é 2.5 vezes maior que plantas à sombra.

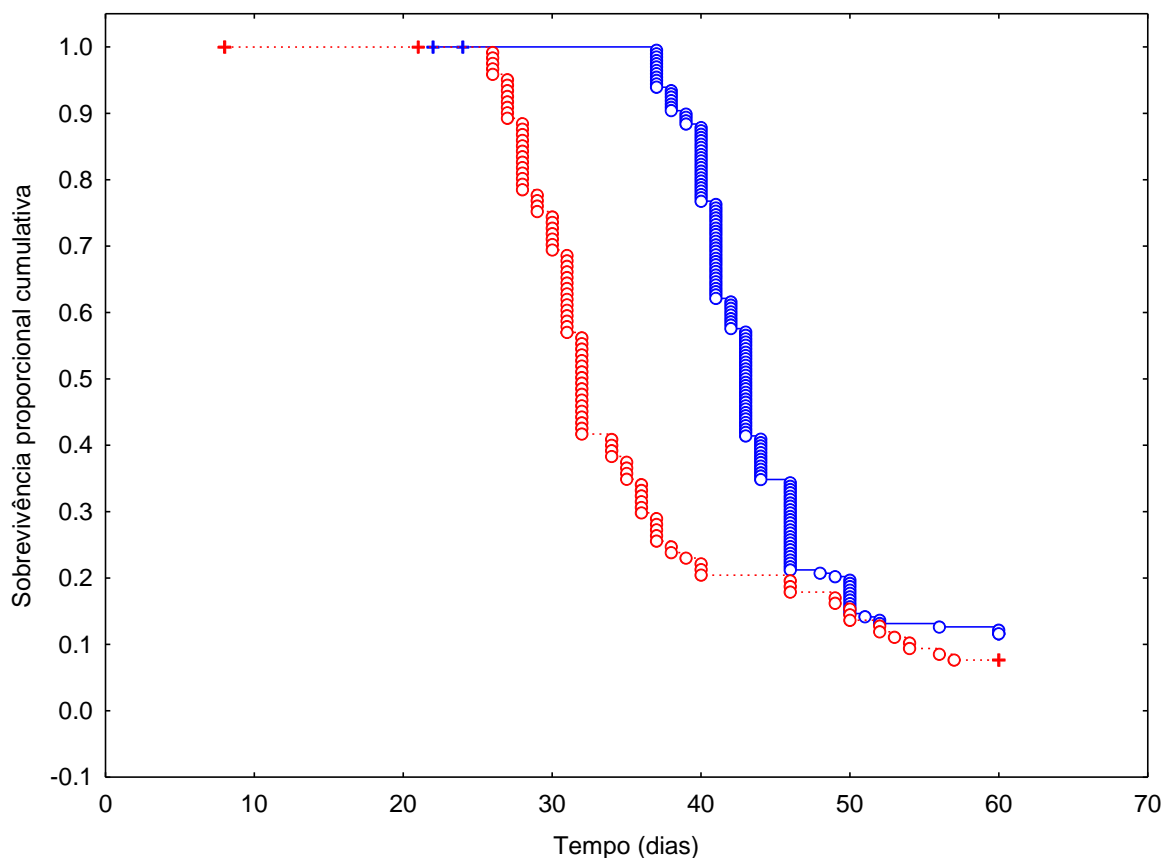


Figura 04. Curvas Kaplan-Meier mostrando o percentual de plantas que apresentaram PDD em função dos dias de avaliação quando no sistema de cultivo à sombra (—) e plantas sob sistema de cultivo ao sol (---). Dados censurados por perda da parcela antes da ocorrência do PDD (+) e dados de plantas que completaram o PDD no período de avaliação (o).

Quanto ao tipo de folha, o valor negativo para o coeficiente de regressão indica que o efeito dessa variável melhora o prognóstico em folhas do tipo 2. Como a análise relaciona folha tipo 1 com folha tipo 2, podemos dizer que folhas do tipo 1 são mais propensas a completar o PDD, com risco aumentado em 79%.

As curvas KMs mostraram que as plantas levaram um tempo maior para completar o período de desenvolvimento das lesões quando foram aclimatadas à sombra, sob sistema de cultivo à sombra em folhas do tipo 2.

Ao final do experimento 90% das plantas sob sistema de cultivo ao sol, não importando a origem, alcançaram o PDD, enquanto que menos de 90% dessas plantas apresentaram PDD quando submetidas ao sistema de cultivo à sombra.

Testando o modelo para a condição sistema de cultivo, percebe-se que as primeiras plantas completam o período de desenvolvimento da lesão por volta de 26 dias quando ao sol, e aos 38 dias quando à sombra (Figura 04).

Severidade - Viabilidade segundo nota 4 (33 % das folhas apresentando lesões) para escala de Stover (1971) modificada por Gauhl (1994)

A regressão logística múltipla mostrou que os dados obtidos para ocorrência de lesões em 33% das folhas (nota 4 da escala de severidade proposta por Stover e modificada por Gauhl-1994) em função do tipo de aclimação, sistema de cultivo, e tipo de folha, foram altamente significativos ($p < 0,0001$). O risco de ocorrência do evento foi cerca de 6 vezes maior para o sistema de cultivo ao sol (odds ratio = 6.0948). A equação logística Logit $P_i = - 0.0527 - (0.269 X_1) + (1.8074 X_2) + (0.3361 X_3)$, mostra que o maior risco de ocorrer lesões em 33% das folhas está associado ao sistema de cultivo ao sol.

A análise de sobrevivência, foi altamente significativa para a variável sistema de cultivo ($p < 0,0001$), porém não-significativa para as variáveis aclimação ($p = 0.53119$) e tipo de folha ($p = 0,5680$). O modelo de riscos proporcionais de Cox demonstrou que apenas a variável explanatória sistema de cultivo exerce efeito sobre a presença de lesões em 33% da área das folhas avaliadas (Viabilidade 4 de Stover). A função de risco é dado por $h(t) = h_0(t) \exp. (1,174 * \text{sistema de cultivo})$. O coeficiente de regressão dessa variável é positivo, indicando que a variável em questão diminui o tempo até a ocorrência do evento.

Com o coeficiente de regressão para a variável explanatória sistema de cultivo foi possível calcular a taxa de risco de ocorrência desse evento, a qual demonstrou que as mudas sob sistema de cultivo ao sol apresentam 3,3 vezes mais chance de apresentar o evento que aquelas sob o sistema de cultivo à sombra.

