



CLEILSON DO NASCIMENTO UCHÔA

**ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNOSE
MOLECULAR DA SIGATOKA-NEGRA**

**LAVRAS – MG
2010**

CLEILSON DO NASCIMENTO UCHÔA

**ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNOSE MOLECULAR DA
SIGATOKA-NEGRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Edson Ampélio Pozza

LAVRAS - MG
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Uchôa, Cleilson do Nascimento.

Estudos epidemiológicos e diagnose molecular da sigatoka-negra
/ Cleilson do Nascimento Uchôa. – Lavras : UFLA, 2010.

106 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Edson Ampélio Pozza.

Bibliografia.

1. *Paracercospora fijiensis*. 2. Banana. 3. Epidemiologia. 4.
Doenças fúngicas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

CLEILSON DO NASCIMENTO UCHÔA

**ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNOSE MOLECULAR DA
SIGATOKA-NEGRA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para obtenção do título de Doutor.

APROVADO em 28 de maio de 2010

Dr. Wilson da Silva Moraes	UNESP
Dra. Antonia dos Reis Figueira	UFLA
Dr. Hilário Antonio de Castro	UFLA
Dra. Sônia Maria de Lima Salgado	Epamig

Dr. Edson Ampélio Pozza
Orientador

LAVRAS - MG
2010

Aos meus pais e irmãos
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza, pela confiança, orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Wilson Moraes, pela amizade e contribuição à pesquisa.

A Keline, pelo carinho e paciência nos momentos difíceis.

A todos os professores, funcionários e amigos do Departamento de Fitopatologia: Franklin, Hermínio, Leo Girão, Juliano, Renata, Paulo, Márcia, Luciane, João, Eudes, Eduardo, Luciana, Ângelo, Beatriz, Sílvia Regina, Carla, Luana, Mirella, Heloísa, Roberto, Flávia, Deila, Adriano, Ruth, Eliana, Vladimir, Bruno, Carlos e Marcelo Loran.

A minha família, em especial aos meus tios Nilo e Maria Uchôa, por todo o incentivo.

Aos meus queridos amigos: Marcos, Cynthia, Regina, Aníbal, César, Livia, Helena, Jean, Vladimir, Bia, Virna e Neimar, pela força e convívio.

Aos professores da Universidade Federal do Ceará e pesquisadores da Embrapa Agroindústria Tropical, em especial ao Prof. Sebastião, Dr. Marto, Dr. Emilson, Dr. Freire e Dr. Apoliano, pois foi onde tudo começou.

Ao povo de Lavras, pela acolhida e bons momentos.

“Eu vos feri com um vento abrasador e com ferrugem a multidão de vossas vinhas. Aos vossos olivais e aos vossos figueirais comeu a lagarta; e vós não voltastes para mim, diz o

Senhor.”

(Amós 4:9)

RESUMO GERAL

A diversidade dos isolados de *Mycosphaerella fijiensis* e a disseminação dos esporos são influenciadas por fatores ambientais possibilitando ocorrer diferentes graus de virulência nas diversas condições climáticas. Além da suscetibilidade natural das principais variedades, podendo a nutrição mineral influenciar a incidência e a severidade da doença. Objetivou-se, com a realização deste trabalho: comparar a morfologia e a patogenicidade de isolados de *M. musicola* com isolado de *M. fijiensis* e testar *primers* de microssatélite específicos da espécie *M. musicola* e a sua diferenciação com isolados de *M. fijiensis*, oriundos de diferentes regiões do Brasil; verificar a dispersão sazonal de esporos de *M. fijiensis*, no Vale do Ribeira, SP; avaliar os efeitos da temperatura e do molhamento foliar no processo infeccioso da sigatoka-negra. Os isolados de Lavras, MG, Vianópolis-Maça, Goiás, Dourado, MS e Missal, PR apresentaram habilidade para penetrar e colonizar o tecido do hospedeiro, de forma semelhante ao isolado de Registro, SP, exibindo os sintomas típicos da sigatoka-negra, mas sem a mesma severidade. O *primer* MmSSR 34 pode ser empregado na diferenciação entre *M. musicola* e *M. fijiensis* com precisão e eficiência, mesmo ocorrendo infecção mista entre os patógenos. As variáveis climáticas mais associadas ao progresso da doença foram a pluviosidade e a temperatura. As altas severidades observadas são causadas, predominantemente, por ascósporos. O progresso da doença ajustou-se melhor ao modelo monomolecular tanto na época das chuvas quanto na época seca. Foi possível correlacionar a concentração de ascósporos com a severidade da doença após 15 dias das contagens. As condições ótimas para o estabelecimento da doença situam-se entre 24°C e 27°C, com 24 horas de molhamento foliar. Ajustou-se o semivariograma isotrópico esférico para sigatoka-negra com moderada dependência espacial e alcance de 25,26 m. Os Mapas de krigagem demonstraram um padrão agregado e da relação negativa da severidade da doença com os teores de potássio e o boro, e positiva com teores de ferro, magnésio e enxofre no solo.

Palavras-chaves: *Paracercospora fijiensis*. Banana. Epidemiologia.

GENERAL ABSTRACT

Spore isolate and dissemination diversity of *Mycosphaerella fijiensis* are influenced by environmental factors making possible the occurrence of different degrees of virulence in various climatic conditions, besides the natural susceptibility of the main varieties, enabling the mineral nutrition to influence the incidence of the disease. The objective of this work was to compare the morphology and pathogenicity of isolates of *M. musicola* with isolates of *M. fijiensis*. To test specific microsatellite primers of the species *M. musicola* for their differentiation with *M. fijiensis* isolates, originating from different areas of Brazil. To verify the seasonal dispersion of spores of *M. fijiensis*, in Vale do Ribeira, São Paulo. To evaluate the effects of the temperature and the foliar wetting on the infectious process of Black Sigatoka. To conduct geostatistic modelling of the Black Sigatoka and to verify its relationship with the soil fertility, in Vale do Ribeira, São Paulo. The isolates of Lavras-MG, Vianópolis-Maça, Goiás, Dourado, MS and Missal-PR presented ability to penetrate and colonize the tissue of the host similar to the isolates of Registro-SP, exhibiting the typical Black Sigatoka symptoms, but all the isolates presented ability to penetrate and colonize the host, however, without the same severity. The primer MmSSR 34 can be employed in the differentiation between *M. musicola* and *M. fijiensis* accurately and efficiency even with mixed infection between the pathogens occurring. The climatic variables most associated to the disease progress were rainfall and temperature. The high severities observed are predominantly caused by ascospores. The progress of the disease adjusted to the monomolecular model in the rainy period as well as in the dry period. It is possible to correlate the ascospore concentration with the severity of the disease after 15 days of countings. The ideal conditions for the establishment of the disease are located between 24°C and 27°C, with 24 h of foliar wetting. The isotropic spherical semivariogram was adjusted for Black Sigatoka with moderate space dependence and reach of 25.26 m. The kriging maps demonstrated an aggregate pattern and negative relationship of the severity of the disease to potassium and B, and positive with levels of F, Mn and S in the soil.

Keywords: *Paracercospora fijiensis*. Banana. Epidemiology

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 A Sigatoka-negra.....	13
2.2 Diagnóstico e sintomatologia.....	15
2.3 Epidemiologia.....	17
2.4 Aerobiologia.....	18
2.5 Relação com a nutrição mineral.....	20
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	22
REFERÊNCIAS.....	23
CAPÍTULO 2 DIFERENCIAÇÃO PATOGÊNICA E MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE SIGATOKA-AMARELA E SIGATOKA-NEGRA.....	28
1 INTRODUÇÃO.....	31
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4 CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 3 DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE <i>Mycosphaerella musicola</i> e <i>Mycosphaerella fijiensis</i> COM MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	42
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

	CAPÍTULO 4 PROGRESSO DA SIGATOKA-NEGRA E DISPERSÃO SAZONAL DE ESPOROS DE <i>Mycosphaerella fijiensis</i> EM BANANAL NO VALE DO RIBEIRA, SÃO PAULO, BRASIL.....	54
1	INTRODUÇÃO.....	57
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4	CONCLUSÕES.....	70
	REFERÊNCIAS	70
	CAPÍTULO 5 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO PERÍODO DE MOLHAMENTO FOLIAR NO PROGRESSO DA SIGATOKA-NEGRA.....	75
1	INTRODUÇÃO.....	78
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	79
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	81
4	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87
	CAPÍTULO 6 MODELAGEM GEOESTATÍSTICA DA SIGATOKA-NEGRA E SUA RELAÇÃO COM A FERTILIDADE DO SOLO.....	90
1	INTRODUÇÃO.....	93
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	95
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
4	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIAS	103

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder; anamorfo: *Pseudocercospora musae* (Zimmerm) Deighton) e a sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet; anormorfo: *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton) são as principais doenças foliares que afetam a produtividade da bananicultura (*Musa* sp.) no mundo. A sigatoka-negra é considerada a mais severa e destrutiva doença da bananeira e, caso não sejam adotadas as medidas necessárias de controle como, a redução de inóculo inicial e os tratamentos fitossanitários, as lesões, tanto em número quanto em extensão substituem a sigatoka-amarela em quatro anos, levando a quadruplicar o número de pulverizações de fungicidas, como em casos ocorridos na América Central (MARIN et al., 2003; OROZCO-SANTOS, 1998).

A ocorrência das duas doenças concomitantemente pode gerar dúvidas na diagnose, mas, com o advento da reação de polimerase em cadeia (PCR), que consiste de um método simples e rápido de amplificar sequências específicas de DNA *in vitro* (HENSON; FRENCH, 1993), tem sido possível diagnosticar, com maior precisão, patógenos ao nível molecular. Considerando a diversidade dos isolados já verificados e a possibilidade de ocorrer diferentes graus de virulência desse patógeno nas diversas condições climáticas verificadas nas regiões produtoras é praticamente impossível evitar a introdução da sigatoka-negra nas demais regiões produtoras de banana no Brasil.

Apesar da importância do patógeno, existem poucas publicações sobre a epidemiologia e a biologia de *M. fijiensis*, assim pouco se conhece dos efeitos das condições climáticas, variações genéticas do patógeno e o tipo de resistência

do hospedeiro (HANADA; GASPAROTO; PEREIRA, 2002; JACOME; SCHUH, 1993), principalmente nas regiões produtoras brasileiras.

As pesquisas com a sigatoka-negra tendem a gerar informações sobre manejo, controle químico, controle cultural, aspectos epidemiológicos e a recomendação de variedades resistentes à doença (CAVALCANTE et al., 2004; CORDEIRO; MATOS, 2006; GASPAROTTO; PEREIRA; PEREIRA, 2003; HANADA; GASPAROTO; PEREIRA, 2004), proporcionando a sustentabilidade necessária para convivência com a doença. Este é o aspecto técnico positivo da presença da doença, o que pode promover avanços na pesquisa e na tecnologia para a bananicultura.

Dessa forma, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar os aspectos epidemiológicos e moleculares da sigatoka-negra.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A bananeira (*Musa* sp.) é originária do sudeste asiático, estando presente em 120 países e ocupando uma área de nove milhões de hectares, destacando-se como a fruta *in natura* mais consumida do mundo, representando um alimento básico e produto de exportação de vários países. O Brasil é o segundo produtor mundial com quase sete milhões de toneladas produzidas anualmente em uma área aproximada de 500 mil ha. Em volume, é a principal fruta *in natura* exportada, ficando em valor atrás apenas da uva, da manga e do melão (BRASIL, 2007).

No estado de Minas Gerais são cultivados, aproximadamente, 40 mil ha de banana, com produção em torno de 550 mil toneladas, principalmente da variedade Prata, fornecendo aos mercados mineiro, carioca e paulista, com a participação na oferta desses estados de 95%, 56% e 64%, respectivamente. O norte de Minas Gerais, localizado no Vale do São Francisco, é responsável por

65,4% da produção estadual desta fruta (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2006). Entre os fatores capazes de reduzir essa produção estão as doenças, as quais demandam o uso sistemático de produtos químicos que, além de aumentar os custos, constituem prática agressiva ao meio ambiente e ao ser humano, podendo, ainda, selecionar raças de patógenos resistentes aos defensivos agrícolas.

2.1 A Sigatoka-negra

A sigatoka-negra (*M. fijiensis*) foi relatada, pela primeira vez, em 1963, no vale de Sigatoka, em Fiji (STOVER, 1976), daí o seu nome. Atualmente é encontrada em praticamente toda a América Central (Guatemala, Panamá, Belize, Honduras, Costa Rica, El Salvador e Nicarágua), no Caribe (Cuba, Jamaica, República Dominicana), na América do Sul (Bolívia, Equador, Venezuela, Colômbia, Peru e Brasil), na América do Norte (México e Estados Unidos – Flórida e Havaí), na África (Zâmbia, Gabão, Camarões, Nigéria, Benin, Togo, Gana, Costa do Marfim, Congo, Burundi, Tanzânia, entre outros), na Ásia (Butão, Taiwan, China, Vietnã, Filipinas, Malásia e Indonésia) e no Pacífico (Papua Nova Guiné, Vanatu, Nova Caledônia) (HENDERSON et al., 2006; MOURICHON; PETER; ZAPATER, 1997; STOVER; SIMMONDS, 1987).

Apesar de ser menos agressiva que a sigatoka-negra, a sigatoka-amarela tem ainda extrema relevância no Brasil, pois, nas regiões produtoras do nordeste, sudeste e sul do Brasil, principalmente nos perímetros irrigados, com baixos índices de pluviosidade e concentração de chuvas, a falta de controle da dessa doença é fator determinante para a baixa produção. A única exceção nessas regiões é o estado de São Paulo onde, assim como na região norte, a sigatoka-negra já prevalece sobre a sigatoka-amarela.

O Vale do Ribeira, na região sul do estado de São Paulo, tem o maior índice pluviométrico do país, favorecendo o desenvolvimento das bananeiras como também o crescimento do agente etiológico da sigatoka-negra (MORAES; FERRARI, 2007). No estado de São Paulo, ela foi constatada em junho de 2004, no município de Miracatu e, concomitantemente, em todos os municípios produtores de banana do estado (FERRARI et al., 2005a; FERRARI et al., 2005b). Esse relato ocorreu seis anos após o primeiro registro da sua ocorrência em bananais da Amazônia Brasileira, em 1998 (PEREIRA; GASPAROTTO; COELHO, 1998), onde o progresso da sigatoka-negra é altamente propício, em função das condições de clima tropical úmido predominante na região (CORDEIRO, 2007).

Segundo Stover e Simmonds (1987), na maioria dos casos onde ocorre a sigatoka-negra, esta passa a ser a doença predominante da cultura da banana, diminuindo a ocorrência da sigatoka-amarela. Na região do Pacífico e em áreas produtoras da América Latina e África, sintomas da sigatoka-amarela são agora raramente observados (MOURICHON; PETER; ZAPATER, 1997). A sigatoka-negra tem maior e mais precoce produção de esporos, crescendo mais rápido em temperaturas mais elevadas, em torno dos 28°C, podendo ser esta a razão do seu prevalectimento sobre a sigatoka-amarela, pois a infecção é mais intensa, ocorrendo maior taxa de progresso da doença, favorecendo o aparecimento mais rápido das manchas e a maior virulência do patógeno (PEREIRA; CORDEIRO; FIGUEIRA, 1999; STOVER, 1983).

Na região sul e nos demais estados do sudeste brasileiro, a sigatoka-negra parece estar passando por um período de adaptação às condições climáticas, sem que novas constatações tenham ocorrido. Segundo Cordeiro (2007), em Santa Catarina, a sigatoka-negra está presente, porém, ainda de forma dispersa no meio da sigatoka-amarela, reforçando a hipótese de que patógeno necessita de um período de adaptação, até que selecione formas

capazes de competir em igualdade de condições com aquelas similares e já adaptadas ao ambiente. Castro, Pereira e Gasparotto (2005) identificaram um foco no sul de Minas, onde a taxa de progresso permaneceu baixa, podendo ser atribuído às condições climáticas não favoráveis, à população do patógeno pouco adaptada à região ou, até mesmo, à falha na identificação, uma vez que a doença não progrediu em local onde a sigatoka-amarela continua altamente agressiva (ROCHA, 2008). Casos de falso positivo ocorreram em Pernambuco e no Rio Grande do Sul (CORDEIRO, 2007).

Moraes et al. (2006) constataram a existência de três cenários distintos, sendo o primeiro caracterizado pela presença exclusiva da sigatoka-negra, o segundo pela coexistência da sigatoka-negra e sigatoka-amarela e o terceiro pela presença apenas da sigatoka-amarela. Eventualmente, especialmente no período de baixas temperaturas, ocorre o reaparecimento da sigatoka-amarela em bananais onde ocorreu o domínio da sigatoka-negra que, nesse período, tem menor incidência. A ocorrência das duas doenças concomitantemente pode gerar dúvidas na diagnose, que pode demorar semanas. Além disso, a diferenciação das espécies com apenas a utilização de caracteres morfológicos é passível de erros.

2.2 Diagnóstico e sintomatologia

A utilização de métodos de diagnose rápidos e precisos é uma ferramenta essencial para a defesa fitossanitária, pois evita a entrada de fitopatógenos em áreas livres de sua ocorrência. O diagnóstico em campo, por meio da sintomatologia, é o método menos preciso, por necessitar de grande experiência e conhecimento do técnico responsável por identificar e diferenciar a sigatoka-amarela da sigatoka-negra.

O diagnóstico visual da sigatoka-negra tem sido realizado com base no quadro de sintomas característicos da doença e nos sinais típicos de *Paracercospora fijiensis* (fase assexuada) e *Mycosphaerella fijiensis* (fase sexuada). Esse diagnóstico tem apresentado algumas limitações, quando se depara com sigatoka-negra e sigatoka-amarela coexistindo na mesma folha, planta ou plantação. Neste caso, torna-se necessária a diferenciação entre os sintomas das doenças e os sinais dos respectivos agentes causais. Na diferenciação dos agentes causais da sigatoka-negra e sigatoka-amarela por exame microscópico, deve-se trabalhar unicamente no estágio anamórfico do patógeno, uma vez que não se observam diferenças morfológicas no estágio teliomórfico, sendo a diferenciação entre os esporos dos dois patógenos difícil, portanto, passível de erros (CORDEIRO et al., 2005).