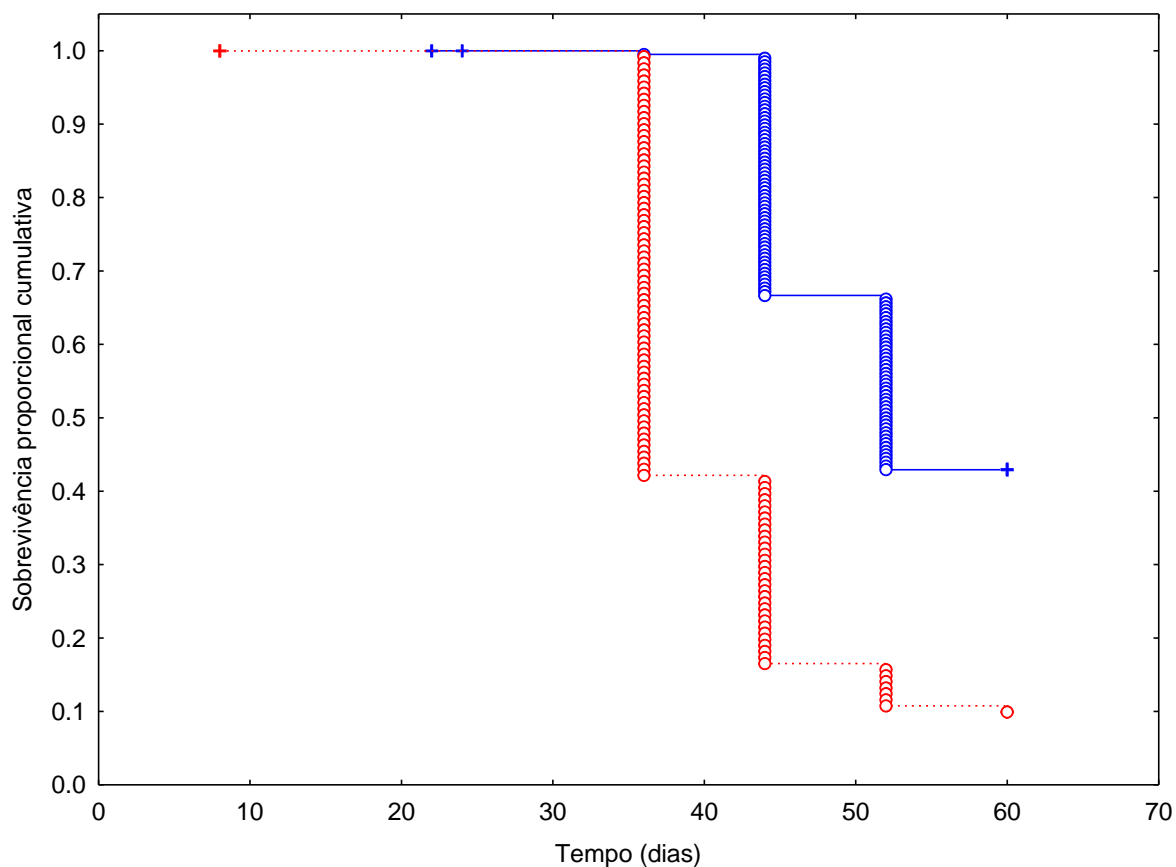


Figura 05. Curvas Kaplan-Meier mostrando o percentual de plantas em função do tempo que apresentaram as folhas com 33% de sua área apresentando lesões quando submetidas ao sistema de cultivo à sombra (—) e plantas sob sistema de cultivo ao sol (- - - -). Dados censurados por perda da parcela antes da ocorrência de lesões em 33% das folhas (+) e dados de plantas que apresentaram folhas com 33% da folha apresentando lesões no período de avaliação (o).

Usando o modelo para testar o efeito da variável sistema de cultivo sobre esse parâmetro, percebeu-se que as curvas KMs (Figura 05), demonstram que o tempo até que as primeiras plantas com folhas apresentando-se com 33% da área foliar lesionada quando plantas são submetidas ao sistema de cultivo ao sol após-inoculação foi cerca de 36 dias, enquanto que plantas sob sistema de cultivo à sombra apresentaram esse sintoma por volta de 44 dias.

Menos de 60% dessas plantas apresentaram esses sintomas para o sistema de cultivo à sombra, por outro lado 90% das plantas cultivadas ao sol apresentaram nota 4 da escala de Stover no final do experimento.



Foto 01. Plantas no sistema de cultivo à sombra aos 60 dias



Foto 02. Plantas no sistema de cultivo ao sol aos 60 dias

Severidade - Viabilidade segundo nota traço (necrose) para escala de Stover (1971) modificada por Gauhl (1994)

Os resultados da regressão logística múltipla foi altamente significativo para as variáveis aclimatação, sistema de cultivo e tipo de folha ($p < 0,0001$), com risco de aparecerem necrose das folhas é foi cerca de 67 vezes maior quando se as plantas foram cultivadas ao sol (odds ratio = 67.3307). Os cálculos de probabilidade, com a equação $P_i = - 3.4691 + (0.0762 X_1) + (4.2096 X_2) + (0.3193 X_3)$, permitiu observar que o risco de ocorrência de necrose foi maior quando as plantas são submetidas ao sistema de cultivo ao sol após-inoculação.

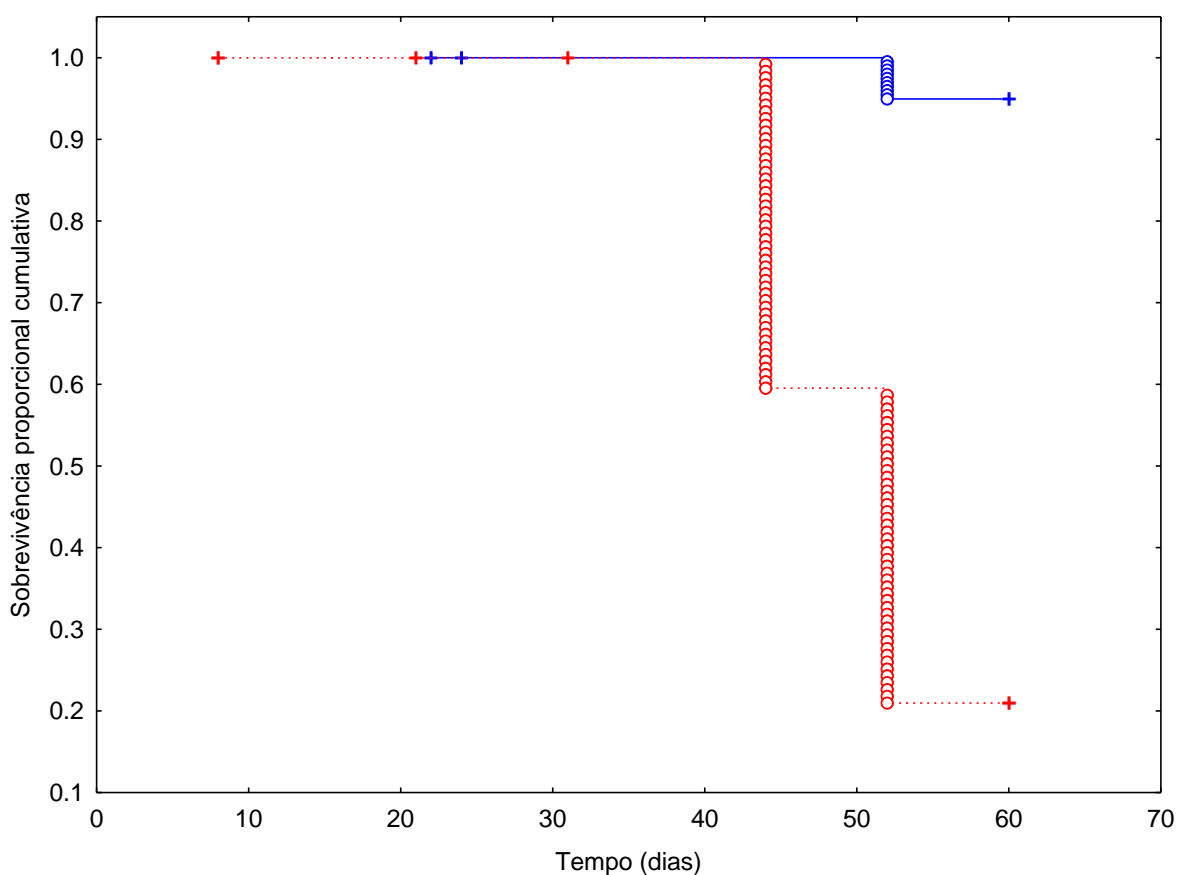


Figura 06. Curvas Kaplan-Meier mostrando o percentual de plantas em função do tempo que apresentaram as folhas necrosadas quando submetidas ao sistema de cultivo à sombra (—) e plantas sob sistema de cultivo ao sol (---). Dados censurados por perda da parcela antes da ocorrência de necrose nas folhas (+) e dados de plantas que apresentaram necrose no período de avaliação (o).

A análise de sobrevivência foi altamente significativa para a variável sistema de cultivo ($p < 0,0001$), porém não significativa para as variáveis aclimação ($p = 0,7944$) e tipo de folha ($p = 0,3344$). O modelo de riscos proporcionais de Cox demonstrou que apenas a variável explanatória sistema de cultivo exerce efeito sobre a presença de folhas totalmente necrosadas ainda presas ao pseudocaule das plantas avaliadas (Viabilidade necrose nota traço de Stover). A função de risco para essa variável explanatória é dada por $h(t) = h_0(t) \exp. (3,056 * \text{sistema de cultivo})$. O coeficiente de regressão positivo indica que a variável em questão diminui o tempo até o aparecimento dos sintomas. Com o coeficiente de regressão foi possível calcular que a chance de ocorrer esse evento em mudas cultivadas ao sol, foi cerca 21 vezes em relação àquelas cultivadas à sombra.

Os primeiros sintomas apareceram aos 42 dias para plantas de sol, e aos 52 dias para plantas de sombra (Figura 06). Ao final do experimento menos de 10% das plantas sob sistema de cultivo à sombra apresentam necrose. Nesse mesmo período, em plantas cultivadas ao sol os sintomas aparecem em cerca de 80% das folhas dessas plantas. São necessários apenas 10 dias contados do momento em que a primeira planta apresenta os sintomas até que esse percentual de 80% seja alcançado.

Período infeccioso

Para o período infeccioso foi feita apenas a análise de sobrevivência, pois o interesse foi verificar o tempo que as lesões permanecem produzindo esporos, quando as mesmas encontram-se infecciosas. Os resultados foram altamente significativos para a variável sistema de plantio ($p < 0,0001$), significativa para tipo de folha ($p = 0,015$), porém não-significativa para a aclimação ($p = 0,064$).

A função de risco obtida pelo modelo de riscos proporcionais de Cox foi $h(t) = h_0(t) \exp. (2,860 * \text{sistema de plantio} + 0,444 * \text{tipo de folha})$. Esse modelo demonstra um maior efeito da variável sistema de plantio sobre o tempo até que a planta finalize o período infeccioso. O risco de ocorrência desse evento foi cerca de 17 vezes maior para o sistema de plantio à sombra. O risco para folhas do tipo 2 é de 1,6 vezes maior que as folhas tipo 1.

Na figura 07, pode ser observado o maior efeito do sistema de cultivo em relação ao tipo de folha.

Mais de 75% das plantas cultivadas ao sol tiveram o período infeccioso definido, tanto em folhas do tipo 1 como em folhas do tipo 2. Pouco mais de 15% de plantas cultivadas à sombra tiveram o período infeccioso definido após 60 dias de avaliação.

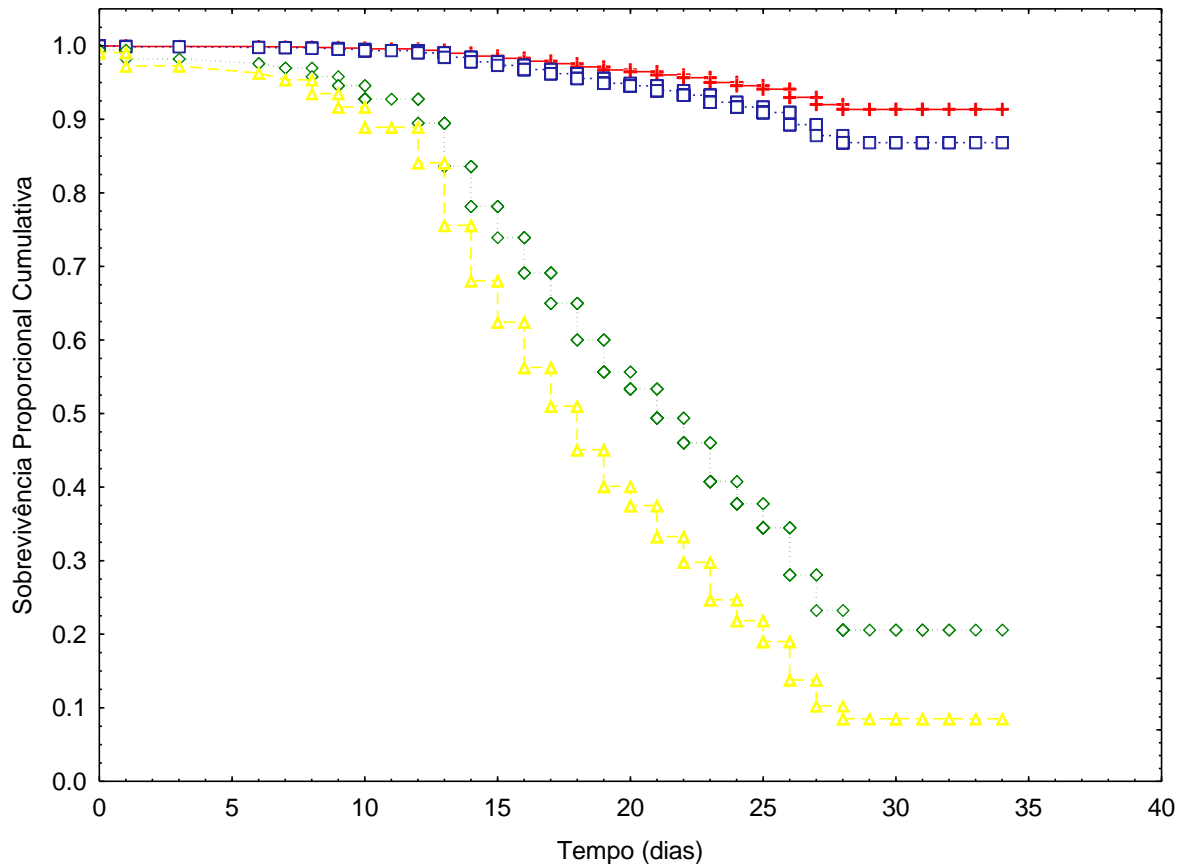


Figura 07. Percentual de plantas que completaram o período infeccioso em folhas tipo 1 de plantas sob sistema de cultivo à sombra (+), folhas tipo 2 de plantas sob sistema de cultivo à sombra (□), folhas tipo 1 de plantas sob sistema de cultivo ao sol (◇) e folhas tipo 2 de plantas sob sistema de cultivo ao sol (△).

Testando o modelo apenas para a variável sistema de cultivo (Figura 08) pode ser observado um percentual muito pequeno de plantas sob sistema de cultivo à sombra (10%), com período infeccioso definido. Enquanto que no sistema de cultivo ao sol, cerca de 90% das plantas apresentam lesões com e período infeccioso definido.

4.6 DISCUSSÃO

Período de incubação

O ajuste dos dados à regressão logística mostrou que o risco de ocorrência da doença não foi influenciado pela variável aclimatação, sistema de cultivo e tipo de folha. Apesar disso o resultado da análise de sobrevivência mostrou que mudas sob sistema de cultivo à sombra apresentam período de incubação mais longo. O que demonstra que o efeito da iluminância pode interferir na colonização do fungo. As primeiras plantas de sol cumpriram o período de incubação aos 20 dias, enquanto que plantas de sombra o fizeram por volta de 25 dias após a inoculação. No sistema de cultivo à sombra a temperatura média girou em torno de 29°C enquanto que para o sistema de cultivo ao sol a temperatura média foi de 27,5°C. Nossos resultados não diferem muito dos de Rocha (2008), onde o período de incubação foi de 24,88 dias para a temperatura de 20°C; 21,31 dias para 24°C e 24,81 dias para 30°C. Já Marin et al (2003) encontraram períodos de incubação de 13 a 31 dias em cultivos a campo na Costa Rica. Porém, o diferencial está no tempo em que a maioria das plantas apresenta o efeito testado. Plantas sob o sistema de cultivo à sombra, durante todo o experimento, completam o período de incubação antes daquelas sob sistema de cultivo ao sol, independente do tipo de aclimatação.

Outra inferência que pode ser feita é que a baixa iluminância sob as plantas (25% do total diário) nos diferentes sistemas de cultivo interfere nos parâmetros de pré-penetração do fungo. Avaliações feitas no primeiro capítulo desse trabalho testaram a ação da iluminância nos parâmetros crescimento micelial, esporulação e germinação, obtendo resultados que permitem inferir que de alguma forma há efeito dessa variável sobre o ciclo de vida do fungo. Baseado nos resultados obtidos, é de se esperar que a iluminância também interfira nos sub-processos crescimento do tubo germinativo e formação de apressório. A demora para que as plantas apresentem os sintomas também pode ser devido à dificuldade do fungo de estabelecer relações parasitárias estáveis com a planta em baixos níveis de luminosidade. Isso alicerça a inferência de que baixas luminosidades podem interferir na colonização do patógeno. Baseado no princípio de que os patógenos atacam, provocam os sintomas, quando a população de indivíduos é suficiente para vencer as defesas da planta, é de se imaginar que a luz dificulta a

multiplicação do fungo no interior da planta ou a produção de substâncias químicas envolvidas no mecanismo de patogênese do fungo, o que afeta o estabelecimento do patógeno no sítio. A luz pode ser condição fundamental para ocorrência de reações que desencadeiem esses processos.