Vários métodos de diagnóstico surgiram, ao longo dos anos, com o objetivo de identificar corretamente os patógenos, como sintomatologia apresentada em campo, visualização dos esporos ao microscópio ótico, isolamento em meio de cultura e métodos moleculares. Contudo, o diagnóstico mais acurado pode ser obtido por meio de técnicas moleculares baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR), a qual amplifica uma sequência específica do DNA do patógeno. A especificidade dos *primers* deve ser testada com isolados filogeneticamente próximos à espécie em estudo e demais fungos que colonizam o mesmo hospedeiro.

A técnica de PCR atualmente empregada em testes diagnósticos da sigatoka-negra no Brasil não tem sido eficiente, pois nem sempre fornece resultados repetitivos e confiáveis (ROCHA, 2008). Estudos na área da biologia molecular envolvendo a variabilidade genética dos agentes etiológicos da sigatoka-negra e sigatoka-amarela foram realizados, promovendo o desenvolvimento de marcadores moleculares diversos, do tipo RAPD, RFLP e microssatélites, capazes de indicar pequenas diferenças genômicas entre isolados

de diferentes origens (MOREIRA; CORDEIRO; VILARINHOS, 2003; MOLINA et al., 2002), possibilitando a diferenciação dos mesmos.

A erradicação da sigatoka-negra de bananais comerciais de Queensland, Austrália, desde 2001, foi possível graças ao desenvolvimento de testes de diagnose molecular. Adicionalmente à identificação morfológica, esses testes permitiram o rápido e preciso diagnóstico das amostras durante a campanha de erradicação da doença. A elevada especificidade desses testes permitiu diferenciar, em tempo real, as espécies de *M. fijiensis*, *M. musicola* e *M. eumusae*. A técnica passou a ser utilizada em levantamentos, previsão da doença e testes de resistência às doenças foliares causadas por *Mycosphaerella*, resultando, em 2005, no restabelecimento do status de área livre da doença (HENDERSON et al., 2006).

Considerando a diversidade dos isolados já verificados no Brasil e a possibilidade de ocorrerem diferentes graus de virulência desse patógeno nas diversas condições climáticas verificadas nas regiões produtoras de banana no Brasil, torna-se necessário o estudo do comportamento de diferentes variedades de bananeira de interesse comercial e de novas variedades lançadas pelo Programa Nacional de Melhoramento Genético da Cultura da Bananeira. Dessa forma, busca-se auxiliar na elaboração de medidas de manejo visando reduzir os problemas dessa séria ameaça à bananicultura nacional, pois é praticamente impossível evitar a introdução da sigatoka-negra nas demais regiões produtoras de banana no Brasil.

2.3 Epidemiologia

A sigatoka-negra tem o crescimento das lesões e a disseminação dos esporos influenciados fortemente por fatores ambientais, como umidade, temperatura e vento. As infecções ocorrem nas folhas mais novas da planta, no

lado abaxial da folha zero até a três. Após a adesão do esporo é fundamental a presença de água livre e de temperaturas superiores a 21°C, para favorecer a germinação do esporo e o seu crescimento sobre a superfície foliar, ocorrendo a penetração por estômato (STOVER, 1972). As condições ideais para o progresso da sigatoka-negra ocorrem em uma faixa de 25° a 28°C, com umidade relativa alta e período chuvoso prolongado. Segundo Jacome, Schuh e Stevenson (1991), em temperaturas entre 20° e 35°C, os conídios germinam em menos de 24 horas com umidade relativa do ar superior a 92% e os sintomas da doença progridem em um intervalo de 22° e 31°C, com ótimo entre 25° e 28°C (JACOME; SCHUH, 1993).

Os ascósporos são as estruturas de disseminação do patógeno mais importantes em bananais, devido à sua produção em grande número nos pseudotécios, embora os conídios também sejam capazes de disseminar o patógeno, provavelmente influenciada pelo vento, pela chuva e pela água de irrigação. Independentemente das condições ambientais, Hanada, Gasparotto e Pereira (2002) comprovaram que os conídios sobrevivem em diferentes materiais, permanecendo viáveis por até 60 dias.

Em doenças policíclicas, o número de esporos sexuais ou outras estruturas de sobrevivência (inóculo primário) capazes de causar infecções é, normalmente, pequeno, porém, uma vez ocorrida a infecção primária, uma grande quantidade de esporos assexuais (inóculo secundário) é produzida em cada sítio de infecção, os quais são os agentes causais de novas infecções que produzem mais esporos assexuais para formar novas infecções (AGRIOS, 2004). Entretanto, de acordo com Gongáles (1999), os ascósporos, que se desenvolvem em grande quantidade no interior dos peritécios, têm sido considerados como o principal propágulo de disseminação de *M. fijiensis* em bananais.

2.4 Aerobiologia

Lacey (1996) descreve aerobiologia como o estudo de partículas de origem biológica dispersas pelo vento. A primeira citação da palavra aerobiologia data de 1930, pelo americano Fred C. Meier, para descrever um projeto de pesquisa sobre a vida microbiana no ar. Edmonds (1979) conceituou aerobiologia como o estudo dos processos a partir da fonte do inóculo, desde a liberação, dispersão e depósito, até impactos em outros organismos, e os efeitos dos fatores ambientais sobre essas partículas.

Segundo Jacome e Schuh (1993) e Gongáles (1999), tanto os conídios quanto os ascósporos de *M. fijiensis* são as estruturas de disseminação do patógeno. Marin et al. (2003) afirmam que os conídios, especificamente, são formados durante o desenvolvimento dos primeiros estádios da doença (estádio 2 – manchas; estágio 3 – listras e estágio 4 – pontos) e são favorecidos sob condições de elevada umidade, quando ocorre um filme de água livre sobre as folhas. É nesses estádios que ocorre a maior produção de conídios. Já a produção de ascósporos ocorre em tecidos necrosados, durante vários meses, nas folhas em decomposição, ocorrendo numa concentração de 10 a 100 vezes superior à produção de conídios (VARGAS, 1996). A liberação dos ascósporos ocorre a partir dos peritécios, decorrido um período de aproximadamente uma hora após o molhamento.

Stover (1980) afirma que a dispersão dos ascósporos de pequenas áreas com sigatoka-negra para novas áreas, por meio do vento, é muito eficiente e a distância é superior a 50 km. Os conídios não são deslocados pelo vento, sendo o seu principal meio de dispersão a chuva lavando a planta e o impacto das gotas sobre as lesões. Os conídios são, portanto, associados com a dispersão local da doença, durante períodos de elevada umidade, orvalho pesado e frequentes chuvas intermitentes. Já para Gauhl (1994), o fato de *M. fijiensis* produzir relativamente poucos conídios torna os ascósporos os principais agentes para a

disseminação da sigatoka-negra. Entretanto, Jacome, Schuh e Stevenson (1991) afirmam que conídios são capazes de causar significativas quantidades de doença e que os sintomas são idênticos aos causados pela infecção por ascósporos. Conídios tornam-se mais importantes durante períodos secos, quando o progresso da doença é menor, devido às condições climáticas menos favoráveis.

2.5 Relação com a nutrição mineral

A bananeira é uma planta exigente em nutrientes, não só por produzir grande massa vegetativa, mas também por apresentar elevadas quantidades de elementos absorvidos pela planta e exportados para os frutos (SILVA et al., 1999). Nas bananeiras mal nutridas, o lançamento de folhas é lento e, conseqüentemente, as lesões da sigatoka-negra serão visualizadas em folhas cada vez mais novas, mantendo baixa a área foliar verde da planta (CORDEIRO, 2007; OROZCO-SANTOS, 1998). Não existem relatos sobre a influência da fertilidade do solo e a intensidade da doença no campo.

A geoestatística, os sistemas de informação geográfica (SIG) e o sistema de geoposicionamento (GPS) são ferramentas que incrementaram e fortaleceram os modelos de previsão de doenças. A geoestatística busca retirar de dados coletados aleatoriamente suas características estruturais probabilísticas de um fenômeno, detectando a existência de variabilidade e a dependência espacial, interpolando as variáveis estudadas de forma exata e precisa. Para realizar a modelagem geoestatística pode-se utilizar a técnica da krigagem. Essa técnica estima, por meio de médias móveis, valores de variáveis distribuídas no espaço a partir de valores próximos, enquanto considerados como interdependentes por uma função denominada variograma ou semivariograma. No processo básico da

krigagem, a estimativa é feita para determinar um valor médio em um local não amostrado (LANDIM; STURARO, 2002).

Com Mapas de krigagem, Alves et al. (2006) constataram a transmissibilidade da ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*) do algodoeiro por sementes infectadas para as plântulas e, posteriormente, entre plantas no campo, ao longo do tempo e, conseqüentemente, a natureza policíclica da doença. Carvalho (2008) constatou, por meio de Mapas de krigagem, o padrão agregado de doenças de final de ciclo da soja e a relação negativa da severidade com os teores de potássio e o fósforo e relação positiva com o cálcio no solo. Alves et al. (2009) caracterizaram, por meio da krigagem, a distribuição espacial da incidência e severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e da cercosporiose (*Cercospora coffeicola*) na cultivar Catuaí Vermelho IAC-99 (*Coffea arabica* L.). Os Mapas de krigagem possibilitaram a visualização da intensidade das duas doenças, que apresentavam alta correlação estatística baseada no modelo de regressão linear, confirmando a variação espacial.

Ghini et al. (2007) estudaram os possíveis impactos das mudanças climáticas sobre a sigatoka-negra da bananeira, por meio da elaboração de Mapas de distribuição da doença, confeccionados a partir dos cenários disponibilizados pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC). Os Mapas demonstraram que poderá ocorrer redução nas áreas de ocorrência da doença, mas que extensas áreas do país ainda continuarão com condições favoráveis à sigatoka-negra e que as regiões sudeste e sul apresentaram alterações do clima, tornando-o mais úmido e favorável à doença, o que deve significar a necessidade de intensificação das medidas de controle.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos:

- comparar a morfologia e a patogenicidade de isolados de *M. musicola* com isolado de *M. fijiensis*;
- testar *primers* de microssatélite específicos da espécie *M. musicola* para a sua diferenciação com isolados de *M. fijiensis*, oriundos de diferentes regiões do Brasil;
- avaliar os efeitos da temperatura e do molhamento foliar no processo infeccioso da sigatoka-negra;
- verificar a dispersão sazonal de esporos de *M. fijiensis*, no Vale do Ribeira, SP;
- realizar a modelagem geoestatística da sigatoka-negra e verificar sua relação com a fertilidade do solo, no Vale do Ribeira, SP.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

É necessário o conhecimento da biologia de *M. fijiensis*, pois a variabilidade morfológica entre os diferentes isolados pode ocasionar erros de diagnóstico. O uso de *primers* como o MmSSR 34 pode ser empregado na diferenciação entre as duas sigatokas, necessitando mais estudos para aprimorar a técnica de extração de DNA do patógeno a partir da folha infectada, e diminuindo o tempo de coleta do material no campo e resultado do diagnóstico.

O conhecimento das variáveis climáticas que favorecem a dispersão de esporos e a correlação com a intensidade da doença devem ser consideradas no desenvolvimento de um modelo de previsão de epidemias e na seleção de materiais com maior nível de resistência, além da confecção de Mapas de favorabilidade para a Sigatoka-negra, permitindo que o Estado de Minas Gerais se resguarde desta ameaça.

A utilização de defensivos agrícolas na proteção das culturas é cada dia menos aceito pela sociedade. Diante disso, a relação da nutrição mineral e

severidade de doenças, assim como a indução de resistência, destacam-se como perspectivas de sucesso no controle de fitomoléstias. Contudo, para que isso seja possível, estudados mais detalhados sobre a relação da fertilidade do solo e a severidade da Sigatoka-negra são necessários, além de trabalhos sobre eficiência de indutores de resistência para a cultura da banana e os efeitos na sua fisiologia.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier, 2004. 922 p.
- ALVES, M. C. et al. Geoestatística como metodologia para estudar a dinâmica espaço-temporal de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidos por sementes. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p.557-563, nov./dez. 2006.
- ALVES, M. C. et al. Modeling spatial variability and pattern of rust and brown eye spot in coffee agroecosystem. **Journal of Pest Science**, Berlim, v. 82, n. 2, p. 137-148, May 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Banana. **Informativo Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 1, v. 5, p. 4, mar. 2007.
- CARVALHO, E. A. **Modelagem geoestatística da distribuição espacial de doenças do feijoeiro comum e da soja e sua relação com a fertilidade do solo e nutrição mineral de plantas**. 2008. 83p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- CASTRO, M. E. A.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. Primeiro Relato de Ocorrência da Sigatoka-negra em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 668, nov./dez. 2005.
- CAVALCANTE, M. de J. B. et al. Evaluation of cv. Angola under different management systems. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON MUSA HARNESSING RESEARCH TO IMPROVE LIVELIHOODS, 2004, Penang. **Abstract Guide...**Penang: [s.n.], 2004. p. 164-165.

- CORDEIRO, Z. J. M. et al. **Manual para identificação e controle da Sigatoka-negra da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005. 36 p. (Documento, 153).
- CORDEIRO, Z. J. M. Panorama nacional das principais doenças da bananeira. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA (Org.). **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007. p. 165-184.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. de. Dispersão e impacto da Sigatoka-negra sobre a atividade bananeira no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 68-70, 2006. Suplemento.
- CORDEIRO, Z. J. M.; SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L. Black Sigatoka: impact and control strategies. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 370, p. 133-137, 1995.
- EDMONDS, R. L. (Ed.). **Aerobiology: the ecological systems approach**. Stroudsburg: Dowden, Hutchinson & Ross, 1979.
- FERRARI, J. T. et al. Ocorrência da Sigatoka-negra em bananais no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, 133-134, jun. 2005a.
- FERRARI, J. T. et al. Ocorrência de Sigatoka-negra no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 31, p. 33, 2005. Suplemento.
- GARCIA JÚNIOR, D. **Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em função de doses de potássio e cálcio em solução nutritiva**. 2002. 59 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, 2002.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; PEREIRA, M. C. N. Sigatoka-negra: situação atual e avanços obtidos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, 5., 2003, Paracatu. **Anais...** Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p. 28-34.
- GAUHL, F. **Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Micospharella fijiensis* Morelet) on Plantain and Banana (*Musa* spp.) in Costa Rica**. Montpellier: INIBAP, 1994. 120 p.

GHINI, R. et al. Análise de risco das mudanças climáticas globais sobre a Sigatoka-negra da Bananeira no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 197-204, maio/jun. 2007.

GONZÁLES, M. Metodología para la manipulación y cultivo in vitro de *Mycosphaerella fijiensis*. **Manejo Integrado de Plagas**, Turrialba, v. 53, p. i-iv. 1999. (Hoja Técnica).

HANADA, R. E.; GASPAROTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Eficiência de desinfestantes na erradicação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* aderidos à superfície de bananas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 94-96, 2004.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 170-173, mar./apr. 2002.

HENDERSON, J. et al. Black Sigatoka disease: new technologies to strengthen eradication strategies in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Austrália, v. 35, n. 2, p. 181-193, 2006.

HENSON, J. M.; FRENCH, R. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 31, p. 81-109, Sept. 1993.

HIRAGA, S. et al. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiological**, Kyoto, v. 42, n. 5, p. 462-468, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 30 maio 2008.

JACOME, L. H.; SCHUH, W. 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*. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, Ibaraki, v. 70, n. 1, p. 51-59, 1993.

JACOME, L. H.; SCHUH, W.; STEVENSON, R. E. Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 11, p. 1480-1485, Nov. 1991.

LACEY, J. Spore dispersal: its role in ecology and disease: the British contribution to fungal aerobiology. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 6, p. 641-660, 1996.

LANDIM, P. M. B.; STURARO, J. R. **Krigagem indicativa aplicada à elaboração de Mapas probabilísticos de riscos**. Rio Claro: Unesp, 2002. (Texto Didático, 6).

MARIN, D. H. et al. Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 3, p. 208-222, Mar. 2003.

MOLINA, C. et al. Development and application of molecular markers in *Mycosphaerella* populations in Colômbia. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON *MYCOSPHAERELLA* LEAF SPOT DISEASES HELD IN SAN JOSÉ, 2., 2002, Costa Rica. **Proceedings...** Costa Rica: [s.n.], 2002. p. 131-139.

MORAES, W. S. et al. Behaviour of black Sigatoka in banana plantations of the Ribeira Valley, Sant Paul, Brazil. In: REUNIÃO INTERNACIONAL DA ASSOCIAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO EM PESQUISAS SOBRE BANANA NO CARIBE E AMÉRICA TROPICAL, 17., 2006, Joinvile. **Anais...** Joinvile: ACORBAT, 2006. v. 2, p. 656-661.

MORAES, W. S.; FERRARI, J. T. Sigatoka-negra, o constante desafio para a bananicultura: Focos da doença no Sudeste e avanços em diagnose e controle. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA. (Org.). **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007, p. 185-204.

MOREIRA, R. F. C.; CORDEIRO, Z. J. M.; VILARINHOS, A. D. Caracterização genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* por marcadores RAPD. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 29, n. 3, p. 275-277, Mar. 2003.

MOURICHON, X.; PETER, D.; ZAPATER, M. F. Inoculation expérimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture *in vitro*. **Fruits**, Paris, v. 42, n. 4, p. 195-198, Apr. 1987.

OROZCO-SANTOS, M. **Manejo Integrado de la Sigatoka-negra Del Plátano**. México: INIBAP, 1998, 95 p. (Folheto Técnico, 1).

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A. F. da S. Ocorrência da Sigatoka-negra no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 295, 1998. Suplemento.

PEREIRA, L. V.; CORDEIRO, Z. J. M.; FIGUEIRA, A. dos R. Doenças da bananeira. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n. 196, p. 37-47, 1999.