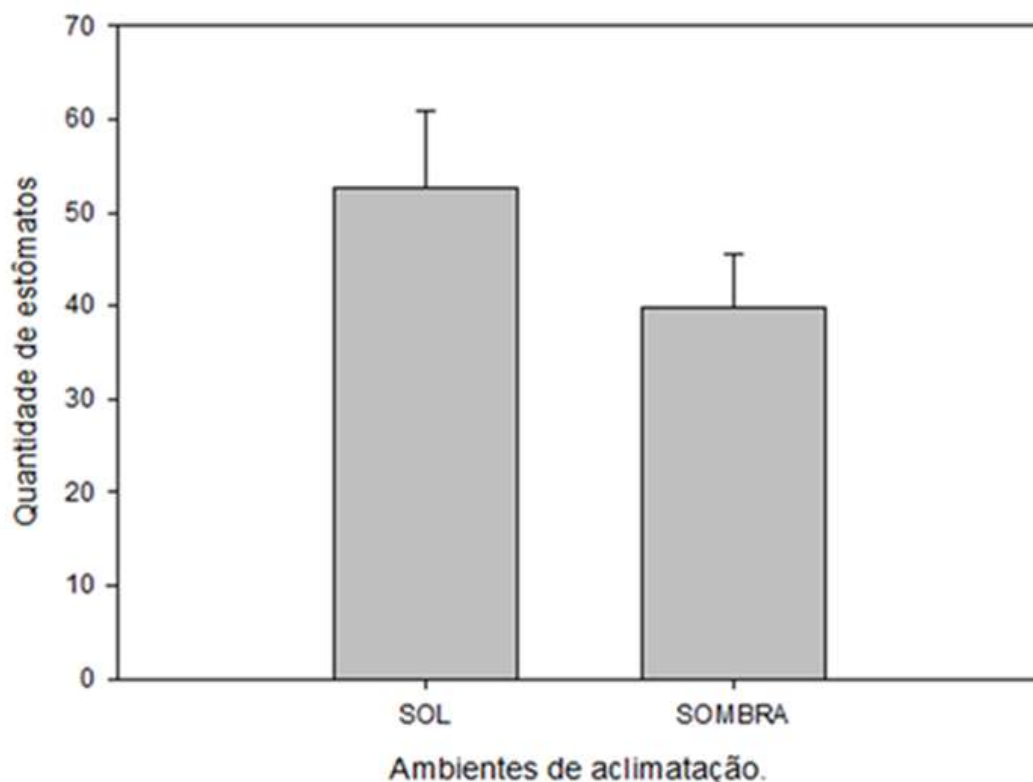


Figura 08. Quantidade de estômatos em plantas de bananeira aclimatadas desde propagação em vitro até a inoculação em campo em ambiente sombreado e ambiente ensolarado.

Os resultados não indicaram uma relação direta entre a densidade estomática e o aparecimento dos sintomas. Apesar de plantas de sombra apresentar menos estômatos (figura 09), as avaliações estatísticas não apontaram qualquer relação entre os parâmetros testados e essa variável. Trabalhos que envolvam a avaliação da frequência de infecção podem ajudar a entender o efeito da densidade estomática sobre o aparecimento dos sintomas.

Período de latência

Os resultados mostram que a variável aclimação interfere na ocorrência de lesões esporuladas nas plantas e a variável sistema de cultivo interfere tanto

na ocorrência como no tempo até que as lesões esporulem. Independente do tipo de aclimação, o sistema de cultivo à sombra apresentou período de incubação mais longo, isso mostra que há um efeito da iluminância sobre os parâmetros de pós-infecção do fungo.

A baixa iluminância provoca um retardo na esporulação do fungo, o que mostra uma ação dessa variável na reprodução. Entretanto, se imaginarmos que o fungo tem dificuldade em se estabelecer no sistema de cultivo à sombra, mesmo que indiretamente, a baixa esporulação implica em menos lesões, consequentemente a ocorrência de lesões aptas a esporular é menor. Isso explica o efeito da iluminância sobre a colonização e sobre a reprodução do fungo. A esporulação se iniciou por volta dos 23 dias após a inoculação no sistema de cultivo ao sol, enquanto que as primeiras lesões esporuladas ocorreram aos 32 dias no sistema de cultivo à sombra. Rocha (2008) encontrou médias de 46 dias à 20°C, 32 dias à 24°C e 33 dias à 30°C nos pomares de Coronel Pacheco-MG. Cordeiro (1997) avaliando o período de latência nas variedades Nanicão e Prata anã obteve médias do período de latência de 26 a 42,5 dias. Nesse trabalho as avaliações feitas referem-se ao momento em que as plantas completam o período de latência, não sendo assumida distribuição normal ao redor das médias. Também é válido chamar a atenção para o fato das plantas, durante o período de avaliação, no sistema de cultivo à sombra ter seu período de latência retardado em relação às plantas do sistema de cultivo ao sol.

Período de Desenvolvimento da Doença

A regressão logística mostrou haver relação entre as variáveis aclimação e tipo de folha e o período de desenvolvimento das lesões. Mais plantas aclimatadas no sol completaram o período de desenvolvimento da lesão que plantas aclimatadas na sombra. A análise de sobrevivência detectou que além da aclimação, o sistema de cultivo e tipo de folha interfere nos dias até que a planta cumpra o período de desenvolvimento da lesão. Plantas de sol alcançam o PDD em menos dias que plantas de sombra. Foi observado na condução do experimento que o número de lesões nas folhas das plantas pós-inoculadas na sombra era menor que 10 lesões. Como o período de desenvolvimento da lesão é dado por 10 lesões esporuladas, era de se esperar que muitas plantas de sombra não apresentassem esse evento. No trabalho de Rocha (2008) as plantas apresentaram PDD

aos 50 dias à 20°C, aos 42 dias à 24°C e 47 dias à 30°C nos plantios de Coronel Pacheco-MG. Essas avaliações permitem inferir que tanto a colonização do fungo, como a reprodução é afetada pela baixa iluminância. Os resultados são ali-cerçados pelos resultados obtidos no laboratório para esporulação, apresentados no primeiro capítulo.

Severidade - Viabilidade segundo nota 4 (33 % das folhas apresentando lesões) para escala de Stover (1971) modificada por Gauhl (1994)

O aparecimento de lesões em 33% das folhas (Nota 4 da escala de Stover) foi característico principalmente para a variável sistema de cultivo. Os resultados apontam para uma possível interferência da iluminância no desenvolvimento da doença. A severidade da doença em plantas no sistema de cultivo à sombra foi menor que em plantas no sistema de cultivo ao sol. Além disso, muitas plantas no sistema de cultivo à sombra nem chegaram a apresentar 33% das folhas lesionadas, e quando apresentavam o sintoma era tardio em relação a plantas do sistema de cultivo ao sol. Esses resultados evidenciam o efeito da iluminância sobre a colonização. Mostrando que tanto a reprodução como a colonização do fungo sofre a ação da luz.

Severidade - Viabilidade segundo nota traço (necrose) para escala de Stover (1971) modificada por Gauhl (1994)

Os resultados obtidos para essa variável foram semelhantes aqueles encontrados para a viabilidade nota 4 de Stover. A presença de folhas necrosadas também foi menor em plantas sob o sistema de cultivo à sombra que em plantas sob sistema de cultivo ao sol. O comportamento característico reforça a hipótese de que a luz interfere nos parâmetros monocíclicos da doença. O fato de menos de 1% das plantas apresentarem necrose nas plantas sob sistema de cultivo à sombra contra os mais de 90% de plantas sob o sistema de cultivo ao sol dá fundamento à hipótese de que baixos níveis de iluminância retardam o desenvolvimento do fungo. Os resultados também mostram que a colonização e a reprodução são afetadas quando os níveis de iluminância são baixos. Não há trabalhos na literatura que quantifiquem a severidade da forma abordada aqui, através da análise de sobrevivência, onde as avaliações se baseiam no tempo até que a planta apresente o evento de interesse.

Período infeccioso

A variável sistema de cultivo parece ser a que mais interfere no tempo de desenvolvimento do fungo. O período infeccioso de plantas sob o sistema de cultivo ao sol é mais curto que o de plantas no sistema de cultivo à sombra. Essa análise representa o efeito acumulado da interferência da iluminância desde o aparecimento das primeiras lesões (Incubação) até o momento em que as folhas não contribuem mais para a disseminação da doença. As observações podem ainda mostrar que a quantidade de luz que incide sobre o patossistema é importante nas diversas fases de vida do fungo. Análises de laboratório indicam um efeito significativo da luz sobre a esporulação.

O fungo esporula menos em ambientes de baixa luminosidade. O efeito na colonização fica evidenciado nas avaliações de severidade e incubação, enquanto que o efeito na reprodução é evidenciado no período de latência e PDD. O mais interessante é que plantas sob o sistema de cultivo à sombra apresentam período infeccioso mais longo que plantas de sol, que por sua vez apresentaram período infeccioso definido. Menos de 10% das plantas de sombra apresentam o período infeccioso definido.

Apesar de esporular menos, plantas de sombra permanecem esporulando por mais tempo. O nos leva a pensar que nesse sistema de cultivo, a natureza endêmica do fungo será mantida, sendo difícil a ocorrência de surtos epidêmicos, devido à baixa produção de esporos.

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresentou como interesse principal estudar a ecologia de um fitopatógeno causador de uma das principais doenças da bananicultura no Brasil, a Sigatoka-amarela. Os trabalhos de laboratório ajudaram a inferir sobre a ação da iluminância sobre os parâmetros de pré-penetração do fungo, enquanto que as avaliações do experimento de campo esclareceram sobre os parâmetros monocíclicos sob tais condições.

Apesar dos bons resultados obtidos, demonstrando que há efeito de diferentes níveis de luminosidade sobre o ciclo de vida do fungo, novos trabalhos envolvendo esse patossistema são necessários para obter mais informações sobre *Mycosphaerella musicola*. E assim dar margem para a adoção de técnicas mais eficazes de controle, e ainda para nortear melhor o trabalho de melhoristas e epidemiologistas. Os dados também são necessários para criar modelos de progresso da doença, principalmente nos países tropicais, onde a Sigatoka-amarela é a responsável por reduções severas na produção de bananas.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, K. C. L. de M. **Variabilidade morfológica e patogênica de isolados de *Mycosphaerella musicola* Leach**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas.

Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Iluminância de interiores**. Disponível em: <<http://www.labcon.ufsc.br/anexos/13pdf>>. Acesso em: 06/03/2012.

AGRIOS, G. N. Plant Disease Caused by Fungi. In: ____ **Plant Pathology**. 6th ed. Elsevier Academic, 2004. Chap. 11, p. 459.

ALBUQUERQUE, P. S. B. de – ***Mycosphaerella musicola*: Produção de conídios *in vitro***; Sensibilidade a fungicidas e avaliação da resistência em mudas de cultivares de bananeira (*Musa* spp.). Piracicaba, 1993. 94 p.

AMORIN, L. Infecção. In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de Fitologia: Princípios e Conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.295-307.

ASSUNÇÃO, M. M. C. **Fungos patogênicos em bananeira (*Musa* spp.) no município de Belo Jardim. 2006**. 83 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos). Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2006.

ARAÚJO, A. G. de; SAMPAIO-FILHO, I. de J.; FORTES, C. P.; ROCHA, H. S.; CORDEIRO, Z. J. M. and SANTANA-FILHO, D. M. **Sporulation and Mycelial Growth of *Mycosphaerella musicola* Leach on Different Culture Media**. Bananas and plantains: Toward sustainable global production and improved uses. ProMusa symposium. 10-14 October, 2011.

ARZANLOU, M., ABELN, E. C. A., KEMA G. H. J., WAALWIJK, C., CARLIER, J., de VRIES, I., GUZMÁN, M., and CROUS, P. W. 2007. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. **Phytopathology** 97:1112-1118.

BENNETT, R. S. and P. A. ARNESON. **Black sigatoka of bananas and plantains. Black Sigatoka.** *The Plant Health Instructor.* 2003.

BERGAMIN-FILHO, A. **Epidemiologia.** In: BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. Manual de Fitologia: Princípios e Conceitos. . 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.540-552.

BEVERAGGI, A. 1992. Etude des interactions hôte-parasite chez des bananiers sensibles et résistants inoculés par *Cercospora fijiensis* responsable de la maladie des raies noires. Thèse de 3ème cycle. Université de Montpellier, Montpellier, France. Fiaccadori, R., Gielink, A. J., and Dekker, J. 1987. Sensitivity to inhibitors of sterol biosynthesis in isolates of *Venturia inaequalis* from Italian and Dutch orchards. *Neth. J. Plant Pathol.* 93:285-287.

BEVERAGGI, A., MOURICHON, X., and SALLE, G. 1995. **Etude comparee des premieres etapes de l'infection chez des bananiers sensibles et resistants infectes par le *Cercospora fijiensis (Mycosphaerella fijiensis)* agent responsable de la maladie des raies noires.** *Can. J. Bot.* 73:1328-1337.

BALINT, K.P.J.; MAY, G.D.; CHURCHILL, A.C.L. **Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: A tool for the study of host/pathogen interactions.** *Microbiology Letters.* Amsterdam, v.195, n.1, p.09-15. 2001. In: SIVIERO, A. & LEDO, A. da S. Avaliação de genótipos de banana à Sigatoka-amarela na Amazônia ocidental. *Rev. Bras. Frutic.,* Jaboticabal - SP, v.24, n. 3, p. 724-726, Dezembro 2002.

BORMANN, O. R. **Iluminação natural em salas de aulas e escritórios com uso de prateleiras de luz. Tese de Mestrado.** Curitiba: Centro Federal de Educação Tecnológica do Paraná - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia, 2003.

BRAGA, M. F., SÀ, M. E. L. de, MUSTAFÀ, P. C. Avaliação de um protocolo para multiplicação in vitro da bananeira (*Musa spp.*) Cv. Caipira (AAA). *Rev. Bras. Frutic.,* Jaboticabal - SP, v. 23, n. 2, p. 215-219, agosto 2001.

BRUNELLI, K.R.; FAZZA, A.C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L.E.A. Effect of culture media and light exposure on the sporulation of *Cercospora zeae-maydis*. **Summa Phytopatologica**, v. 32, p. 92-94, 2006.

BURT, P. J. A. **Airborne dispersal of *Mycosphaerella fijiensis***. In: L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero and J.V. Escalant (Eds.). *Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and Outlook*. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, p.111-121.

CALPOUZOS, L. **Studies on the Sigatoka disease of bananas and its fungus pathogen**. Atkins Gnd. Research Lab. Cuba, 70, 1955.

CARLIER, J., FOURÉ, E., GAUHL, F., JONES, D. R., LEPOIVRE, P., MOURICHON, X., PASBERG-GAUHL, C., and ROMERO, R. A. 2000. Black Leaf Streak. Pages 37-79 in: **Diseases of Banana, Abaca and Enset**. D. R. Jones, ed. CAB International, Wallingford, UK.

CARLIER, J.; HAYDEN, H.; RIVAS, G.; ZAPATER, M. F.; ABADIE, C. and AITKEN, E. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: WORKSHOP ON MYCOSPHAERELLA LEAF SPOT DISEASE HELD IN SAN JOSÉ, 2002, Costa Rica. ***Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and Outlook**. Montpellier: INIBAP, 2003. P. 123-129.