ROCHA, H. S. **Epidemiologia da Sigatoka-amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microssatélites**. 2008. 125 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SILVA, S. de O. et al. Cultivares. In: ALVES, E. J. (Org.). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. 2. ed. Cruz das Almas: Embrapa/CNPMPF, 1999.

SILVA, S. O. Pacovan Ken: nova cultivar de bananeira resistente à sigatoka-negra. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 15, n. 3, p. 15-16, 2002.

STOVER, R. H. **Banana, plantain and abaca disease**. England: Commonwealth Mycological Institute, 1972. 316 p.

STOVER, R. H. Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 53, n. 2, p. 111-114, 1976.

STOVER, R. H. Sigatoka leaf spots of banana and plantains. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 64, n. 8, p. 750-756, Aug. 1980.

STOVER, R. H. The effect of temperature on ascospore germ tube growth of *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Fruits**, Paris, v. 38, n. 9, p. 625-628, Oct. 1983.

STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. **Bananas**. 3. ed. New York: Longman Scientific & Technical, 1987. 468 p.

VARGAS, V. M. M. **Provección y manejo de la Sigatoka-negra**. Caldas: ICA, 1996. 29 p.

**CAPÍTULO 2 DIFERENCIAÇÃO PATOGÊNICA E MORFOLÓGICA
DE ISOLADOS DE *Mycosphaerella musicola* E *Mycosphaerella fijiensis***

RESUMO

As características patogênicas e morfológicas de isolados de Sigatoka-amarela (*Pseudocercospora musae*) obtidos de diferentes regiões geográficas do Brasil foram estudadas objetivando sua diferenciação com o isolado de Sigatoka-negra (*Paracercospora fijiensis*) do Vale do Ribeira, município de Registro, São Paulo. Para determinar as diferenças morfológicas os conídios dos isolados foram avaliados quanto ao comprimento, espessura e número de septos, observados com o auxílio de microscópio óptico. Diferenças estatísticas foram observadas no comprimento (variação de 25 – 90 μm), espessura (variação de 1,25 – 12,5 μm) e número de septos (variação de 0 – 7), evidenciando alta variabilidade morfológica entre os diferentes isolados avaliados. Para a determinação da patogenicidade os isolados foram inoculados em folhas de bananeira (*Musa* spp.) da cultivar Grande Naine por meio de discos de micélio (4 mm de diâmetro), retirados de colônias jovens de cada um dos isolados. Os isolados de Lavras-MG, Goiás, Missal-PR apresentaram habilidade para penetrar e colonizar o tecido do hospedeiro semelhante ao isolado de Registro-SP, exibindo os sintomas típicos da Sigatoka-negra, caracterizados pelo aparecimento de estrias, progredindo para manchas com centros necróticos, mas, todos os isolados apresentaram habilidade para penetrar e colonizar o hospedeiro, entretanto, sem a mesma severidade.

Palavras-chaves: *Musa* spp.. Patogenicidade. Morfologia, Sigatoka-amarela.

ABSTRACT

The pathogenic and morphological characteristics of isolates of Yellow Sigatoka (*Pseudocercospora musae*) obtained from different geographical areas of Brazil were studied aiming at their differentiation with the isolate of Black Sigatoka (*Paracercospora fijiensis*) of the Vale do Ribeira, municipal district of Registro, São Paulo. To determine the morphological differences the conidia of the isolates were appraised as to length, thickness and number of septa, observed with the aid of an optical microscope. There were statistical differences observed in the length (variation of 25 – 90 μm), thickness (variation of 1.25-12.5 μm) and number of septa (variation of 0-7), evidencing high morphological variability among the different isolates appraised. For the determination of the pathogenicity the isolates were inoculated in banana tree leaves (*Musa* spp.) cultivar Grande Naine through mycelium disks (4 mm diameter), removed from young colonies of each of the isolates. The isolates from Lavras-MG, Goiás, Missal-PR presented ability to penetrate and to colonize the tissue of the host similar to the isolates of Registro-SP, exhibiting the typical symptoms of Black Sigatoka, characterized by the emergence of grooves, progressing to stains with necrotic centers, but all the isolates presented ability to penetrate and to colonize the host without, however, the same severity.

Keywords: *Musa* spp.. Pathogenicity. Morphology. Yellow Sigatoka.

1 INTRODUÇÃO

A sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder; anamorfo *Pseudocercospora musae*: (Zimmerm) Deighton) e a sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet; anormorfo: *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton) são as principais doenças que afetam a produtividade da bananicultura. A sigatoka-amarela está disseminada por todo país e, apesar de ser menos agressiva que a sigatoka-negra, continua sendo de extrema relevância, pois as perdas podem chegar, em microclimas favoráveis, a até 100% da produção de frutos. A sigatoka-negra, caso não sejam adotadas as medidas necessárias de controle, pode substituir a sigatoka-amarela em uma área num período de quatro anos, podendo quadruplicar o número de pulverizações de fungicidas, como em casos ocorridos na América Central (MARIN et al., 2003; OROZCO-SANTOS, 1998).

O diagnóstico em campo, por meio da sintomatologia, é o método menos preciso, por necessitar de grande experiência e conhecimento do responsável pela identificação para diferenciar entre os sintomas produzidos pela sigatoka-amarela e sigatoka-negra, dessa maneira, passível de erros. Moraes et al. (2006) constataram a existência de três cenários distintos na distribuição e na ocorrência das duas doenças. O primeiro é caracterizado pela presença exclusiva da sigatoka-negra; o segundo, pela coexistência de sigatoka-negra e sigatoka-amarela e o terceiro, pela presença apenas da sigatoka-amarela. Eventualmente, especialmente no período de baixas temperaturas, ocorre o reaparecimento da sigatoka-amarela em bananais onde ocorreu o domínio da sigatoka-negra que, nesse período, tem menor severidade.

A variabilidade morfológica e patogênica de isolados de *M. musicola* e *M. fijiensis* de diversos países e localidades tem sido avaliada utilizando marcadores patotípicos (variedades diferenciadoras). Estudos realizados na Nova

Zelândia (FULLERTON; OLSEN, 1993) indicaram diferentes padrões de agressividade sobre as diferentes variedades de banana.

Diante desse fato, é pertinente relatar que a ocorrência de *M. fijiensis*, no Sul de Minas Gerais (CASTRO; PEREIRA; GASPAROTTO, 2005), pode ser um caso de falso positivo, uma vez que a doença não progrediu num local em que a sigatoka-amarela continua altamente agressiva (ROCHA, 2008). Uma das explicações para o não estabelecimento do patógeno pode ser as condições climáticas não favoráveis ou uma variante do patógeno pouco adaptada à região ou, até mesmo, falha na identificação, pois a caracterização foi baseada na morfologia do patógeno. Situação similar foi observada no Rio Grande do Sul, onde, inspeções realizadas no ano de 2005, não resultaram na identificação dos possíveis focos da doença, que originaram uma identificação positiva (CORDEIRO, 2007).

Diante do exposto, objetivou-se, com o presente trabalho, determinar a patogenicidade e a caracterização morfológica de isolados de sigatoka-amarela e a possível semelhança com isolado de sigatoka-negra.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os nove isolados foram obtidos de folhas de bananeira ‘Pacovan’, ‘Prata-Anã’ e ‘Grande Naine’ exibindo sintomas típicos de sigatoka-amarela e coletadas em diferentes regiões do Brasil: 1. Lavras, MG; 2. Coronel Pacheco, MG; 3. Porteirinha, MG; 4. Vianópolis-Maça, GO; 5. Vianópolis-Ourinha, GO; 6. São Paulo, SP; 7. Missal, PR; 8. Dourado, Mato Grosso do Sul; 9. Balsas, Maranhão e 10. Registro, SP, sendo este isolado de sigatoka-negra (*M. fijiensis*) oriundo de cultura pura. Pequenos fragmentos retirados da área de transição da lesão, foram tratados com álcool 70%, durante 30 segundos e desinfestados com solução de hipoclorito de sódio, na concentração de 1,5%, por 1 minuto. Em

seguida, os fragmentos foram lavados em duas porções consecutivas de água destilada esterilizada, sendo, logo depois, colocados sobre papel de filtro e transferidos para placas de Petri, com 20 cm de diâmetro, contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA), colocadas em BOD por 25 dias, com o fotoperíodo de 12 horas para o crescimento da colônia.

A caracterização morfológica foi efetuada utilizando-se apenas culturas puras de *M. musicola* que produziram conídios, sendo a avaliação feita com base no comprimento, na espessura e na septação dos mesmos, utilizando o microscópio óptico e a medição em micrometros (μm).

Para o teste de patogenicidade, foram utilizados segmentos de folhas de bananeiras da cultivar Grande Naine, cortadas em tiras de 6,5cm de largura, nas quais procedeu-se à inoculação de todos os isolados de *M. musicola* e do isolado de *M. fijiensis*, com a deposição do inóculo na folha com ferimento: discos de micélio com 4mm de diâmetro, retirados de colônias jovens puras, foram depositados sobre a folha, previamente desinfestada e ferida com estilete flambado, em quatro pontos equidistantes. Para as testemunhas, foram utilizados discos de ágar sem o inóculo, depositados na superfície foliar sobre o ferimento. As folhas inoculadas e as testemunhas foram mantidas em câmaras climatizadas na temperatura de 25°C, por 30 dias, cobrindo-se internamente as bandejas com sacos plásticos, umedecidos com água destilada esterilizada. A avaliação foi efetuada observando-se a presença ou a ausência de sintomas necróticos.

Foram utilizados quatro segmentos de folhas, com quatro ferimentos para cada isolado, totalizando dezesseis repetições. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados estatisticamente e as médias comparadas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Sisvar[®] (FERREIRA, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos nove isolados obtidos de *M. musicola*, quando inoculados em folhas de bananeira sadias pelo método de deposição com fermento foram patogênicos (Figura 1). Após 25 dias da inoculação, foram observadas estrias amareladas com centros necróticos de coloração acinzentada nas folhas. Os sintomas apresentados no teste de patogenicidade foram semelhantes aos obtidos por Rosa e Menezes (2001), que caracterizaram isolados de *M. musicola* do estado de Pernambuco.



Figura 1 Expressão dos sintomas da sigatoka-amarela e sigatoka-negra em folha destacada de bananeira da cultivar Grande Naine.

A colonização do patógeno estendeu-se além do ponto de inoculação, em sentido paralelo às nervuras secundárias. Todos os isolados apresentaram habilidade para penetrar e colonizar o hospedeiro, entretanto, os isolados 1, 5, 7 e 8 exibiram os sintomas com certa semelhança ao isolado 10 (sigatoka-negra) (Figura 2), dificultando a diferenciação por aspectos sintomatológicos. Castro, Pereira e Gasparotto (2005), baseados nos sintomas em folha das cultivares

Prata, Prata-Anã, Nanica e Nanicão e exames ao microscópio ótico, identificaram a presença de *Paracercospora fijiensis*, agente etiológico da sigatoka-negra, nas lesões ou manchas foliares no estado de Minas Gerais.

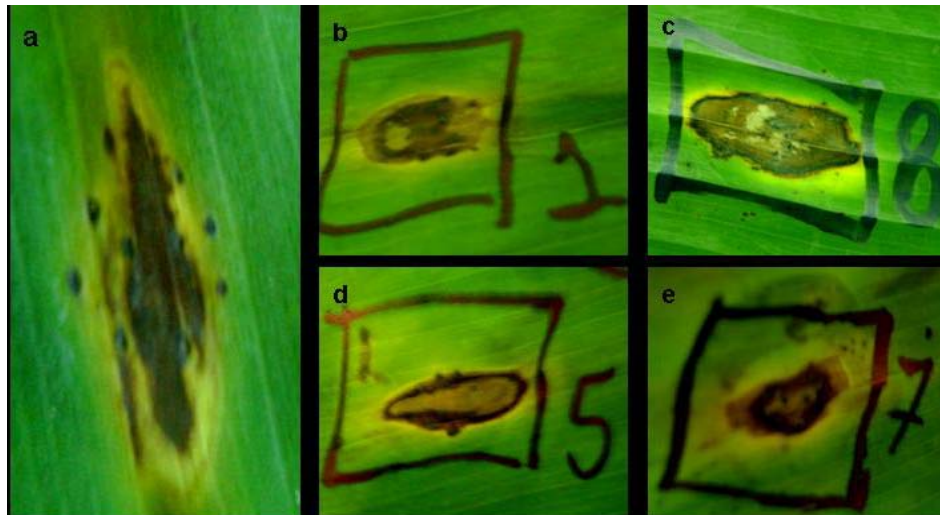


Figura 2 Detalhe da expressão dos sintomas em folha de bananeira da cultivar Grande Naine. a) Isolado de sigatoka-negra, oriundo de Registro, SP; b) isolado de sigatoka-amarela, oriundo de Lavras, MG; c) isolado de Sigatoka-amarela, oriundo de Vianópolis-Maça, Goiás; d) isolado de sigatoka-amarela, oriundo de Missal, PR e e) isolado de sigatoka-amarela, oriundo do Mato Grosso do Sul.

Quanto ao número de septos, a maioria dos isolados apresentou de um a cinco septos, com predominância de três. Com relação a forma foram observados conídios cilíndricos a obclavados-cilíndricos, curvos, hialinos a oliváceos, produzidos em conidióforos retos a ondulados. Características muito próximas às descritas no presente trabalho também foram citadas por Rosa e Menezes (2001), para *M. musicola*. Castro, Pereira e Gasparotto (2005), também utilizaram as características morfológicas dos conidióforos de *P. fijiensis* para realizar a identificação do patógeno, encontrando esporos que mediram, no

comprimento, 6,25 a 16,5 μ m e 4 a 7 μ m de largura, com formas predominantemente obclavadas a obclavadas-cilíndricas, retos ou curvos, hialinos a claro-oliváceos, com 1 a 10 septos, predominando 5 septos. Estas características morfológicas foram próximas às relatadas neste trabalho para *M. musicola* (Tabela 3), demonstrando que o diagnóstico baseado em características morfológicas ou sintomatologia pode gerar dúvidas e erros. Contudo, essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 3 Tamanho (μ m), comprimento (C), largura (L), relação C/L e septação dos conídios de *Mycosphaerella musicola*.

Isolado	C		L		C/L	Número de septos
	Variação	Média*	Variação	Média		Predominância
1	25-67,5	45,5	5-12,5	8,4	5,42	3 (40%)
2	30-75	49,7	5-12,5	8,7	5,72	2 (40%)
3	25-77,5	48,9	5-12,5	7,7	6,35	3 (40%)
4	25-90	49,6	5-12,5	8,8	5,64	3 (36%)
5	40-80	59,3	5-10,0	7,0	8,47	3 (48%)
6	25-75	50,6	5-12,5	7,7	6,57	3 (40%)
7	32,5-90	67,0	5-10,0	7,0	9,57	3 (28%)
8	37,5-82,5	49,1	5-12,5	8,1	6,06	2 (42,5%)
9	35-80	57,7	1,5-7,5	2,8	20,8	1 (50%)

* Média de 25 conídios/isolado; médias não significativas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A presença do hilo basal conspícuo na extremidade dos conídios de *P. fijiensis* é a única característica marcante e diferenciadora da Sigatoka-negra em relação à sigatoka-amarela. Os fungos *M. fijiensis* e *M. musicola* são heterotáticos, o que obriga a troca de material genético, gerando a variabilidade genética dentro das populações dos fungos (CARLIER et al., 2003). No caso de isolados de *M. musicola*, a alta variabilidade genética detectada pode ser justificada pelo longo período que o patógeno encontra-se no país, além da sua

reprodução sexuada (MONTARROYOS, 2005). As características morfológicas e culturais são influenciadas pelo ambiente, que favorece também o estabelecimento e o aumento da variabilidade genética das populações dos patógenos no Brasil. Esta pode ser uma das razões por falsos positivos observados em alguns laudos emitidos, como nos casos de Minas Gerais, Pernambuco e Rio Grande do Sul (CORDEIRO, 2007).

4 CONCLUSÕES

É possível evidenciar variabilidade morfológica entre os diferentes isolados avaliados, o que torna necessário um conhecimento aprofundado da biologia do patógeno.

Há semelhança entre os sintomas de sigatoka-negra e sigatoka-negra nas folhas inoculadas.

REFERÊNCIAS

CARRIER, J. et al. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON MYCOSPHAERELLA LEAF SPOT DISEASES HELD IN SAN JOSE, 2002, Costa Rica. **Proceeding...** Montpellier: INIBAP, 2003. p. 123-129.

CASTRO, M. E. A.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. Primeiro relato de ocorrência da Sigatoka-negra em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 668, nov./dez. 2005.

CORDEIRO, Z. J. M. Panorama nacional das principais doenças da bananeira. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA (Org.). **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007. p. 165-184.

FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 6**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2003. 32 p.

FULLERTON, R. A.; OLSEN, T. L. Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain New Zealand. **Journal of Crop and Horticultural Science**, Wellington, v. 23, n. 1, p. 23-48, Jan. 1995.

MARIN, D. H. et al. Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 87, n. 2, p. 208-222, Feb. 2003.

MONTARROYOS, A. V. V. **Análise da diversidade genética e patogênica de *mycosphaerella fijiensis* e *mycosphaerella musicola* no Brasil**. 2005. 182 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

MORAES, W. da S. et al. Behaviour of black Sigatoka in banana plantations of the Ribeira Valley, Sant Paul, Brazil. In: REUNIÃO INTERNACIONAL DA ASSOCIAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO EM PESQUISAS SOBRE BANANA NO CARIBE E AMÉRICA TROPICAL, 17., 2006, Joinvile. **Anais...** Joinvile: ACORBAT, 2006. v. 2, p. 656-661.

OROZCO-SANTOS, M. **Manejo Integrado de la Sigatoka-negra Del Plátano**. Mexico: INIBAP, 1998. 95 p. (Folheto Técnico, 1).

ROCHA, H. S. **Epidemiologia da Sigatoka-amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microssatélites**. 2008. 125 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ROSA, R. C. T.; MENEZES, M. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de *Pseudocercospora musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 141-147, mar./abr. 2001.

**CAPÍTULO 3 DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE
Mycosphaerella musicola e *Mycosphaerella fijiensis* COM MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

RESUMO

Tendo em vista a importância da sigatoka-negra, faz-se necessário o diagnóstico preciso e confiável para auxiliar na elaboração de medidas de manejo e evitar a introdução da sigatoka-negra nas regiões ainda livres deste patógeno. O diagnóstico em campo, por meio da sintomatologia, é o método menos preciso, por necessitar de grande experiência e conhecimento do técnico responsável pela identificação para diferenciar entre os sintomas produzidos por sigatoka-amarela e sigatoka-negra. Dessa forma, objetivou-se, com a realização do presente trabalho, avaliar a eficiência de marcadores microssatélites na diferenciação de isolados de *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola*, provenientes de diferentes regiões brasileiras. Foram utilizados 11 isolados de *M. musicola* e 19 isolados de *M. fijiensis*, representativos das diversas regiões produtoras de banana no Brasil. Para a extração do DNA dos isolados de *M. fijiensis* foi utilizado o método CTAB. Na reação de PCR foi utilizado um par de *primers* microssatélites, escolhido de um conjunto de 26 marcadores polimórficos de microssatélites, considerados prováveis promissores na diferenciação entre as sigatokas negra e amarela. Estes *primers* foram denominados Mm SSR34A e Mm SSR34B. Os *primers* amplificaram um fragmento de, aproximadamente, 550pb para os 19 isolados de *M. fijiensis* estudados. Os resultados apresentados neste trabalho evidenciam a eficiência desse marcador na diferenciação entre as duas sigatokas, uma vez que a banda de, aproximadamente, 260pb somente ocorreu para os isolados de sigatoka-amarela e, ainda, o anelamento dos *primers* também diferenciou os controles de sigatoka-negra.

Palavras-chaves: Biologia molecular. Diagnóstico. Microssatélites

ABSTRACT

Considering the virulence of Black Sigatoka the precise and reliable diagnosis is necessary to aid in the elaboration of management measures and to avoid the introduction of the Black Sigatoka in the areas still free from this pathogen. The in field diagnosis, through the symptomatology is the least precise method, due to the need for great experience and the knowledge of technician responsible for the identification to differentiate between the symptoms produced by the Yellow Sigatoka and Black Sigatoka. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the efficiency of microsatellite markers in the differentiation of isolates of *Mycosphaerella fijiensis* and *Mycosphaerella musicola*, from different Brazilian areas. 11 isolates of *M. musicola* and 19 isolates of *M. fijiensis*, representative of the various banana producing regions in Brazil were used. For the extraction of *M. fijiensis* isolate DNA the CTAB method was used. In the PCR reaction a pair of microsatellite primers chosen from a group of 26 polymorphic microsatellite markers was used, considered probably promising in the differentiation between the Black and Yellow Sigatokas. These primers were denominated Mm SSR34A and Mm SSR34B. The primers amplified a fragment of approximately 550pb for the 19 isolates of *M. fijiensis* studied. The results presented in this work evidence the efficiency of that marker in the differentiation between the two Sigatokas, since the band of approximately 260pb only occurred for the isolate of Yellow Sigatoka and the annealment of the primers also differentiated the controls of Black Sigatoka.

Keywords: Molecular biology. Diagnosis. Microsatellite

1 INTRODUÇÃO

A sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola* Leach) e a sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) Deighton) são as principais doenças foliares que afetam a produtividade da bananeira no mundo. Nas regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil, principalmente nos perímetros irrigados, com baixos índices de pluviosidade e concentração de chuvas, a sigatoka-amarela continua sendo fator determinante para a baixa produção. A única exceção nessas regiões é o estado de São Paulo, no qual, assim como ocorre na região norte, a sigatoka-negra já prevalece sobre a sigatoka-amarela.

Considerando a virulência da sigatoka-negra, faz-se necessário o diagnóstico preciso e confiável para auxiliar na elaboração de medidas de manejo visando reduzir os problemas dessa séria ameaça à bananicultura nacional, pois dificilmente será possível evitar sua introdução nas regiões ainda livre deste patógeno. O diagnóstico em campo, por meio da sintomatologia, é o método menos preciso, por necessitar de grande experiência e conhecimento do técnico responsável pela identificação para diferenciar entre os sintomas produzidos pela sigatoka-amarela e sigatoka-negra. Já o diagnóstico visual tem apresentado algumas limitações quando se depara com a coexistência da sigatoka-negra e sigatoka-amarela na mesma folha, planta ou plantação. Neste caso, a diagnose dos agentes causais por exame microscópico deve ser trabalhada unicamente no estágio anamórfico do patógeno, uma vez que não se observam diferenças morfológicas no estágio teliomórfico, sendo a diferenciação entre os esporos dos dois patógenos difícil e passível de erros (CORDEIRO; PEREIRA; GASPAROTTO, 2005).

Segundo Moraes et al. (2006), podem ocorrer três situações distintas em uma determinada área, a primeira caracterizando-se pela presença exclusiva da sigatoka-negra; a segunda, pela coexistência da sigatoka-negra e sigatoka-

amarela e a terceira, pela presença apenas da sigatoka-amarela. Estes cenários podem determinar erros no diagnóstico, mesmo os que utilizam técnicas moleculares, devido à elevada diversidade genética apresentada pelos patógenos no Brasil (MONTARROYOS, 2005). A utilização de um método de diagnose rápido e preciso é uma ferramenta essencial para a defesa fitossanitária, pois evita a entrada de fitopatógenos em áreas livres de sua ocorrência. Estudos na área da biologia molecular envolvendo a variabilidade genética desses fungos foram realizados, promovendo o desenvolvimento de marcadores moleculares diversos, do tipo RAPD, RFLP e microssatélites, capazes de indicar pequenas diferenças genômicas entre isolados de diferentes origens, possibilitando a diferenciação dos mesmos (CARLIER et al., 1994, 1996; MULLER et al., 1997; NEU et al., 1999; MOLINA et al., 2001; MOLINA et al., 2002; MOREIRA; CORDEIRO; VILARINHOS, 2003).

A técnica de PCR atual, empregada em testes diagnósticos da Sigatoka-negra, não tem sido eficiente, pois nem sempre fornece resultados repetitivos e confiáveis (ROCHA, 2008). Castro, Pereria e Gasparotto (2005) identificaram um foco de sigatoka-negra no Sul de Minas, onde a taxa de progresso permaneceu baixa, o que pode ser explicado pelas condições climáticas não favoráveis, a população do patógeno pouco adaptada à região ou, até mesmo, à falha na identificação, uma vez que a doença não progrediu num local em que a sigatoka-amarela continua altamente agressiva.

Casos semelhantes de falso positivo ocorreram em Pernambuco e no Rio Grande do Sul (CORDEIRO, 2007). Montarroyos (2005), utilizando marcadores RAPD, observou que, no Brasil, ocorre elevada diversidade genética entre isolados de *M. musicola*, não ocorrendo correlação entre a origem geográfica do isolado e esta diversidade. Este fato mostra que, devido a essa diversidade genética das populações de *M. fijiensis* e *M. musicola*, os métodos moleculares

utilizados na diferenciação dos patógenos necessitam de mais estudos para serem aperfeiçoados.

Dessa forma, objetivou-se, com a realização do presente trabalho, avaliar a eficiência de marcadores microssatélites na diferenciação de isolados de *M. fijiensis* e *M. musicola*, provenientes de diferentes regiões brasileiras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 11 isolados de *M. musicola* e 19 isolados de *M. fijiensis* representativos das diversas regiões produtoras de banana no Brasil (Tabela 1). Devido à inexistência de uma coleção nacional de isolados de *M. musicola* e *M. fijiensis*, foram feitos contatos com órgãos estaduais e federais, e pesquisadores de diferentes instituições com a finalidade de obter amostras dos patógenos, que foram mantidas em meio BDA, por 28 dias, em *biological oxygen demand* (BOD), a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, a partir das quais foram feitas as extrações do DNA.

Para a extração do DNA dos isolados de *M. fijiensis*, foi utilizado o método CTAB, descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), com modificações, para a extração de DNA a partir de colônias fúngicas crescidas em meio BDA. Coletaram-se 150 mg do micélio de cada isolado, os quais foram macerados com nitrogênio líquido em tubos ependorf (1,5 mL), juntando-se ao macerado 700 µL do tampão de extração CTAB 2% (2 g de brometo de centiltrimetil-amônio-CTAB, 10 mL de Tris-HCl 1M, 4 mL de EDTA 0,5M, 8,18 g de NaCl 1,4M, 1 g de polivinilpirrolidona 1% e água pura autoclavada até completar o volume de 100 mL) previamente adicionado de 2-β-mercaptoetanol na proporção de 2%. Em seguida, o macerado foi mantido em banho-maria, a 65°C, por 60 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. Passado este período, adicionaram-se 600 µl da

solução clorofórmio:álcool isoamílico na proporção de 24:1, agitando na mão, por 5 minutos e seguindo para a centrifugação, por 5 minutos, a 12.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 400 µl de isopropanol frio. Este preparado foi, então, agitado gentilmente para a precipitação do DNA e, em seguida, foi centrifugado, por 5 minutos, a 12.000 rpm, para a formação do pellet. O sobrenadante foi descartado e o pellet submetido a duas lavagens com 1 mL de etanol 70% gelado e uma lavagem com 1 mL de etanol absoluto gelado, intercalando-se as lavagens com centrifugações de 5 minutos, a 12.000 rpm. Eliminado o etanol absoluto, na última lavagem, o pellet foi secado a vácuo por 2 minutos e ressuscitado com 30 µl de tampão TE 1X (Tris 1mM, ácido bórico e EDTA 0,1mM pH 8,0).

Na reação de PCR foi utilizado um par de *primers* microssatélites, escolhidos de um conjunto de 26 marcadores polimórficos de microssatélites, testados anteriormente por Rocha (2008) e foram considerados prováveis promissores na diferenciação entre as sigatokas negra e amarela. Estes *primers*, denominados Mm SSR34A e Mm SSR34B (Tabela 2), foram desenvolvidos por Molina et al. (2001) e são específicos para *M. musicola*. Foram utilizados como controles positivos dois isolados de sigatoka-amarela e um de sigatoka-negra e, como controle negativo, um isolado de *Aspergillus* sp.

Cada reação foi feita para um volume total de 20 µL, contendo: 4,0 µL de 5X PCR Buffer; 1,2 µL de MgCl₂ (25mM); 4 µL de dNTPs (10 mM); 1,0 µL de cada *primer*; 0,25 µL da enzima Go Taq DNA polimerase flexi; 1µL do DNA genômico da maioria isolados de *M. fijiensis*, pois foram utilizados concentrados e o DNA dos isolados AM-MAC 112, AM-PC 193, AM-PR 227, AM-PR 230, SP-PR 11 e SP-PR 209 foram diluídos para a concentração de 1:10 em tampão TE 1X. Foi utilizada água pura para completar o volume de 20 µL de reação.

Tabela 1 Isolados de *Mycosphaerella fijiensis* (Mf) e *Mycosphaerella musicola* (Mm), obtidos entre 2007 e 2009, nas diversas regiões produtoras de banana no Brasil.

Código	Localidade	Genótipo	Patógeno
CE – PA	Fortaleza, CE	Prata Anã (AAB)	Mn
CP – NC	Coronel Pacheco, MG	Saquarema (AAA)	Mn
LVR – PR	Lavras, MG	Prata comum (AAB)	Mn
MA – 02	Balsas, MA	Pacovan (AAB)	Mn
MAC - GO	Vianópolis, GO	Maça (AAB)	Mn
MIS – PR	Missal, PR	Prata Anã (AAB)	Mn
MS-PR	Dourados, MS	Prata Anã (AAB)	Mn
PC – PE 2	Machados, PE	Pacovan (AAB)	Mn
POR-PR	Porteirinha, MG	Prata Anã (AAB)	Mn
SP – NC	Tuiui, SP	Nanicão (AAA)	Mn
TR – BA	Gandu, BA	Terra (AAB)	Mn
AC-DA 185	Rio Branco, AC	D'angola (AAB)	Mf
AM-MAC 01	Pres. Figueiredo, AM	Maça (AAB)	Mf
AM-PC 07	Manacapuru, AM	Pacovan (AAB)	Mf
AM-PC 99	Irاندuba, AM	Pacovan (AAB)	Mf
AM-MAC 112	Ben. Constant, AM	Maça (AAB)	Mf
AC-PC 196	Rio Branco, AC	Pacovan (AAB)	Mf
AM-PR 150	Itacoatiara, AM	Prata comum (AAB)	Mf
AM-PC 193	Itacoatiara, AM	Pacovan (AAB)	Mf
AM-PR 227	Irاندuba, AM	Prata comum (AAB)	Mf
AM-PR 230	Irاندuba, AM	Prata comum (AAB)	Mf
RO-CR 175	Porto Velho, RO	Carú Roxa (AAA)	Mf
SP-GN 11	Registro, SP	Grand Naine (AAA)	Mf
SP-PR 202	Pedro de Toledo, SP	Prata comum (AAB)	Mf
SP-PR 204	Miracatu, SP	Prata comum (AAB)	Mf
SP-PR 209	Eldorado, SP	Prata comum (AAB)	Mf
SP-PR 214	Cajati, SP	Prata comum (AAB)	Mf
SP-NA 220	Pariquera-açu, SP	Nanica (AAA)	Mf
SP-FI 222	Pariquera-açu, SP	Figo (ABB)	Mf
SP-PR 240	Pedro de Toledo, SP	Prata comum (AAB)	Mf

O seguinte programa foi utilizado para a reação de PCR: 95°C, por 2 minutos, para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos, a 95°C, por 1', 50°C por 45'' e 72°C por 45'', seguidos de uma extensão final de 7 minutos, a 72°C.

Os produtos obtidos dessa reação de amplificação do DNA foram analisados em gel de agarose a 0,7%, corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain*.

Tabela 2 *Primers* utilizados na diferenciação dos isolados de *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola*. UFLA, Lavras, MG, 2010.

<i>Primers</i>	Sequência 5' – 3'	Amplificação (pb)
Mm SSR 34A	CTCGCTGCCTGATTATTCT	260
Mm SSR 34B	AGATGCCATCGCTTCAC	

Os resultados das amplificações dos diferentes fragmentos de microssatélites, para cada um dos isolados, foram caracterizados quanto à presença ou à ausência de bandas, nos locos correspondentes aos isolados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 são apresentados os fragmentos amplificados pelo par de *primers* Mm SSR34A e Mm SSR34B, para os onze isolados de *M. musicola* e os 19 isolados de *M. fijiensis*. Os *primers* amplificaram segmentos de DNA genômicos de, aproximadamente 260pb para os onze isolados de *M. musicola* estudados (Figura 1A - 13 a 23; 1B – 16 a 26) e esses coadunam com os obtidos por Rocha (2008), quando avaliou a variabilidade genética desses mesmos isolados que são provenientes de diversas regiões brasileiras, utilizando não somente o par de *primers* mencionado como também mais nove pares de *primers* escolhidos de um conjunto de 26 marcadores polimórficos de microssatélites específicos para *M. musicola* desenvolvidos por Molina et al. (2001).

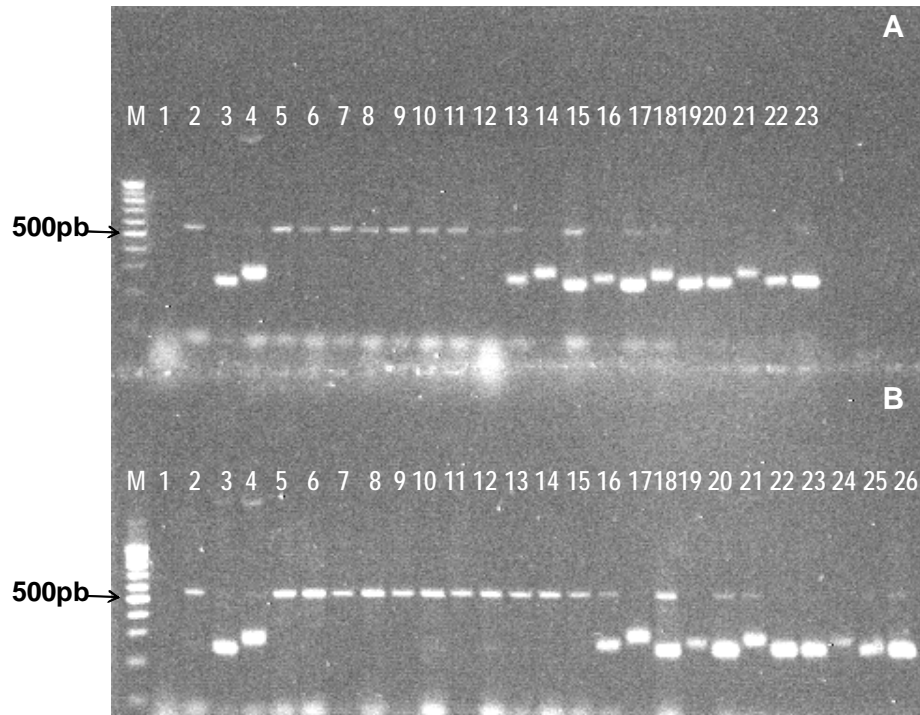


Figura 1 Análise eletroforética das bandas amplificadas com os *primers* de Molina et al. (2001). A) M=marcador 100pb DNA Ladder; 1-Controle negativo; 2-Controle positivo de sigatoka-negra; 3-Controle positivo de sigatoka-amarela (1); 4-Controle positivo de sigatoka-amarela (2); 5-AM-MAC 01; 6-AM-PC 07; 7-AM-PC 99; 8-AM-MAC 112; 9-AM-PR 150; 10-AM-PC 193; 11-AM-PR 227; 12-AM-PR 230; 13-TR-BA; 14-CE-PA; 15-MS-PR; 16-MAC-GO; 17-MIS-PR; 18-MA-02; 19-POR-PR; 20-SP-NC; 21-PC-PE2; 22-CP-NC; 23-LVR-PR. B) M=marcador 100pb DNA Ladder; 1-Controle negativo; 2-Controle positivo de sigatoka-negra; 3-Controle positivo de sigatoka-amarela (1); 4-Controle positivo de sigatoka-amarela (2); 5-SP-GN 11; 6-SP-PR 11; 7-SP-PR 204; 8-SP-PR 209; 9-SP-PR 214; 10-SP-NA 220; 11-SP-FI 222; 12-SP-PR 240; 13-AC-PC 196; 14-AC-DA 185; 15-RO-CR 175; 16-TR-BA; 17-CE-PA; 18-MS-PR; 19-MAC-GO; 20-MIS-PR; 21-MA-02; 22-POR-PR; 23-SP-NC; 24-PC-PE2; 25-CP-NC; 26-LVR-PR.