CARLIER, J., MOURICHON, X., GONZÁLES-DE-LEON, D., ZAPATER, M. F., and LEBRUN, M. H. 1994. **DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* specie that cause banana leaf spot diseases**. *Phytopathology* 84: 751-756.

CORDEIRO, Z. J. M. **Variabilidade Patogênica de Isolados de *Mycosphaerella musicola* e resistência induzida e genética em bananeiras**. 1997. 118p. Tese (Doutorado em Agronomia / Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CORDEIRO, Z. M.; ROCHA, H. S. e ARAÚJO, A. G. **Metodologias para Manuseio de *Mycosphaerella musicola* em Laboratório**. Cruz das Almas. EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 2011.

CORDEIRO, Z. M. e MATOS, A. P. **Doenças. Banana Produção**, 1. Frutas do Brasil, 2003.

CORDEIRO Z. J. M. and A.P. de Matos. 2001. **Sigatoka-amarela no Norte de Minas Gerais**. Simpósio Norte Mineiro sobre a cultura da banana, Nova Porteirinha, 6-9 novembro. Anais I, pp. 238-247. CORDEIRO, Z.J.M. and MATOS, A. P. Impact of *Mycosphaerella spp. in Brazil*. In: L. Jacome, P. Lepoivre, D.Marin, R. Ortiz, R. Romero and J.V. Escalant (Eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and Outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, p.91-97.

CORDEIRO, Z.J.M. and MATOS, A. P. **Impact of *Mycosphaerella spp. in Brazil***. In: L. Jacome, P. Lepoivre, D.Marin, R. Ortiz, R. Romero and J.V. Escalant (Eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and Outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, p.91-97.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; MEISSNER-FILHO, P. E. **Doenças E Métodos de Controle**. In: BORGES, A. L., SOUZA, L. da S. **O Cultivo da Bananeira**. EMBRAPA. Cruz das Almas, 2004. P. 146-182.

CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. **Doenças da bananeira**. In: KIMATI, H; AMORIN, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). Manual de fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p.99-117.

CROUS, P. W., GROENEWALD, J. Z., APTROOT, A., BRAUN, U., MOURICHON, X., and CARLIER, J. 2002. **Integrating morphological and molecular data sets**

in *Mycosphaerella*, with specific reference to species occurring on *Musa*. Proc. Int. Workshop *Mycosphaerella* Leaf Spot Dis. Bananas, 2nd. In press.

ETEBU, E., PASBERG-GAUHL, C., GAUHL, F. and DANIEL-KALIO, L. A. **Effect of light and sealing pattern on sporulation and growth of *Mycosphaerella fijiensis***. In: INIBAP, 2005. Vol. 14, n. 1. P. 24-25.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultural Database**. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em novembro de 2011.

FERNANDES, C. de F., COSTA, J. N. M., HOLANDA-FILHO, Z. F., SOUZA, F. de F. **Doenças da bananicultura: Sigatoka-amarela**. Circular técnica 85. Porto Velho, RO. Setembro, 2006. ISSN 0103-9334.

FERREIRA, D. M. V., COERDEIRO, Z. J. M., MATOS, A. P. Sistema de pré-aviso para o controle da Sigatoka-amarela da bananeira no recôncavo baiano. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 3, p. 429-431, dezembro 2003.

FERREIRA, P. V. estatística Experimental Aplicada à Agronomia. EDUFAL. 2 ed. Maceió, 1996. 604 p.

FIORAVANÇO, J. C. **MERCADO MUNDIAL DA BANANA: Produção, comércio e participação brasileira**. Informações Econômicas, SP, v.33, n.10, out. 2003.

FOURÉ, E. 1985. **Black Leaf Streak Disease of Bananas and Plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet)**. Study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFA-CIRAD, Paris.

FOURÉ, E. **Les Cercoporioses do Bananier et Leurs Traitments. Comportement dès variétés. Etude de la sensibilité variétale dès bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* MORELET au Gabon (maladie dès raies noires)**. Fruits. Vol. 40. N° 6. 1985.

FOURÉ, E. 1994. **Leaf spot diseases of banana and plantain caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis***. Pp. 37-46. In The Improvement and Testing of Musa: A Global Partnership (D.R. Jones, ed.). INIBAP, Montpellier, France.

FOURÉ, E., GRISONI, M., and ZURFLUH, R. 1984. Les cercosporiosis du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet et de quelques caractéristiques biologiques de la maladie de raies noires au Gabon. **Fruits** 39:365-377.

FULLERTON, R. A. 1994. **Sigatoka Leaf Diseases**. Pages 12-14 in: Compendium of Tropical Fruit Diseases. R. C. Ploetz, G. A. Zentmyer, W. T. Nishijinia, K. G. Rohrbach, and H. D. Ohr, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

FULTON, R.H. Perfect stages of *Cercospora musae* in Central America and factors affecting ascospore frequency. (Abstrc.) **Phytopathology**, vol 52 p. 11. 1962.

GAUHL, F. 1994. **Epidemiology and Ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on Plantain and Banana (*Musa spp.*) in Costa Rica, Central America**. INIBAP, Montpellier, France.

GAUHL, F., PASBERG-GAUHL, C., and JONES, D. R. 2000. **Disease cycle and epidemiology**. Pages 56-62 in: Diseases of Banana, Abacá and Enset. D. R. Jones, ed. CAB International, Wallingford, UK.

GONZÁLEZ, M. 1987. **Enfermedades del cultivo del banano**. Oficina de Publicaciones de la Universidad de Costa Rica, San José.

GONZALEZ, M. S. and PONS, N. **Characteristics of developmental stages in mitospore production of *Pseudocercospora musae***. Mycol. Res. 104 (12): 1507-1517. December 2000. Printed in the United Kingdom.

GONZÁLEZ, R., BUSTAMANTE, E., SHANNON, P., OKUMOTO, S., and LEANDRO, G. 1996. **Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano.** Manejo Integrado Plagas 40:12-16.

HANADA, R.E., GASPAROTTO, L. & PEREIRA, J.C.R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira** 27:170-173. 2002.

HENDERSON, J.; GRICE, K.; PATTEMORE, J.; PETERSON, J. and AITKEN, E. **Improved PCR-based detection of Sigatoka disease and black leaf streak disease in Australian banana crops.** In: L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero and J.V. Escalant (Eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and Outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, p.59-64.

HOSS, R., HELBIG, J., and BOCHOW, H. 2000. Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease pathosystem (*Musa* spp. – *Mycosphaerella fijiensis*). **J. Phytopathol.** 148:387-394.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em novembro de 2011.

JÁCOME, L. H. **Population biology and epidemiology.** In: L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero and J.V. Escalant (Eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and Outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, p.107-110.

JACOME, L. H., and SCHUH, W. 1992. Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Phytopathology** 82:515-520.

JACOME, L. H., and SCHUH, W. 1993. Effect of temperature on growth and conidial production in vitro, and comparison of infection and aggressiveness in vivo among isolates of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Trop. Agric.** 70:51-59.

JACOME, L. H., SCHUH, W., and STEVENSON, R. E. 1991. Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Phytopathology** 81:1480-1485.

JONES, D. R. The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. In: WORKSHOP ON MYCOSPHAERELLA LEAF SPOT DISEASE HELD IN SAN JOSÉ, 2002, Costa Rica. ***Mycosphaerella leaf spot disease of bananas: present status and Outlook***. Montpellier: INIBAP, 2002. P. 25-41.

KIMATI, H.; GALLI, F. **Doenças da bananeira *Musa spp.*** In: GALLI, F.; CARVALHO, P. de C.T. de; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C. O. N.; SALGADO, C. L.; KHUGNER, T. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. V2, p.87-101.

KLEIN, H. H. (1960). Controlo f *Cercospora* leaf spot of bananas with applications of oil sprays based on the disease cycle. *Phytopathology*, 50, 488-490. In: MERE-DITH, D. S., and FIRMAN, I. D. 1970. Banana Leaf Spot Disease in Fiji. **Trop. Agriculture**, Trin., vol. 47, Nº 2, April, 1970. 128-129.

LEPOIVRE, P., ACUNA, P., and RIVEROS, A. S. 1993. **Screening procedures for improving resistance to banana black leaf streak disease**. Pages 213-220 in: *Breeding Bananas for Resistance to Diseases and Pests*. J. Ganry, ed. CIRAD/INIBAP, Montpellier, France.

LEPOIVRE, P.; BUSORGO, J.P.; ETAME, J.J.; HADRAMI, A. E I.; CARLIER, J.; HARELIMARA, G.; MOURICHON, X.; PANIS, B.; RIVEROS, A. S.; SALLÉ, G.; STROSSE, H. and SWENNEN, R. Banana–*Mycosphaerella fijiensis* interactions.

In: In: WORKSHOP ON MYCOSPHAERELLA LEAF SPOT DISEASE HELD IN SAN JOSÉ, 2002, Costa Rica. ***Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and Outlook**. Montpellier: INIBAP, 2002. P. 151-159.

LUIS, J. G., ECHEVERRÍA, F., QUINONES, W., BRITO, I., LÓPEZ, M., TORRES, F., CARDONA, G., AGUILAR, Z., PELAEZ, C., and ROJAS, M. 1993. **Irenolone and emenolone – two new types of phytoalexin from *Musa paradisiaca***. J. Org. Chem. 58:4306-4308.

MARIN, D. H, ROMERO, R. A., GUZMÁN, M. and SUTTON, T. B. Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. **Plant Disease**, 2003. Vol. 87 No. 3.

MATA, R., TAPIA, A., and ESCALANTE, J. V. 1995. **Efecto de la temperatura sobre la germinacion de *M. fijiensis* y *M. musicola***. Pages 287-291 in: ACORBAT Memorias XI Reunion. V. Morales, ed. Impresos Barsant, San José, Costa Rica.

MATOS, A. P. De, BORGES, M. de F., CORDEIRO, Z. J. M., SILVA, S. de O. **Re-ação de Genótipos de Bananeira à Infecção Natural Pela Sigatoka-amarela**. Magistra, Cruz das Almas - BA, v. 13, n. 2, jul./dez., 2001. Disponível em: http://www.magistra.ufrb.edu.br/publica/magist13_2/01-13_2-02c.html. Acesso em: Dezembro, 2011.

MAYORGA, M. H. 1990. La Raya negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) del plátano y del banano. I. Ciclo de vida del patógeno bajo las condiciones del Urabá. **Revista ICA** 25:69-77.

MEREDITH D.S. 1970. Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola*. **Phytopath.** Paper No. 11.1-147. Commonw. Mycol. Inst

MEREDITH, D. S., and FIRMAN, I. D. 1970. Banana Leaf Spot Disease in Fiji. **Trop. Agriculture**, Trin.,vol. 47, N° 2, April, 1970. 128-129.

MEREDITH, D. S., and LAWRENCE, J. S. 1970. Black leaf streak of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Susceptibility of cultivars. **Trop. Agric.** 47:275-287.

MOBAMBO, K. N., GAUHL, F., PASBERG-GAUHL, C., and ZUOFA, K. 1996. **Season and plant age effect evaluation of plantain for response to black Sigatoka disease.** Crop Prot. 15:609-614.

MOLINA, C.; APONTE, S.; GUTIÉRREZ, A.; NUNEZ, V. and KAHL, G. **Development and application of molecular markers in *Mycosphaerella* populations in Colombia.** In: L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero and J.V. Escalant (Eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and Outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, p.131-139.

MONDAL, S. N., and TIMMER, L. W. 2005. **Ascospore deposition and epiphytic growth in relation to fungicide timing for control of greasy spot rind blotch caused by *Mycosphaerella citri*.** Plant Dis. 89:739-743.

MONTARROYOS, A.V.V., COELHO, R.S.B., FERRAZ, G. de M.G., SANTOS, R. Dos, SANTOS, V.F. dos, ANDRADE, P.P. de. Efeitos de meio de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento de *Mycosphaerella musicola*. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.1, p.86-89, 2007.

MOREIRA, R. S. **Banana: teoria e prática de cultivo.** Fundação Cargill. Campinas, 335p. 1987. In: OLIVEIRA, H. S. de. Comportamento de cultivares de banana (*Musa spp*) resistentes a doenças no processo de micropropagação. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

MOURICHON, X. **Overview of progress and results since the first international workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas in 1989.** In: L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marin, R. Ortiz, R. Romero and J.V. Escalant (Eds.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and Outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, 20-23 May 2002. INIBAP, p.11-18.

MOURICHON, X., CARLIER, J., and FOURÉ, E. **Sigatoka leaf spot diseases. Black leaf streak disease (black Sigatoka) Sigatoka disease (yellow Sigatoka).** PROMUSA. October, 1997.

NOGUEIRA, E. M. de C. **Principais doenças da bananeira.** Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal. Instituto Biológico.

OLIVEIRA, H. S. de. **Comportamento de cultivares de bananeira (*Musa spp*) resistentes a doenças no processo de micropropagação.** 79f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

ORTIZ R. AND D. VUYLSTEKE. 1994. **Inheritance of black Sigatoka resistance in plantain-banana (*Musa spp.*) hybrids.** Theoretical and Applied Genetics 89:146-152. In: SIVIERO, A. & LEDO, A. da S. Avaliação de genótipos de banana à Sigatoka-amarela na Amazônia ocidental. Rev. **Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 724-726, Dezembro 2002.

PARNELL M., P.J.A. BURT AND K. WILSON. 1998. **The influence of exposure to ultraviolet radiation in simulated sunlight on ascospores causing Black Sigatoka disease of banana and plantain.** International Journal of Biometeorology 42:22-27. In: JONES, D. R. The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. In: WORKSHOP ON MYCOSPHAERELLA LEAF SPOT DISEASE HELD IN SAN JOSÉ, 2002, Costa Rica. Mycosphaerella leaf spot disease of bananas: present status and Outlook. Montpellier: INIBAP, 2002. P. 25-41.

PEREIRA, J. C. R. e GASPAROTTO L. **Contribuição para o reconhecimento das Sigatokas negra e amarela e das doenças vasculares da bananeira.** Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005.

PHILPOTT, J. C. & KNOLWLES, C. H. **'Report on a visit to Sigatoka'** Pamphl. Dept. of Agriculture. Fiji Nº. 3. 1913.

POZZA, E. A. **Manejo de Doenças de Plantas: Manejo de Epidemias de Doenças de Plantas**. UFLA/FAEPE/DFP. Lavras, 2000. 91 p.

POZZA, E. A. e ALVES, E. **Princípios e Conceitos em Manejo de Doenças de Plantas**. UFLA/FAEPE. Lavras, 1999. 44p.

PRICE, D. **Climate and controlo of banana leaf spot**. Span 3. P. 122-124.

PUCH-CEH, M., GARCÍA-SOSA, K. and PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. **Optimizing the culture conditions of *Mycosphaerella fijiensis* Morellet**. InfoMusa. INIBAP, 2005. Vol. 14, n. 1.

ROCHA, H. S. **Epidemiologia de Sigatoka-amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microssatélites**. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Lavras: UFLA, 2008.

ROCHA-JUNIOR, O. M. da. **Padrão espacial e tamanho da amostra para avaliação da severidade da Sigatoka-amarela da bananeira**. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), 51 f. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia, 2007.

ROSA, R.C.T. & MENEZES, M. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de *Pseudocercospora musae*. **Fitopatologia Brasileira** 26:141-147. 2001.

ROMERO, R. A. 1995. **Dynamics of fungicide resistant populations of *Mycosphaerella fijiensis* and epidemiology of black Sigatoka of bananas**. Ph.D. diss. North Carolina State, Raleigh.

ROMERO, R. A., and SUTTON, T. B. 1998. **Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black Sigatoka of banana, in Costa Rica**. Plant Dis. 82:931-934.

ROMERO, R. A., and SUTTON, T. B. 1997. **Reaction of four *Musa* genotypes at three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different regions.** Plant Dis. 81:1139-1142.