Os *primers* amplificaram também um fragmento de aproximadamente 550pb para os 19 isolados de *M. fijiensis* estudados. Na Figura 1A estão

apresentados os isolados provenientes de bananais no estado do Amazonas numerados de 5 a 12 e, na Figura 1B, os representantes de São Paulo, numerados de 5 a 12; do Acre, de 13 e 14 e de Rondônia, o 15. Uma observação importante é que a banda de 550pb também ocorreu para alguns isolados de *M. musicola*, como TR-BA, MS-PR, MIS-PR, LVR-PR e MA-02 (Figura 1A e 1B), sugerindo que pode estar ocorrendo infecção mista, ou seja, esses isolados poderiam estar infectados com os dois patógenos ao mesmo tempo.

A infecção mista entre as sigatokas negra e amarela é muito passível de acontecer, pois a diversidade genética é muito grande entre os isolados desses patógenos, não só no Brasil como em várias partes do mundo. Marcadores do tipo microssatélite, específicos para *M. musicola*, foram construídos por Carlier et al. (1994) e Molina et al. (2001). Além desses, marcadores SSR também foram descritos para *M. fijiensis* (NEU et al., 1999), os quais, juntamente com outros métodos de perfil de DNA, baseados em PCR, demonstram ser um método eficiente para comparar populações de *M. fijiensis* quanto de *M. musicola*, possibilitando o estudo da diversidade genética e filogenia, por meio de marcadores de microssatélites.

Carlier et al. (2003) afirmaram que a troca de material genético dentro das populações de *M. fijiensis* e de *M. musicola* é potencializada pela natureza heterotática dos fungos, facilitando a variabilidade genética. A forma da dispersão dos esporos do patógeno e a seleção devido aos hospedeiros resistentes também podem influenciar nessa variabilidade (NAKYANZI, 2002).

Montarroyos (2005) demonstrou, em seu trabalho, a existência de variabilidade entre os isolados de *M. fijiensis* de diferentes regiões geográficas. Contudo, o nível de variabilidade detectado foi baixo, explicado pelo pouco tempo de introdução do patógeno no Brasil, mas, as diferenças genéticas entre os isolados de *M. fijiensis* refletem sua rápida capacidade de recombinação gênica e

adaptação aos diversos ambientes. No caso de isolados de *M. musicola*, a alta variabilidade genética detectada pode ser justificada pelo longo período em que o patógeno encontra-se no país, além da sua reprodução sexuada. Estes fatores favoreceram o estabelecimento e o aumento da variabilidade genética das populações dos patógenos no Brasil, podendo ser esta uma das razões por falsos positivos observados em alguns laudos emitidos, como nos casos de Minas Gerais, Pernambuco e Rio Grande do Sul.

Segundo Muller et al. (1997), quando essa variabilidade é analisada em um país ou continente, pode ocorrer a não correlação com as origens geográficas dos isolados, existindo variabilidade entre e dentro de populações, planta ou lesão. Molina e Kahl (2002), testando diversos marcadores moleculares e o gênero *Mycosphaerella*, concluíram que os marcadores baseados em microssatélites são ideais para análises da biologia e genética de populações. Isso porque esses marcadores, também denominados de repetições de sequência única (SSR), têm sequências curtas com 2 a 5 pares de bases. Os loci de microssatélites apresentam alelos codominantes e são amplificados por iniciadores específicos, o que os torna robustos, de fácil registro e prontamente disponíveis entre grupos de pesquisa. Adicionalmente, eles tendem a ser mais polimórficos do que outros marcadores amplificáveis (SELKOE; TOONEN, 2006), o que facilitaria o trabalho de clínicas fitossanitárias na elaboração de laudos técnicos.

Arzanlou et al. (2007) desenvolveram uma ferramenta rápida e de fácil aplicação para a diferenciação de isolados de *M. fijiensis*, *M. eumusae* e *M. musicola*. Com o uso de *primers* baseados no gene da β -tubulina foi possível desenvolver um diagnóstico para esses fungos utilizando a técnica de PCR em tempo real, possibilitando que, com apenas a amplificação de aproximadamente 142 bp (pares de bases), fosse realizada a identificação dos patógenos, o que não

seria possível com o PCR convencional. Apesar dessas vantagens, a técnica ainda é muito onerosa e trabalhosa, dificultando análises de rotina.

A erradicação da sigatoka-negra de bananais comerciais de Queensland, Austrália, foi possível graças ao desenvolvimento de testes de diagnose molecular. Adicionalmente à identificação morfológica, esses testes permitiram o rápido e preciso diagnóstico das amostras durante a campanha de erradicação da doença. A elevada especificidade desses testes permitiu diferenciar em tempo real as espécies de *M. fijiensis*, *M. musicola* e *M. eumusae*. A técnica passou a ser utilizada em levantamentos, previsão da doença e testes de resistência às doenças foliares causadas por *Mycosphaerella*, resultando, em 2005, no restabelecimento do status de área livre da doença (HENDERSON et al., 2006).

O marcador foi eficiente em diferenciar as duas sigatokas, pois a banda de aproximadamente 260pb somente ocorreu para os isolados de sigatoka-amarela e, ainda, o anelamento dos *primers* também diferenciou os controles de sigatoka-negra (Figura 1A e 1B - 2) e amarela (Figura 1A e 1B - 3 e 4) com as respectivas bandas e o não anelamento no isolado de *Aspergillus* sp. (Figura 1A e 1B - 1) demonstrou a especificidade dos *primers* por espécies de *Mycosphaerella*, podendo, assim, ser utilizados em testes fitossanitários de rotina.

4 CONCLUSÃO

O *primer* MmSSR 34 diferencia a *M. musicola* e *M. fijiensis* com precisão e eficiência, mesmo ocorrendo infecção mista entre os patógenos.

REFERÊNCIAS

- ARZANLOU, M. et al. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 9, p. 1112-1118, Sept. 2007.
- CARLIER, J. et al. DNA restriction fragment length polymorphism in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 7, p. 751-756, July 1994.
- CARLIER, J. et al. Genetic differentiation in *Mycosphaerella* leaf spot pathogens. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON MYCOSPHAERELLA LEAF SPOT DISEASES HELD IN SAN JOSE, 2002, Costa Rica. **Proceedings...** Montpellier: INIBAP, 2003. p. 123-129.
- CARLIER, J. et al. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 499-410, Aug. 1996.
- CASTRO, M. E. A.; PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L. Primeiro relato de ocorrência da Sigatoka-negra em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 668, nov./dez. 2005.
- CORDEIRO, Z. J. M. **Manual para identificação e controle da Sigatoka-negra da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005. 36 p. (Documento, 153).
- CORDEIRO, Z. J. M. Panorama nacional das principais doenças da bananeira. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA (Org.). **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007. p. 165-184.
- HENDERSON, J. et al. Black Sigatoka disease: new technologies to strengthen eradication strategies in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Sidney, v. 35, n. 2, p. 181-193, 2006.
- MOLINA, C. et al. Development and application of molecular markers in *Mycosphaerella* populations in Colômbia. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON MYCOSPHAERELLA LEAF SPOT DISEASES HELD IN SAN JOSÉ, 2., 2002, Costa Rica. **Proceedings...** Costa Rica: [s.n.], 2002. p. 131-139.

MOLINA, C. et al. Microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella musicola*. **Molecular Ecology Notes**, Bath, v. 1, n. 3, p. 137-139, Sept. 2001.

MOLINA, C.; KAHL, G. Genomics of two banana pathogens, genetic diversity, diagnostics, and phylogeny of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*. In: JAIN, S. M. (Ed.). **Banana improvement, cellular and molecular biology, and induced mutations**. Vienna: FAO/IAEA, 2002.

MONTARROYOS, A. V. V. **Análise da diversidade genética e patogênica de *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola* no Brasil**. 2005. 182 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

MORAES, W. da S. et al. Behaviour of black Sigatoka in banana plantations of the Ribeira Valley, Sant Paul, Brazil. In: REUNIÃO INTERNACIONAL DA ASSOCIAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO EM PESQUISAS SOBRE BANANA NO CARIBE E AMÉRICA TROPICAL, 17., 2006, Joinvile. **Anais...** Joinvile: ACORBAT, 2006. v. 2, p. 656-661.

MOREIRA, R. F. C.; CORDEIRO, Z. J. M.; VILARINHOS, A. D. Caracterização genética de isolados de *Mycosphaerella musicola* por marcadores RAPD. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 29, n. 3, p. 275-277, July/Sept. 2003.

MULLER, R. et al. Oligonucleotide fingerprinting detects genetic variability at different levels in Nigerian *Mycosphaerella fijiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, n. 1, p. 25-30 Jan. 1997.

NEU, C. et al. Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 523-525, Mar. 1999.

ROCHA, H. S. **Epidemiologia da Sigatoka-amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microssatélites**. 2008. 125 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 615-629, May 2006.

**CAPÍTULO 4 PROGRESSO DA SIGATOKA-NEGRA E DISPERSÃO
SAZONAL DE ESPOROS DE *Mycosphaerella fijiensis* EM BANANAL NO
VALE DO RIBEIRA, SÃO PAULO, BRASIL**

RESUMO

O conhecimento do progresso da doença é importante para a adoção de estratégias de controle e avaliação dos efeitos das medidas adotadas. Dessa forma, o estudo da análise temporal é bastante útil por integrar os componentes do patossistema, expressos pelos dados acumulados de incidência e severidade e retratados pela curva de progresso da doença. A dispersão de esporos no ar torna-se importante componente para o progresso de epidemias de doenças de plantas em um período próximo ou subsequente. Diante do exposto, objetivou-se, com a realização deste trabalho, avaliar a aerobiologia dos esporos ao longo do ano, na região do Vale do Ribeira, município de Pariquera-açu, SP e sua relação com as condições climáticas. A curva do progresso da sigatoka-negra apresentou dois picos de extrema severidade, tendo o primeiro ocorrido na estação chuvosa e sido predominantemente causado pela elevada concentração de ascósporos no ar. As concentrações de ascósporos apresentaram correlação com a severidade da doença no mesmo dia da coleta de esporos e observada após 15 dias das contagens, o que denota a curta duração média do período de latência da doença naquela região. Os padrões das curvas de severidade, em ambos os picos, ajustaram-se ao modelo monomolecular, sendo as taxas de progresso mais intensas na estação chuvosa do que na seca, apesar de, na região do Vale do Ribeira, serem observadas precipitações durante todos os meses.

Palavras-chaves: Aerobiologia. Sigatoka-negra. Epidemiologia.

ABSTRACT

Complete knowledge about the disease progress patterns is very important in terms of options for the most adequate control measures and to evaluate the effects of these measures. Hence, the study of the temporal analysis is very useful as it integrates the evolution of the interactions among the pathosystem components, expressed by the cumulated incidence and severity data, being summarized by the disease progress curve. The spores dispersed in the air, in a specific pathosystem, constitute important components for the progress of plant disease epidemics in a near or subsequent period. Hence, the aim in this research work was to evaluate the temporal dynamics of Black Sigatoka on the banana plantation at Vale do Ribeira, São Paulo state, simultaneously to the evaluation of the aerobiology of the spores along the year. During the rainy season, there was intense disease progress, but also the rate of leaf emissions were high resulting in a rapid inversion of the severity peak, after having reached the highest rates. The Black Sigatoka disease progress curve presented two distinct peaks of extreme severity, with the first one occurring during the rainy season, predominantly caused by the high levels of ascospores in the air, and the second being verified during the dry season. The ascospore concentrations presented a significant correlation to the severity of the disease observed on same day and after 15 days of the counting, which denotes the average duration of the latency period of the disease in that Region. The patterns of the severity curves in both peaks, adjusted to the monomolecular models, with higher progress rates during the rainy season than in the dry.

Keywords: Aerobiology. Black Sigatoka. Epidemiology.

1 INTRODUÇÃO

A sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) é considerada a mais severa e destrutiva doença da bananicultura (*Musa* sp.) no mundo. A disseminação do patógeno pode ocorrer tanto por conídios quanto por ascósporos. Entretanto, o fato de *M. fijiensis* produzir ascósporos em grande quantidade no interior dos peritécios torna essas estruturas os principais propágulos de disseminação da sigatoka-negra em bananais (GAUHL, 1994; GONGÁLES, 1999; JACOME; SCHUH, 1993; STOVER, 1980). Os ascósporos são produzidos nos tecidos necrosados de folhas em decomposição, durante vários meses, numa concentração de 10 a 100 vezes superior à produção de conídios (VARGAS, 1996). Apesar de serem produzidos em menores quantidades, os conídios são capazes de causar severidade significativa, com sintomas idênticos aos causados pela infecção por ascósporos. A ambos são responsáveis pelas infecções. Mas, na estação seca, a fase sexual passa ser uma fonte de sobrevivência do patógeno e os conídios passam a ser os principais propágulos de disseminação (GASPAROTTO, 2006; JACOME; SCHUH; STEVENSON, 1991).

Considerando as elevadas perdas na produção, geradas pela sigatoka-negra, o estudo da epidemiologia da doença permite conhecer fatores da biologia do fungo e as condições ambientais favoráveis à doença e outras variáveis. De acordo com Moraes et al. (2006), em bananais comerciais do Vale do Ribeira, SP, o controle da sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder), requer seis aplicações de fungicidas ao ano, enquanto no controle da sigatoka-negra foram necessárias nove aplicações, ou seja, com aumento de 50% no custo de proteção. A melhor forma de representar a epidemia de uma doença (infecção, colonização e reprodução) é a curva de progresso, visualizada na forma da proporção de doença ao longo do tempo. A análise temporal integra os

componentes do patossistema, expressos por dados acumulados de incidência e severidade e representados pela curva de progresso da doença (VANDERPLANK, 1963). Conhecer o progresso da doença é importante para a escolha das medidas de manejo, permitindo a criação de modelos de previsão de epidemias, visando aplicações de fungicidas e redução nos custos de produção (PONTE, 2006; SUTTON, 1998; FRY, 1982).

Segundo Nelson e Tung (1973), nenhuma parte do ciclo das doenças exerce maior influência no crescimento da epidemia do que a relação entre a esporulação e a produção de inóculo para subsequente infecção. A concentração ou quantidade de esporos dispersos no ar são altamente influenciadas pelo clima, que afeta a dinâmica dos processos da aerobiologia do patógeno (liberação, transporte e deposição), constituindo importante componente para o progresso de epidemias de doenças de plantas em um período próximo ou subsequente (PONTE, 2006; CAMPBELL; MADDEN, 1990). Contudo, o sucesso dessa quantificação depende do conhecimento do patossistema, dos tipos de propágulos e dos métodos utilizados para quantificá-los.

A utilização de dispositivos para a coleta de esporos proporciona informações valiosas que permitem definir o comportamento da dispersão e quantificar os propágulos dos patógenos, o que é importante para os estudos de correlação com as condições climáticas, pois a dispersão é afetada, principalmente, pelo vento e pela chuva (CORREIA; COSTA, 2005; AITA, 1983).

O Vale do Ribeira, na região sul do estado de São Paulo, possui um dos maiores índices pluviométricos do país, favorecendo tanto o desenvolvimento das bananeiras e também o crescimento do agente etiológico da sigatoka-negra (MORAES; FERRARI, 2007). Naquele mesmo estado, a doença foi constatada em junho de 2004, no município de Miracatu e, concomitantemente, em todos os municípios paulistas produtores de banana (FERRARI et al., 2005a; FERRARI

et al., 2005b). Este relato ocorreu seis anos após o primeiro registro da sua ocorrência em bananais da Amazônia brasileira, onde seu progresso é altamente propício, em função das condições de clima tropical úmido predominante (CORDEIRO, 2007).

Diante do exposto e da importância de informações epidemiológicas sobre a sigatoka-negra, objetivou-se, com a realização deste trabalho, estudar a dispersão de *M. fijiensis* durante o ano e a influência das variáveis ambientais na quantidade de esporos no ar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido durante o período de setembro de 2008 a setembro de 2009, na estação experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Pólo Regional do Vale do Ribeira, município de Pariquera-Açu, no estado de São Paulo, Brasil, cujas coordenadas geográficas são: 24°27' de latitude Sul e 47°48' de longitude Oeste. A área experimental total do bananal era de 0,5 ha, plantado com a variedade Prata comum, pertencente ao subgrupo Prata (AAB), em espaçamento 3 x 3 m em fileiras simples. A escolha do local se deu em função da elevada severidade dos sintomas de sigatoka-negra e, também, pelo fato de não haver qualquer medida de controle da doença, permitindo, assim, estudar o progresso da epidemia em condições naturais.

Para avaliar o progresso da doença foram marcadas dez plantas, aleatoriamente, nas quais foi avaliada semanalmente a severidade e o ritmo de emissão foliar nas folhas 2,3 e 4, seguindo a metodologia do CIRAD (1972) para avaliar a severidade da sigatoka-amarela, e, posteriormente, adaptada por Fouré (1988), para a sigatoka-negra e modificada por Moraes et al. (2005). As modificações foram: simplificar os estádios de desenvolvimento dos sintomas e

calcular o saldo de folhas funcionais, a cada semana, anotando-se o número da primeira folha morta. Os valores da escala foram assim definidos: 0 - sem sintomas; 1 - ponto; 2 - traço; 3 - estria; 4 - mancha negra; 5 - mancha negra com halo amarelo e 6 - mancha negra com centro necrosado. Os três primeiros estádios de coloração marrom café são observados na superfície inferior da folha e os demais, na superior. O estádio I, por apresentar maior dificuldade de visualização, foi redefinido com variações que vão desde uma minúscula descoloração ou despigmentação até a formação de um ponto cheio, de formato circular com diâmetro inferior a 100 μ m e coloração marrom-café, visualizado apenas com lentes com aumento de vinte vezes. As avaliações foram efetuadas semanalmente, juntamente com a coleta de dados climatológicos, fornecidos pela estação climatológica instalada na sede da fazenda experimental da APTA Pólo Regional do Vale do Ribeira.

O monitoramento da concentração de esporos de *M. fijiensis* dispersos no ar, na área do bananal, foi realizado com o coletor Rotorod Sampler modelo 20, dotado de duas hastes coletoras de acrílico transparente, com dimensões de 1,52 x 1,52 x 22 mm, instaladas verticalmente em relação ao eixo de rotação circular, posicionado a 1,5 m do nível do solo. As hastes foram untadas com vaselina líquida para a retenção dos esporos do fungo. Para se obter a medida da concentração de esporos, foi utilizada a fórmula $C = P/V$, sendo P a quantidade de esporos mensurada e V o volume de ar amostrado.

Nas condições experimentais, o equipamento foi ligado durante 15 minutos a cada hora, tendo sido amostrado o volume de 0,00632 m³ de ar. Todas as coletas ao longo do ano foram realizadas em um único local, tendo sido posicionado o coletor aleatoriamente no centro do bananal, sendo, portanto representativo de toda a área. As coletas foram realizadas a cada 15 dias, iniciando-se às 7h00 e finalizando às 9h00, seguindo metodologia de Burt (2003). As contagens foram realizadas em laboratório, em microscópio óptico,

com a objetiva de aumento de 40x. Foram feitas correlações entre as concentrações de esporos com os índices de infecção em vários períodos, por meio do teste de correlação de Pearson, no programa estatístico SAS (The SAS System for Windows, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

Os dados de índice de infecção foram ajustados, por meio de análise de regressão não-linear, aos modelos exponencial, logístico, monomolecular e de Gompertz. Para a escolha do melhor modelo considerou-se o coeficiente de determinação ajustado da análise de regressão (R^2), o valor do quadrado médio dos desvios (obtido na análise de variância) e o Gráfico de resíduos padronizados (Yobs-Yesp.) em função da variável independente (CAMPBELL; MADDEN, 1990). As taxas de progresso da doença das curvas de índice de infecção foram estimadas pelo parâmetro b da equação de regressão, obtidas a partir do modelo de melhor ajuste.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas avaliações iniciais, em setembro de 2008, as concentrações de ascósporos foram em torno de 1.478 ascósporos/m³ de ar (Gráfico 1). Entretanto, a armadilha para a captura dos esporos foi localizada entre as plantas e não sobre as mesmas, observou-se maior eficiência para quantificar os ascósporos, pois, ao contrário do observado por Burt et al. (1997), em todas as coletas, verificou-se concentração de ascósporos muito superior à de conídios. Para que ocorra a disseminação dos conídios é necessária a ocorrência de um filme d'água livre sobre as folhas, sendo dispersos por respingos e gotejamentos. Já os ascósporos necessitam apenas de uma atmosfera com elevada umidade relativa, sendo dispersos pelo vento (STOVER; SIMMONDS, 1987).

A produção de ascósporos é mais intensa na época chuvosa, que favorece a produção e liberação das estruturas reprodutivas (SANDOVAL,

1998). As condições climáticas predominantes na região são temperaturas e precipitações elevadas, com umidade relativa alta, situação comum numa região litorânea (CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - CIIAGRO, 2009), provavelmente sendo esta a razão para a maior produção de ascósporos e, considerando o fato dos poucos conídios, estes não tenham encontrado as condições ideais para a ocorrência de germinação e penetração e posterior disseminação.

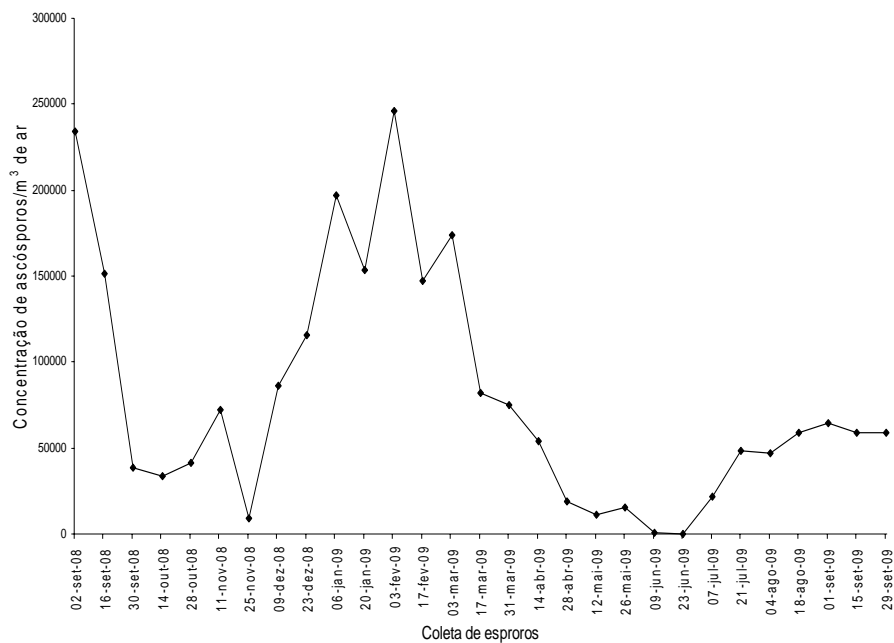


Gráfico 1 Concentração de ascósporos de *M. fijiensis* no vale do Ribeira, SP, no período de 2 de setembro de 2008 a 29 de setembro de 2009.

Para o ajuste da curva de progresso da severidade da sigatoka-negra ao modelo não-linear, dividiu-se o período de avaliação em dois segmentos

distintos, A e B (Gráfico 2). O primeiro segmento da curva (Gráfico 2-A) representou 26 semanas, durante o período de 14 de outubro de 2008 a 7 de abril de 2009. Foi verificada, na última semana de fevereiro de 2008, em pleno verão, a maior severidade, acumulando o valor 3166 na escala de Moraes et al. (2005). O segundo segmento (Gráfico 2-B), submetido ao ajuste, teve o período ocorrido dia 14 de abril a 29 de setembro de 2009.

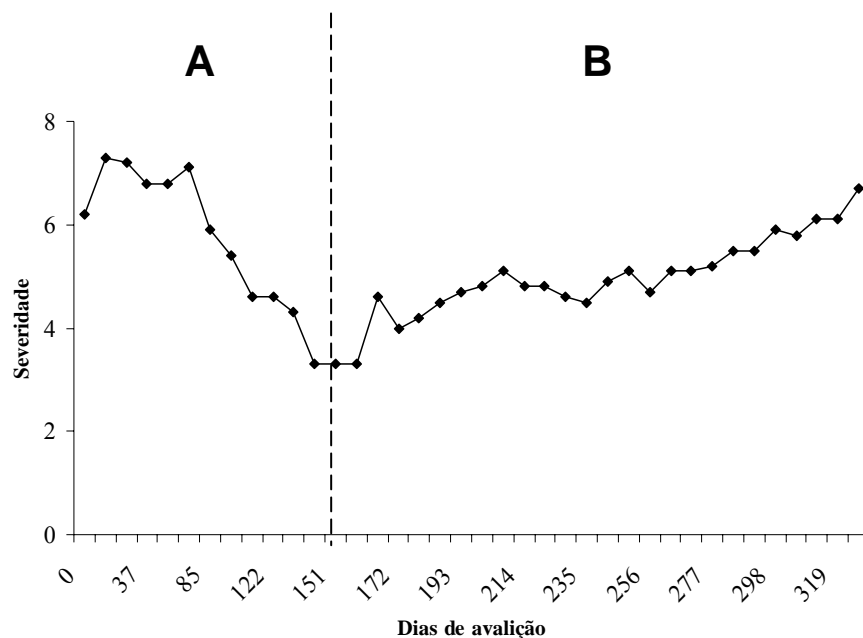


Gráfico 2 Progresso da sigatoka-negra em bananal no Vale do Ribeira, SP, sendo A do período de 2 de setembro de 2008 a 7 de abril de 2009 e B de 14 de abril a 29 de setembro de 2009.

Os melhores ajustes para a epidemia foram verificados para o modelo monomolecular (Tabela 1). Estes ajustes basearam-se em função dos menores resíduos e nos maiores coeficientes de determinação (R^2). Apesar de, em ambas

as fases, terem ajustado para o modelo Monomolecular, quando se comparam as duas, nota-se menor taxa diária de progresso da doença no primeiro pico ($dy/dt = 0,04$) do que no segundo pico da doença ($dy/dt = 0,06$). Esse fato está relacionado às condições climáticas favoráveis, no verão principalmente, devido ao grande volume de chuvas que possibilitaram maior produção e disseminação de ascósporos continuamente ao longo dos três primeiros meses do ano.

Tabela 1 Ajuste de modelos lineares para descrever as taxas estimadas de progresso da severidade da sigatoka-negra da bananeira, em dois períodos distintos.

Modelos	R	y0	yf	R²	QMR
A - Período: 14/out/2008 – 07/Abril/2009					
Logístico	0,0050	0,0806	-3,23	0,73	0,2263
Monomolecular	0,0003	0,0760	0,04	0,82	0,0006
Gompertz	0,0017	0,0792	-1,18	0,76	0,0222
Exponencial	0,0050	0,0809	0,04	0,73	115,80
B - Período: 14/abril/2009 – 29/set/2009					
Logístico	0,0030	0,0396	-2,72	0,82	0,1200
Monomolecular	0,0001	0,0390	0,06	0,81	0,0003
Gompertz	0,0008	0,0395	-1,03	0,82	0,0115
Exponencial	0,0025	0,0397	0,06	0,82	233,30

Moraes et al. (2006) demonstram o efeito aditivo e conjunto da precipitação e da temperatura média mínima e média máxima na estimativa do progresso da severidade da sigatoka-negra na região do Vale do Ribeira, SP. Os autores relatam, ainda, que, na região do Vale do Ribeira não existe um período seco definido e a severidade da doença pode atingir níveis menores no inverno e

maiores no verão, certamente influenciados pelas temperaturas mínimas e máximas, respectivamente.

A partir de meados de outubro, as concentrações de ascósporos reduziram-se, com tendência seguida até o final de novembro (Gráfico 1). Entre os meses de setembro a novembro de 2008 houve predomínio de temperatura média e precipitação baixas durante o ano de coleta de esporos (Gráfico 3), tendo acarretado um decréscimo, tanto na concentração de ascósporos quanto dos índices de infecção. Ao final de novembro, com o aumento da temperatura média e a ocorrência das chuvas da primavera, as concentrações de ascósporos voltaram a subir (Gráfico 1). Mesmo com a redução da precipitação, a média de chuva na região ficou acima dos 120 mm, com umidade relativa de 96,5 e temperatura média em torno dos 17°C (Gráfico 03), condições favoráveis para a produção de ascósporos e o progresso da doença.

Durante o período de dezembro de 2008 e março de 2009, as variáveis climáticas temperatura média, precipitação e umidade relativa foram mais favoráveis ao progresso da doença, resultando em dois picos distintos de severidade, sendo o primeiro observado no verão de 2009 (26,2°C de temperatura média, 78,0% de umidade relativa média e 1.713 mm de pluviosidade) e o segundo entre abril e setembro de 2009 (23,7°C de temperatura média, 82,9% de umidade relativa média e 769 mm de pluviosidade).

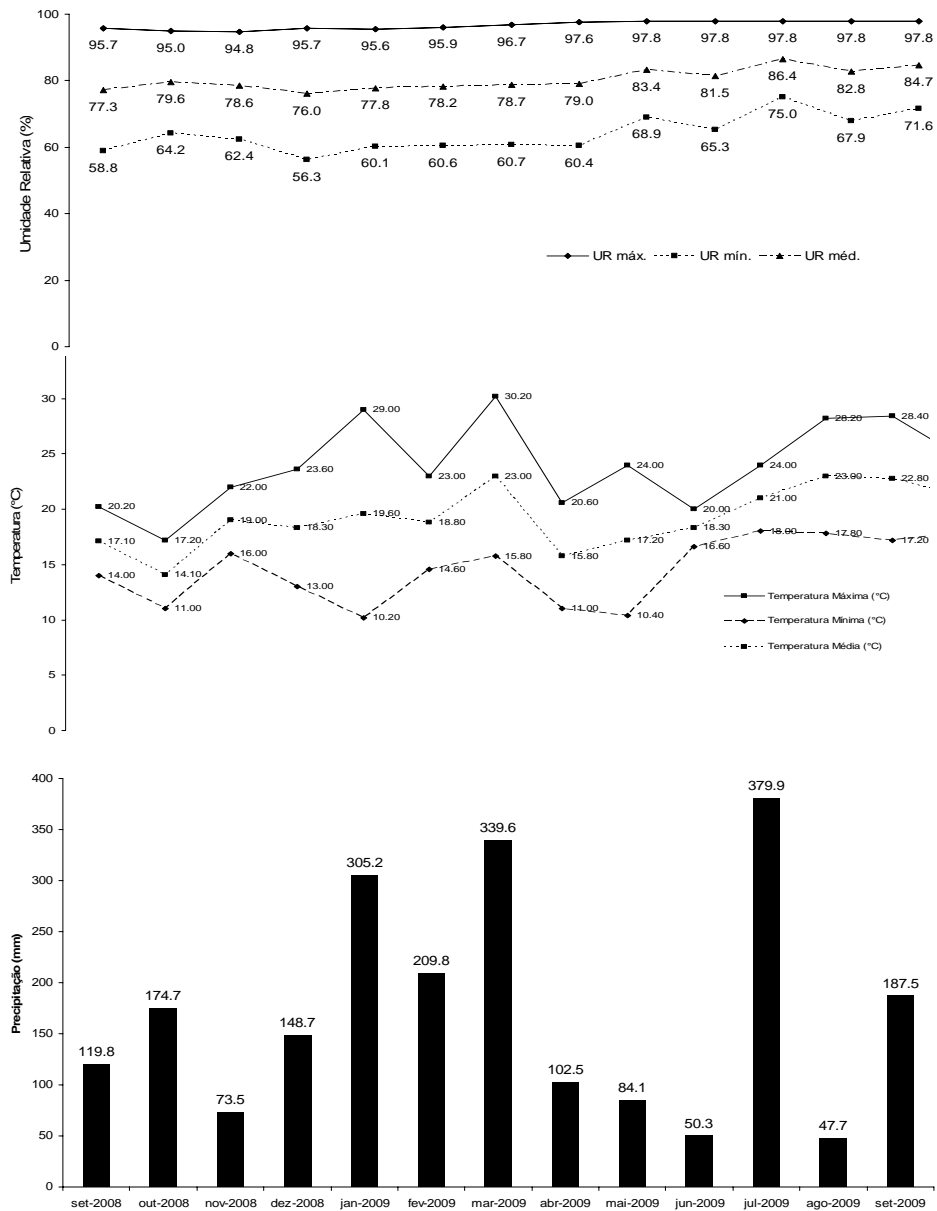


Gráfico 3 Umidade relativa (%), temperatura (°C) e precipitação (mm) em bananal no Vale do Ribeira, SP, no período de setembro de 2008 a setembro de 2009.

As maiores concentrações de esporos foram observadas logo após os meses de novembro e dezembro, períodos com menores volumes de chuva. O mesmo resultado foi observado por Burt et al. (1999) que relataram esporos sendo liberados em maior quantidade nas primeiras chuvas, após um período seco. O clima foi determinante para a oscilação na produção dos ascósporos, os quais por sua vez, resultaram nos picos de severidade da doença. Nesse sentido, Calpouzos et al. (1962, 1964), em Porto Rico, relataram que a chuva é bastante importante na previsão da doença, chegando a recomendar pulverizações sempre que fosse registrada, nas três semanas precedentes, uma precipitação igual ou superior a 76 mm. Igualmente, Mass (1976) verificou correlação elevada entre a frequência de chuviscos e o aparecimento de manchas na fase de estrias em cerca de três semanas.

Leach (1941) relatou que a produção de ascósporos por lesão foliar é consideravelmente menor do que a de conídios, contudo, a descarga de ascósporos pode ocorrer devido à elevação da umidade relativa, não sendo dependente de um filme de água livre sobre a lesão foliar. Ascósporos podem ser liberados mesmo a partir das folhas mais baixas da planta, que não são atingidas pelo orvalho, ao passo que conídios não são. O autor menciona, ainda, que a faixa de temperatura ideal para a ocorrência dessa liberação situa-se entre 21,1° e 28,91°C.

As correlações positivas entre as variáveis pluviosidade e temperatura média e os índices de infecção (Tabela 2), que são justamente as variáveis responsáveis pela água livre nas folhas, foram registradas no mesmo dia e em períodos anteriores a 15 dias da coleta de esporos. Isso, provavelmente, ocorreu devido ao curto período de incubação do fungo, resultando em severidade efetiva apenas após 15 dias da ocorrência dos eventos climáticos. Além disso, foram observadas correlações positivas entre a pluviosidade, temperatura média e os índices de infecção também aos 30 e 45 dias anteriores a coleta de esporos,

mas em menor intensidade. Entre a umidade relativa média e o índice de infecção da epidemia a correlação foi negativa, mas não foi significativa (Tabela 2).