SEPÚLVEDA, L., VÁSQUEZ, L. E., PANIAGUA, C. I., ECHEVERRY, D., HERNÁNDEZ, C. A., RODRÍGUEZ, E., RESTREPO, L. F. and ARANGO, R. The presence and spectrum of light influences the in vitro conidia production of *Mycosphaerella fijiensis* causal agent of black Sigatoka. **Australasian Plant Pathology**, 2009, 38, 514–517.

SIVIERO, A. & LEDO, A. da S. Avaliação de genótipos de banana à Sigatoka-amarela na Amazônia ocidental. Rev. **Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 24, n. 3, p. 724-726, Dezembro 2002.

STAHEL, G. **Banana Leaf Spot ('*Cercospora musae*').** Tropical Agriculture, XIV; 56-60, 1937.

STIERLE A., G. STROBEL, D. STIERLE & F. SUGAWARA. 1992. **Analytical methods for phytotoxins.** Pp. 1-32 in Methods of plant analysis (H.F. Linskens & J.F. Jackson, eds). Springer Verlag, Berlin. In: PUCH-CEH, M., GARCÍA-SOSA, K. and PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Optimizing the culture conditions of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. InfoMusa. INIBAP, 2005. Vol. 14, n. 1.

STOVER, R. H. 1964. **Leaf spot of bananas caused by *M. musicola*: Factors Influencing Production of Fructification and Ascospores.** Tropical Research department, Teal Railroad Co. (a subsidiary of the United Fruit Company). Vol. 54. Honduras, p 1320 – 1326, 1964.

STOVER, R. H. 1970. Leaf spot of bananas caused by *M. musicola*: role of conidia in epidemiology. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, p 856 – 860, 1970.

STOVER, R. H. 1980. **Sigatoka leaf spot of bananas and plantains.** Plant Dis. 64:750-756.

STOVER, R. H. 1983. **The effect of temperature on ascospore germ tube growth of *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* var. dif-forms.** Fruits 38:625-628.

STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. Bananas. 3. ed. Essex: Longman, 1993. 534 p. In: ROCHA-JUNIOR, O. M. da. **Padrão espacial e tamanho da amostra para avaliação da severidade da Sigatoka-amarela da bananeira.** Dissertação (Mestrado em Fitossanidade), 51 f. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia, 2007.

UDUGAMA, S. **Septória leaf-spot disease of banana: *Mycosphaerella eumusae*. A new Record for Sri Lanka.** Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture, 2002. 4:337-343.

VERA-COELLO, D. I. **Componentes epidemiológicos e progresso da Sigatoka negra em bananeira e bananeira-da-terra.** Dissertação de Mestrado. Viçosa: UFV, 2003.

VIVAN, J. L. **Bananicultura em Sistemas Agroflorestais no Litoral Norte do RS.** Agroecol. e Desenv.Rur.Sustent.,Porto Alegre, v.3, n.2, abr./junho.2002

WASHINGTON, J.R.; CRUZ,J.; LOPEZ, F. and FAJARDO, M. 1998. **Infection studies of *Mycosphaerella fijiensis* on banana and the control of Black Sigatoka with chlorothalonil.** Plant Disease 82:1185–1190.

WARDLAW, C. W. Leaf Spot. (Sigatoka Disease) In: WARDLAW, C. W. **BANANA DISEASE:** Including Plantains and Abaca. Longmans, Edingburgh, 1961. Cap. 11, p. 314-341.

7.0 ANEXOS

Tabela01: Médias de dia até a ocorrência do período de incubação, período de latência, PDD, nota 4 e traço da escala de Stover.

		Sistema de cultivo ao Sol			Sistema de cultivo à Sombra		
		Aclimação ao Sol	Aclimação à Sombra	Média	Aclimação ao Sol	Aclimação à Sombra	Média
Período de Incubação	F1	25.0769	27.0667	26.0718	30.8421	30.3250	30.5836
	F2	26.0645	28.7576	27.4110	31.4138	33.1892	32.3015
	Média	25.5707	27.9121	26.7414	31.1279	31.7571	31.4425
Período de Latência	F1	30.0400	32.7000	31.3700	37.0556	38.2308	37.6432
	F2	30.4839	35.0606	32.7722	38.6364	40.6667	39.6515
	Média	30.2619	33.8803	32.0711	37.8460	39.4487	38.6473
PDD	F1	32.8000	34.2500	33.5250	42.1481	42.8108	42.4795
	F2	32.5172	37.2500	34.8836	43.0962	44.4000	43.7481
	Média	32.6586	35.7500	34.2043	42.6222	43.6054	43.1138
Stover 4	F1	37.4545	40.6897	39.0721	48.0000	47.0000	47.5000
	F2	38.0000	40.6897	39.3448	46.8108	47.3333	47.0721
	Média	37.7273	40.6897	39.2085	47.4054	47.1667	47.2860
Stover traço	F1	26.4500	30.3333	28.3917	59.7333	59.4000	59.5667
	F2	29.5333	31.6833	30.6083	59.1000	58.5000	58.8000
	Média	27.9917	31.0083	29.5000	59.4167	58.9500	59.1833
Período infeccioso	F1	*	*	*	*	*	*
	F2	*	*	*	*	*	*
	Média	*	*	*	*	*	*

* Não foi possível calcular as médias, já que a maioria das plantas de sombra não cumpre o período de incubação
Em **negrito**, as médias considerando apenas sistema de cultivo.

Tabela 02: Resultados da regressão logística.

Variáveis independentes	P-valor	Equação Logística
Período de incubação	0.852 ^{ns}	Logit Pi = 3.2804 + (0.2833 X1) + (0.6663 X2) + (0.0162 X3)
Período de latência	0.0128*	Logit Pi = 2.3026 + (1.3779 X1)
PDD	0.0617 ^{ns}	Logit Pi = 3.1735 - (0.686 X1)
Stover 4	< 0.0001**	Logit Pi = 0.2847 + (1.8417 X1)
Stover traço	< 0.0001**	Logit Pi = - 2.9339 + (4.1919 X1)

Tabela 03: Odds ratio para as variáveis testadas. Os valores indicam qual a probabilidade de plantas de sol apresentar os sintomas em relação às de sombra. Plantas de sol tem aproximadamente 4 vezes mais chance de completar o período de incubação, 6 vezes mais chance de chegar à nota 4, e 66 vezes mais chance de apresentar a nota traço da escala de Stover primeiro que plantas de sol. Os outros valores não foram abordados devido à análise não ter sido significativa (ns).

Variáveis independentes	ODDS RATIO				
	PI	PI	PDD	Stover 4	Stover traço
Aclimação	ns	ns	ns	ns	ns
Sistema de cultivo	ns	3.9667*	ns	6.307**	66.1481**
Tipo de folha	ns	ns	ns	ns	ns

Tabela 04: Dias até o aparecimento dos primeiros sintomas e percentual de plantas que apresentaram os sintomas aos 60 dias.

Sistema de cultivo	Início dos sintomas					% de plantas com o sintoma aos 60 dias					
	PI	PL	PDD	Stover 4	Stover traço	PI	PL	PDD	Stover 4	Stover traço	Período de incubação
Sol	20	23	27	36	43	99	99	91	90	79	89
Sombra	26	33	38	43	52	99	90	89	58	5	6

Tabela 05: Dias até o aparecimento dos primeiros sintomas e percentual de plantas que apresentaram os sintomas aos 60 dias.

Sistema de cultivo	Início dos sintomas					% de plantas com o sintoma aos 60 dias					
	PI	PL	PDD	Stover 4	Stover traço	PI	PL	PDD	Stover 4	Stover traço	Período infeccioso
Sol	20	23	27	36	43	99	99	91	90	79	89
Sombra	26	33	38	43	52	99	90	89	58	5	6

Obs.: PI = Período de incubação; PL = Período de latência; PDD = Período de desenvolvimento da doença; Stover 4 = Nota 4 da escala diagramática de Stover; Stover traço = Nota traço da escala diagramática de Stover; Período infeccioso é tempo que vai do período de latência até que a planta apresentasse a nota traço de Stover. Não foram colocados dados de início dos sintomas, pois ele se confunde com o período de latência.