Tabela 2 Correlação da coleta de ascósporos de *M. fijiensis* entre as variáveis climáticas (precipitação, temperatura média, umidade relativa média) em cinco períodos distintos. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Coleta de ascósporos	Precipitação (mm)	Temperatura média (°C)	Umidade relativa Média (%)
Mesmo dia	0,47*	0,48*	-0,26
15 dias antes	0,31	0,40*	-0,07
30 dias antes	0,26	0,27	0,01
45 dias antes	0,21	0,29	-0,16
60 dias antes	0,01	0,09	-0,04

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Os fatores climatológicos mais associados à ocorrência de sigatoka-negra são a umidade relativa e a temperatura. Via de regra, a doença atingiu seu ponto de máxima de severidade durante os períodos de temperaturas mínimas e máxima umidade relativa. Em geral, a disseminação de propágulos fúngicos anemófilos está diretamente relacionada com os índices de pluviosidade (CORREIA; COSTA, 2005).

A correlação entre a concentração de ascósporos no ar com o progresso da doença, durante o monitoramento, foi positiva. Pôde-se determinar alta correlação com o mesmo dia da coleta de esporos e o progresso da doença e o saldo de manchas e estrias (Tabela 3). Contudo, aos 15, 30 e 45 dias após a coleta, também foi possível obter correlação positiva, demonstrando que os períodos de maior quantidade de inóculo no ar tiveram relação com a potencialidade de doença no campo.

Tabela 3 Correlação da coleta de ascósporos de *M. fijiensis* entre o progresso da sigatoka-negra e saldo de manchas e estrias em cinco períodos distintos. UFLA, Lavras, MG, 2010.

Coleta de ascósporos	Saldo de manchas e estrias	Progresso da doença
Mesmo dia	0,64*	0,53*
15 dias após	0,45*	0,59*
30 dias após	0,25	0,49*
45 dias após	-0,07	0,29
60 dias após	-0,16	0,07

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os obtidos por Panisson, Reis e Boller (2002), ao observarem que propágulos de *Gibberela zea* (Schw.) Petch em trigo eram coletados em maior número com a ocorrência de chuvas. Reis (1984) demonstrou maior concentração de *Helminthosporium sativum* Pam. em trigo após o período de estiagem. Hoy, Grisham e Chao (1991), utilizando armadilhas do tipo Kramer-Collins, que captura esporos durante sete dias consecutivos, constataram que houve um decréscimo de teliosporos de *Ustilago scitaminea* Sydow e P. Sydow, após o aumento de chuvas. Blum e Dianese (2001), utilizando uma armadilha Burkard, também detectaram um decréscimo na captura de urediniósporos após períodos de chuva. Vicente (1998), em trabalhos conduzidos em Cuba, demonstrou que o progresso da sigatoka-negra está correlacionado com o número de horas de umidade relativa acima de 95%, a duração do molhamento foliar e o acumulado da precipitação. Wardlaw (1961) relata, ainda, que, em locais onde os picos de infecção coincidem com uma reduzida taxa de emissão foliar, a plantaçã

se severamente afetada, a exemplo do que ocorre na região costeira de Santa Marta, na Colômbia, que se caracteriza pelo seu clima árido, porém, com constantes ocorrências de orvalho pesado, condições favoráveis ao patógeno, principalmente para a disseminação conidial.

4 CONCLUSÕES

A curva de progresso da sigatoka-negra, no Vale do Ribeira, apresenta dois períodos de maior severidade, sendo o primeiro verificado na estação chuvosa e o segundo, na estação mais seca do ano.

As altas severidades observadas são causadas, predominantemente, por ascósporos. As variáveis climáticas mais associadas ao progresso da doença foram a pluviosidade e a temperatura.

O progresso da doença ajusta-se ao modelo monomolecular, tanto na época das chuvas quanto na época seca.

É possível correlacionar a concentração de ascósporos com a severidade da doença após 15 dias das contagens.

REFERÊNCIAS

AITA, L. Informações sobre a coleta de alguns fungos fitopatogênicos por amostragem do ar. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 8, n. 3, p. 377-379, maio/jun. 1983.

BLUM, L. E. B.; DIANESE, L. Padrões de liberação de urediniósporos e desenvolvimento da ferrugem em jambeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 8, p. 845-850, ago. 2001.

BURT, P. J. A. Airborne dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*. In: BURT, P. J. A. ***Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook***. San José: INIBAP, 2003. p. 111-121.

- BURT, P. J. A. et al. Forecasting the airborne spread of *Mycosphaerella fijiensis*, a cause of black Sigatoka disease on bananas: estimations of numbers of peritecia and ascospores to aid forecasting. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 135, n. 1, p. 367-377, Aug. 1999.
- BURT, P. J. A.; RUTTER, J.; GONZALES, H. Short: distance wind dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 451-458, Aug. 1997.
- CALPOUZOS, L. et al. Relationship between climatic factors and incidence of the Sigatoka leaf-spot disease of bananas. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 46, n. 7, p. 758-761, July 1962.
- CALPOUZOS, L. et al. The control of Sigatoka disease of bananas by oil-spray schedules based on rainfall data. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, Porto Rico, v. 48, n. 1, p. 32-38, Jan. 1964.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 532 p.
- CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Disponível em: < <http://ciiagro.iac.sp.gov.br> >. Acesso em: 27 nov. 2009.
- CORREIA, M. S.; COSTA, J. L. S. Dispersão anemófila do fungo *Lasiodiplodia theobromae* em plantações de coqueiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 150-154, mar./abr. 2005.
- FERRARI, J. T. et al. Ocorrência da Sigatoka-negra em bananeiras no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, 133-134, jun. 2005a.
- FERRARI, J. T. et al. Ocorrência de Sigatoka-negra no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 31, p. 33, 2005b. Suplemento.
- FRY, W. E. **Principles of plant disease management**. New York: Academic, 1982. 378 p.
- GASPAROTTO, L. **Sigatoka-negra da bananeira**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2006. 177 p.

GAUHL, F. **Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain and banana (*Musa spp*) in Costa Rica.**

Montpellier: INIBAP, 1994. 120 p.

GONZÁLES, M. Metodología para la manipulación y cultivo in vitro de *Mycosphaerella fijiensis*. **Manejo Integrado de Plagas**, Turrialba, v. 53, p. i-iv. 1999. (Hoja Técnica).

HOY, J. W.; GRISHAM, M. P.; CHAO, C. P. Production of sori and dispersal of teliospores of *Ustilago scitaminea* in Louisiana. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 6, p. 574-579, June 1991.

JACOME, L. H.; SCHUH, W. 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*. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, Ibaraki, v. 70, n. 1, p. 51-59, 1993.

JACOME, L. H.; SCHUH, W.; STEVENSON, R. E. Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 1480-1485, Dec. 1991.

LEACH, R. Banana Leaf Spot, *Mycosphaerella musicola*, the perfect stage of *Cercospora musae* Zimm. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 18, n. 1, p. 91-95, 1941.

MASS, P. W. T. Jaarverslag: mededelingen landbouproefstation profstn. **Suriname Journal**, Paramaribo, v. 42, p. 91-100, 1967.

MEREDITH, M. A. **Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach.** Surrey: CMI, 1970. 147 p. (Phytopathological papers, 11).

MORAES, W. da S. Aplicativo para estimativa biológica da Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 193, maio/jun. 2005. Suplementos.

MORAES, W. da S. et al. Behaviour of black Sigatoka in banana plantations of the Ribeira Valley, Sant Paul, Brazil. In: REUNIÃO INTERNACIONAL DA ASSOCIAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO EM PESQUISAS SOBRE BANANA NO CARIBE E AMÉRICA TROPICAL, 17., 2006, Joinville. **Anais...** Joinville: ACORBAT, 2006. v. 2, p. 656-661.

NELSON, R. R.; TING, G. Influence of some climatic factors on sporulation y isolate of race T of *Helminthosporium maydis* on a susceptible male sterile corn hybrid. **Plant Disease Report**, Beltsville, v. 57, n. 3, p. 304-307, Mar. 1973.

PANISSON, E.; REIS, E. M.; BOLLER, W. Quantificação de propágulos de *Gibberela zeae* no ar e infecção em anteras de trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 484-488, set./out. 2002.

PONTE, E. M. Models and applications for risk assessment and prediction of Asian soybean rust epidemics. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 533-544, nov./dez. 2006.

REIS, E. M.; MARIO, J. L. Quantificação do inóculo de *Diplodia macrospora* e de *D. maydis* em restos culturais, no ar, e sua relação com a infecção em grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 143-147, mar./apr. 2003.

SANDOVAL, G. R. Programas de manejo de resistência a fungicidas sistêmicos usados em el control químico de la Sigatoka-negra. In: CURSO DE MANEJO INTEGRADO DE SIGATOKA-NEGRA, 1998, Manzanillo. **Memórias...** Manzanillo: SAGAR, 1998. p. 74-90.

STOVER, R. H. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. **Plant disease**, Saint Paul, v. 64, n. 8, p. 750-756, Aug. 1980.

STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. **Bananas**. 3. ed. Harlow: Longman, 1987. 468 p.

SUTTON, J. C. Predictive value of weather variables in the epidemiology and management on foliar diseases. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 12, n. 3, p. 305-311, maio/jun. 1998.

VANDERPLANK, J. E. **Plant diseases: epidemics and control**. New York: Academic, 1963. 349 p.

VARGAS, V. M. M. **Proveccion y manejo de la Sigatoka-negra**. Caldas: ICA, 1996. 29 p.

VICENTE, L. P. Sigatoka-negra (*Mycospharella fijiensis* Morelet) de bananas y plátanos (*Musa* sp.) en Cuba. Biología, epidemiología y manejo integrado de la enfermedad. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL SOBRE SIGATOKA-NEGRA, 1998, Manzanillo. **Memórias...** Manzanillo: SAGAR, 1998. p. 24-52.

WARDLAW, C. W. Leaf spot. (Sigatoka Disease). In: WARDLAW, C. W. **Banana diseases:** including plantains and abaca. Edingburgh: Longman, 1961. cap. 11, p. 314-341.

**CAPÍTULO 5 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO PERÍODO DE
MOLHAMENTO FOLIAR NO PROGRESSO DA SIGATOKA-NEGRA**

RESUMO

A influência da temperatura (21°, 24°, 27 e 30°C) e da duração do período de molhamento foliar (0, 12, 24, 48 e 72 horas) na penetração do agente causal da sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*) foi quantificada por meio de estudos em ambiente controlado. A área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) e a incidência foram influenciadas pela temperatura e pela duração do período de molhamento foliar. Foram constatadas diferenças significativas (P=0,05) nos valores da AACPD para as diferentes temperaturas, bem como verificada a interação significativa (P=0,05) entre temperaturas e molhamento foliar. Em todas as temperaturas foi possível a observação de sintomas, entretanto, a maior AACPD foi observada em folhas inoculadas que permaneceram na temperatura de 24° e 27°C, a partir de 48 horas de molhamento foliar. Nas temperaturas de 21° e 30°C, a incidência de sigatoka-negra foi menor. O período de molhamento foliar mínimo para o progresso da doença foi de 24 horas. Não foram observados sintomas de sigatoka-negra em folhas inoculadas com o molhamento foliar de 0 hora e 12 horas, em todas as temperaturas. As folhas assintomáticas, após 5 dias em câmara úmida, apresentavam sintomas característicos de sigatoka-negra, demonstrando que os conídios inoculados nas folhas permaneceram viáveis por longo tempo na ausência de água livre na folha.

Palavras-chaves: *Mycosphaerella fijiensis*. Musa sp.. Epidemiologia.

ABSTRACT

The influence of the temperature (21, 24, 27 and 30°C) and leaf wetness (0, 12, 24, 48 and 72 hours) on the penetration of the Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) was quantified through studies in a controlled environment. The area under disease progress curve (AUDPC) and the incidence was influenced by the temperature and leaf wetness. Significant differences were verified ($P=0.05$) in the AUDPC values for the different temperatures, as well as the significant interaction ($P=0.05$) between temperatures and the leaf wetness. At all the temperatures it was possible to observe the symptoms, however, the largest AUDPC was observed in leaves inoculated that stayed at the temperatures of 24 and 27°C, starting from 48 hours of leaf wetness. At the temperatures of 21 and 30°C the incidence of Black Sigatoka was lower. The minimum leaf wetness for the progress of the disease was 24 hours. Symptoms of Black Sigatoka were not observed in leaves inoculated with the leaf wetness of 0 and 12 hours at all the temperatures. The leaves without symptoms, after 5 days in humid chamber presented characteristic symptoms of Black Sigatoka, demonstrating that the spores inoculated in the leaves remained viable for a period in the absence of free water on the leaf.

Keywords: *Mycosphaerella fijiensis*. Musa sp.. Epidemiology.

1 INTRODUÇÃO

A sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) é considerada a mais severa e destrutiva doença da bananicultura (*Musa* sp.) no mundo. As infecções ocorrem nas folhas mais novas da planta, no lado abaxial, sob a influência de variáveis climáticas, como o molhamento foliar e a temperatura (COLHOUN, 1973). O conhecimento das variáveis climáticas que favorecem o patógeno e o progresso da doença é fundamental para orientar estratégias de manejo (LEITE; AMORIM, 2002). Esses fatores são determinantes para a distribuição geográfica, a incidência e a severidade da doença. Com a reprodução sexuada, ocorrem recombinações genéticas, com o surgimento de células que podem se adaptar às mais diversas condições climáticas e níveis tecnológicos de cultivo. Romero e Sutton (1997) observaram a interação da temperatura e de isolados de *M. fijiensis*, de diferentes regiões geográficas do mundo, proporcionando diferentes períodos de incubação.

O progresso da sigatoka-negra depende da temperatura, da quantidade de inóculo e da duração dos períodos de molhamento foliar, interferindo no ciclo de vida de *M. fijiensis*, podendo aumentar ou reduzir o período de incubação, afetando o número de ciclos do patógeno por ciclo da cultura (PEREZ, 1998; VALADARES JÚNIOR; JESUS JUNIOR; CECÍLO, 2007). De acordo com Stover (1972), após a adesão do esporo, é fundamental a presença de água livre e de temperaturas superiores a 21°C, para favorecer a germinação do esporo, o crescimento do tubo germinativo sobre a superfície foliar e a posterior penetração. A reprodução assexuada do patógeno está relacionada com a umidade relativa alta e a presença de precipitação favorece a liberação de ascósporos (GAUHL, 1994; VICENTE, 1998). Segundo Mouliom-Pefoura et al. (1996), temperaturas abaixo de 20°C reduzem a germinação dos esporos, aumentando o período de incubação da doença. Jacome e Schuh (1992) relatam que as

condições predisponentes à sigatoka-negra ocorrem em temperatura ótima na faixa de 25° a 28°C, com alta umidade relativa.

A umidade é fundamental para a germinação da maioria dos esporos e para a penetração, afetando a suscetibilidade do hospedeiro e aumentando a intensidade da doença (SILVEIRA et al., 2001). Contudo, algumas espécies podem esporular ou causar infecção em plantas, durante vários períodos curtos de molhamento, em vez de um único período longo. Para muitos fungos, o filme de água sobre a folha tem sua importância limitada à germinação e à penetração, não sendo mais necessário para continuar o processo de colonização do hospedeiro, uma vez que o fungo pode obter água do próprio hospedeiro (CARNEIRO; AMORIM, 1999). Entretanto, a umidade pode ser, às vezes, o fator ambiental mais importante na epidemia (JONES, 1986). Contudo, estudos sobre a interação da temperatura e do período de molhamento foliar para a sigatoka-negra no Brasil são raros.

Diante do exposto, objetivou-se, com a realização deste estudo, determinar a influência da temperatura e da duração do período de molhamento foliar no processo infeccioso da sigatoka-negra, sob condições controladas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. As mudas utilizadas nos experimentos foram micropropagadas da variedade Grande Naine (AAA), suscetível à sigatoka-negra.

A obtenção do inóculo de *M. fijiensis* seguiu a metodologia descrita por Cordeiro (1997). Em câmara de fluxo laminar, as colônias do isolado foram maceradas com bastão de vidro e diluídas em água destilada e deionizada, e posteriormente espalhadas sobre a superfície de placas de Petri contendo meio

BDA, transferidas para a BOD, com temperatura ajustada para 28°C e fotoperíodo de 12 horas. Após 10 dias de incubação, adicionaram-se 15 mL de água destilada esterilizada sobre as colônias e procedeu-se à liberação dos conídios com pincel. A suspensão foi filtrada e a concentração ajustada em câmara de Newbauer para 4×10^4 conídios/mL. Logo depois foi inoculada com atomizador plástico, até o ponto de escorrimento, na folha zero, na superfície abaxial das folhas.

O ensaio para avaliar o efeito da temperatura e da duração do período de molhamento foliar no estabelecimento do parasitismo da sigatoka-negra foi conduzido em câmaras climatizadas, no esquema fatorial 4x5. Para avaliar o efeito da temperatura, as plantas inoculadas foram mantidas sob temperaturas constantes de 21°, 24°, 27° e 30°C e fotoperíodo de 12 horas. A duração do período de molhamento foliar foi simulada envolvendo as plantas inoculadas com sacos plásticos transparentes e umedecidos, de modo a formar uma câmara úmida durante o tempo determinado no tratamento. Os períodos avaliados foram de 0, 12, 24, 48 e 72 horas, sob essas temperaturas constantes. Após a retirada dos sacos plásticos, a umidade nas câmaras climatizadas ficou em torno de $55 \pm 3\%$, sendo mantidas até o final das avaliações.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada repetição composta por um vaso contendo uma planta. As avaliações da severidade da doença foram realizadas a cada quatro dias, com o auxílio de uma escala diagramática elaborada por Stover, modificada por Gauhl et al. (1994), até a estabilização dos sintomas. As avaliações da severidade nas temperaturas e nos períodos de molhamento foliar foram utilizadas para a geração de uma superfície de resposta, com o auxílio do programa Statistica® 5.0. A análise de variância e a de regressão foram realizadas com o programa SISVAR® - versão 4.6 (FERREIRA, 2003).

Ao final da avaliação do ensaio do efeito da temperatura e da duração do período de molhamento foliar, ou seja, 28 dias após a inoculação, as folhas que não apresentaram sintomas de sigatoka-negra foram destacadas e colocadas em bandejas plásticas e cobertas com plásticos transparentes e umedecidas, para formar uma câmara úmida no intuito de determinar a viabilidade dos conídios de *Mycosphaerella fijiensis*. A câmara úmida foi mantida, por cinco dias, à temperatura de 24°C e fotoperíodo de 12 horas e avaliou-se apenas a presença ou a ausência de sintomas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação significativa entre a temperatura e o período de molhamento foliar na severidade da sigatoka-negra (Gráfico 1).

A maior severidade na temperatura de 27°C assemelha-se à relatada por Jacome, Schuh e Stevenson (1991), que verificaram uma resposta quadrática da temperatura sobre a germinação de conídios, com ponto ótimo situado em 26,5°C. Segundo Gasparotto, Pereira e Pereira (2003), as condições ideais para o progresso da sigatoka-negra ocorreram em uma faixa de 25° a 28°C, com umidade relativa alta e período chuvoso prolongado. Em estudos de Romero e Sutton (1972), com isolados da Colômbia, Honduras, Costa Rica, Camarões e Ásia inoculados na cultivar Grande Naine, constatou-se que a severidade foi de 5,27° a 26°C e reduzida a 30°C, com valor de 3,41. Vicente (1998), em trabalhos de campo em Cuba, relatou que temperaturas de 10° a 38°C favoreceram a germinação dos ascósporos de *M. fijiensis*, apresentando maior crescimento do tubo germinativo a 27°C.

$$Z = -334,916 + 26,256 * x + 0,373 * y - 0,508 * x * x + 0,006 * x * y - 0,002 * y * y$$

$$R^2 = 0,97$$

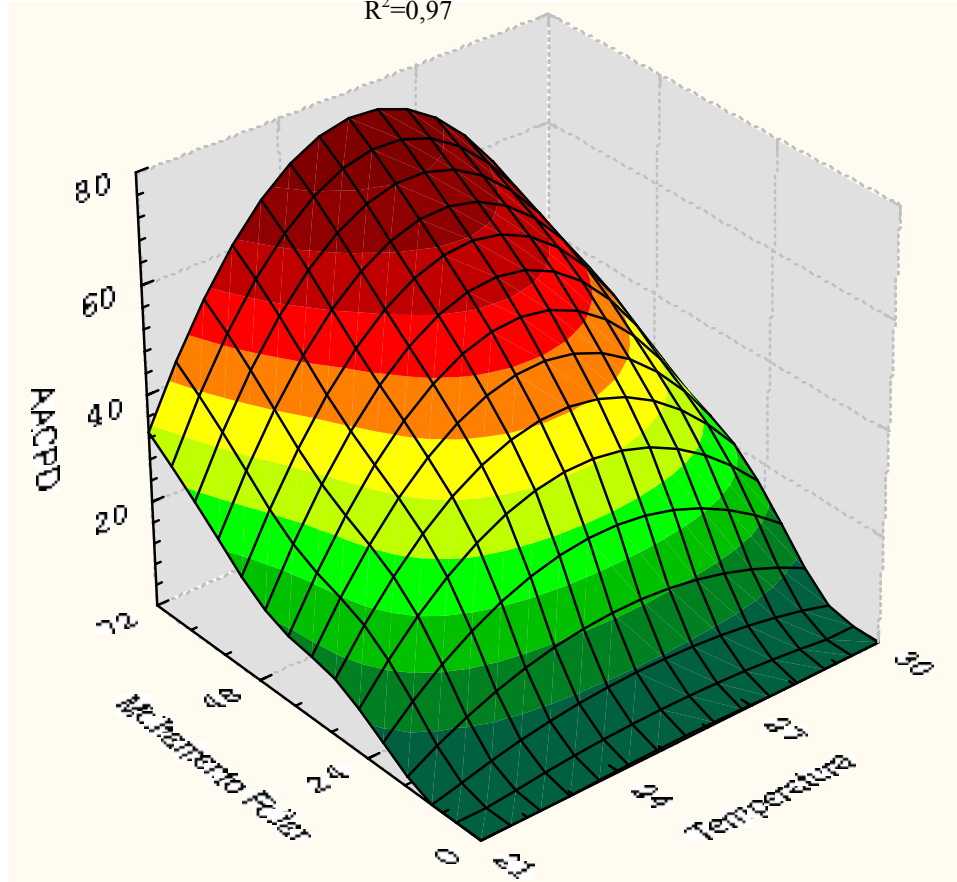


Gráfico 1 Superfície de resposta da AACPD de *M. fijiensis* em mudas de bananeira, em função da temperatura e da duração do período de molhamento foliar, descrita pela função em que Z é a AACPD, x é a temperatura e y é a duração do período de molhamento foliar.

Em todas as temperaturas foi possível observar sintomas, entretanto, a maior AACPD foi observada em folhas inoculadas que permaneceram nas temperaturas de 24° e 27°C, a partir de 48 horas de molhamento foliar. Nas temperaturas de 21° e 30°C, a severidade de sigatoka-negra foi menor (Gráfico 2). No tratamento com temperatura de 21°C e 30°C, a curva de progresso da

doença mostra menores valores da severidade da doença, com sintomas surgindo apenas a partir do décimo segundo dia de avaliação, atingindo, aproximadamente, 20% da área foliar para ambas as temperaturas (Gráfico 2). A sensibilidade de *M. fijiensis* às temperaturas de 21° e 30°C teve influência direta na curva de progresso de doença quando comparadas às curvas para a 24 e 27°C, comprovando que o fator temperatura pode potencializar a ação do patógeno nas condições de campo.

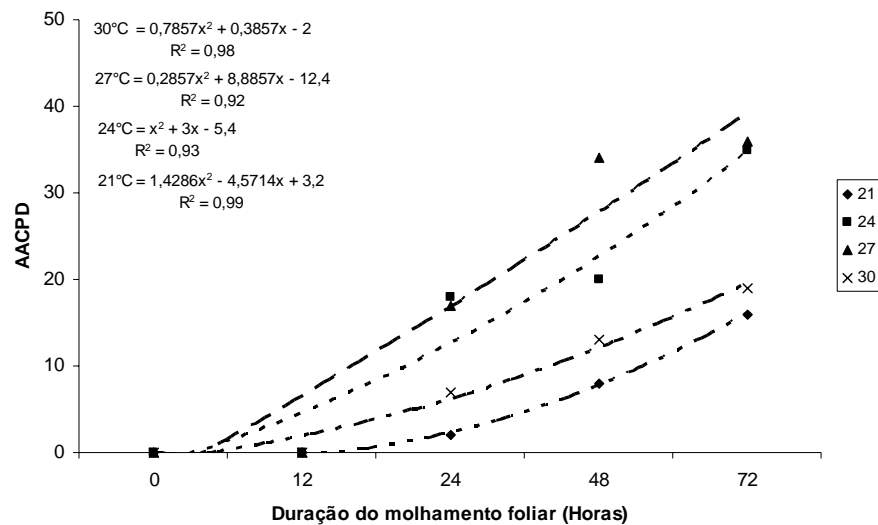


Gráfico 2 AACPD da sigatoka-negra em mudas de bananeira, nas temperaturas de 21°C, 24°C, 27°C e 30°C, em função do molhamento foliar.

O período de molhamento foliar superior a 12 horas foi necessário para maiores AACPD da sigatoka-negra e a incidência aumenta com o incremento no período de molhamento, exceto para temperaturas abaixo de 21°C e acima dos 30°C, que possibilitaram menor severidade da doença, mesmo com molhamento

foliar (Gráfico 3). Após quatro dias de inoculação, os tratamentos com o período de molhamento de 72 horas e temperatura de 27°C apresentaram sintomas de sigatoka-negra. Com um período de molhamento de 24 horas e 48 horas, após oito dias da inoculação, foram observados os sintomas na mesma temperatura. As temperaturas de 21° e 24 °C apresentaram sintomas também após oito dias da inoculação, no período de 72 horas de molhamento (Gráfico 3).

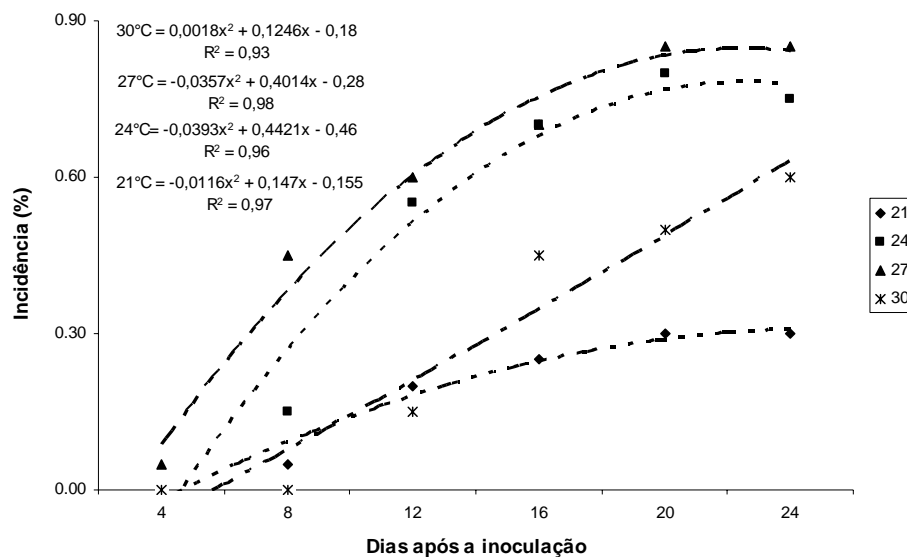


Gráfico 3 Incidência de *M. fijiensis* em mudas de bananeira nas temperaturas de 21°C, 24°C, 27°C e 30°C.

Jacome e Schuh (1992) observaram que a severidade da sigatoka-negra aumenta com a duração do molhamento foliar. Resultados semelhantes foram obtidos neste estudo, no qual se verificou que *M. fijiensis* foi dependente de água livre na superfície foliar para colonizar o hospedeiro, uma vez que os sintomas da doença apenas ocorreram de forma mais severa em períodos de molhamento foliar superiores a 24 horas (Gráfico 1). O início do processo infeccioso de

diferentes patógenos está distribuído dentro de uma ampla faixa, podendo variar de 0,5 a 100 horas de molhamento foliar. O período de molhamento foliar não necessita ser contínuo, uma vez que algumas espécies de fungos podem esporular ou causar infecção em plantas durante vários períodos curtos de molhamento, em vez de um único período longo, como pode ser observado na infecção de girassol por *Alternaria helianthi* (ALLEN; BROWN; KOCHMAN, 1983; HUBER; GILLESPIE, 1992; ROTEM, 1994).

Os baixos valores da AACPD encontrados neste ensaio podem ser explicados pela umidade do ar nas câmaras climatizadas em torno de 55%, pois, como demonstrou Vicente (1998) em trabalhos epidemiológicos em Cuba, a velocidade do progresso da sigatoka-negra é correlacionada com umidade relativa acima de 95%, duração de molhamento foliar e precipitação pluvial acumulada.

Avaliou-se a viabilidade dos esporos de *M. fijiensis* associada às folhas assintomáticas, sendo estas destacadas das mudas em todas as temperaturas e com 0 hora e 12 horas de molhamento foliar. A necessidade de água livre na superfície foliar para que a infecção ocorresse no hospedeiro foi confirmada pela não ocorrência de infecção observada em 0 hora e 12 horas de molhamento foliar. Todavia, após cinco dias em câmara úmida, as folhas apresentavam sintomas característicos de sigatoka-negra, com uma maior incidência de sintomas nas folhas que permaneceram no ensaio anterior na temperatura de 27°C (Tabela 1), demonstrando que os conídios inoculados nas folhas permaneceram viáveis por um longo período. As folhas que não foram colocadas em câmara úmida amareleceram em dois dias, não permitindo a visualização de sintomas.

Tabela 2 Média da incidência de sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*) em folhas destacadas em câmara úmida, após 28 dias de inoculação.

Temperatura	Média
21°C	0,80 a
24°C	0,50 a
27°C	1,50 b
30°C	0,33 a

* Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Segundo Sussman e Halvarson (1966), alguns fungos mantêm sua viabilidade por um longo período, ao absorverem água do ar. Os esporos de *M. musicola* e *M. fijiensis*, em condições naturais, podem sobreviver de três a quatro semanas associados às folhas doentes e por oito semanas nos ascósporos em peritécios nas folhas de bananeiras caídas no chão (KOCH, 1982; KRANS; SCHMUTTERER; STOVER, 1980). Hanada et al. (2002) relataram que esporos de *M. fijiensis* sobreviveram em folhas destacadas até 60 dias, provavelmente porque existe alguma desidratação dos esporos de *M. fijiensis*, característica esta que deve possibilitar maior longevidade, demonstrando que esporos de *M. fijiensis* podem sobreviver, mesmo quando expostos à desidratação. Comportamento semelhante foi observado para *Drechslera* spp. (DHINGRA; SINCLAIR, 1995), *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (MOSEMAN; POWERS, 1957) e ferrugem em folhas de trigo (*Triticum aestivum* L.) (YOUNG; WADSWORTH, 1953).

4 CONCLUSÕES

As condições ótimas para o estabelecimento da doença situam-se entre 24°C e 27°C, com 24 horas de molhamento foliar.

Os esporos de sigatoka-negra apresentam longevidade mesmo expostos as condições adversas.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, S. J.; BROWN, J. F.; KOCHMAN, J. K. Effects of temperatures, dew period, and light on the growth and development of *Alternaria helianthi*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, n. 9, p. 893-896, Sept. 1983.
- ANDRADE, G. C. G. Características culturais e severidade da mancha foliar de *Quambalaria eucalypti* sob diferentes regimes de temperatura, luz e período de molhamento foliar. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 3, p. 329-334, maio/jun. 2007.
- CARNEIRO, L. C.; AMORIM, L. Influência da temperatura e do molhamento foliar no monociclo do “mal-de-sete-voltas” da cebola. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 422-427, jul./ago. 1999.
- COLHOUN, J. Effects of environmental factors on plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 11, p. 343-364, Sept. 1973.
- CORDEIRO, Z. J. M. Panorama nacional das principais doenças da bananeira. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA (Org.). **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007. p. 165-184.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC, 1995. 434 p.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 6**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 2003. 32 p.
- GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R.; PEREIRA, M. C. N. Sigatoka-negra: situação atual e avanços obtidos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE BANANICULTURA, 5., 2003, Paracatu. **Anais...** Cruz das Almas: Nova Civilização, 2003. p. 28-34.

GAUHL, F. **Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on Plantain and Banana (*Musa* spp.) in Costa Rica.**

Panamá: UPEB, 1994, 114 p.

GODOY, C. V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Influência da duração do molhamento foliar e da temperatura no desenvolvimento da ferrugem do milho causada por *Puccinia polysora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 160-165, mar./abr. 1999.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 170-173, mar./abr. 2002.

HUBER, L.; GILLESPIE, T. J. Modeling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 553-557, Sept. 1992.

JACOME, L. H.; SCHUH, W. 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*. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, Ibaraki, v. 70, n. 1, p. 51-59, 1993.

JACOME, L. H.; SCHUH, W.; STEVENSON, R. E. Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 12, p. 1480-1485, Dec. 1991.

JONES, A. L. Role of the wet weather in predicting foliar diseases. In: LEONARD, K. J.; FRY, W. E. (Ed.). **Plant disease epidemiology: population dynamics and management**. New York: Macmillan, 1986. p. 87-100.

KRANZ, J.; SCHMUTTERER, H.; KOCH, W. **Enfermedades, plagas y malezas de los cultivos tropicales**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1982, 722 p.

LEITE, R. M. V. B. C.; AMORIM, L. Influência da temperatura e do molhamento foliar no monociclo da mancha de *Alternaria* em girassol. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v. 27, n. 2, p. 193-200, mar./abr. 2002.

MOSEMAN, J. G.; POWERS, H. R. Functions and longevity of cleistothecia of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 47, n. 1, p. 33, Jan. 1957.

PÉREZ, L. Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) de bananos y plátanos (*Musa* spp.) em Cuba. Biología, comportamiento y manejo integrado de la enfermedad. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL SOBRE SIGATOKA-NEGRA, 1998, Colima. **Memórias...** Colima: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, 1998. p. 24 -52.

ROMERO, R. A.; SUTTON, T. B. Reaction of four *Musa* of three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 10, n. 12, p. 1139-1142, Dec. 1997.

ROTEM, J. **The genus alternaria:** biology, epidemiology and pathogenicity. Saint Paul: APS, 1994. 326 p.

SILVEIRA, N. S. S. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 33-38, jan./fev. 2001.

STOVER, R. H. **Banana, plantain and abaca disease.** London: Commonwealth Mycological Institute, 1972. 316 p.

STOVER, R. H. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. **Plant disease**, Saint Paul, v. 64, n. 8, p. 750-756, Aug. 1980.

SUSSMAN, A. S.; HALVARSON, H. O. **Spores:** their dormancy and germination. New Cork: Harper & Row, 1966. 354 p.

VALADARES JÚNIOR, R.; JESUS JÚNIOR, W. C.; CECÍLIO, R. A. Influência das mudanças climáticas na distribuição espacial da *Mycosphaerella fijiensis* no mundo. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 13., 200, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: INPE, 2007. p. 443-447.

VICENTE, L. P. Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) de bananos y plátanos (*Musa* sp.) en Cuba. Biología, epidemiología y manejo integrado de la enfermedad. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL SOBRE SIGATOKA-NEGRA, 1998, Manzanillo. **Memórias...** Manzanillo: SAGAR, 1998. p.24-52.

YOUNG, H. C.; WADSWORTH, D.F. Collection and race isolation of wheat leaf rust in Oklahoma. **Phytopatology**, Saint Paul, v. 43, n. 1, p. 33, Jan. 1953.

**CAPÍTULO 6 MODELAGEM GEOESTATÍSTICA DA SIGATOKA-
NEGRA E SUA RELAÇÃO COM A FERTILIDADE DO SOLO**

RESUMO

Objetivou-se, com a realização do presente trabalho, caracterizar a variabilidade espacial da sigatoka-negra, utilizando-se metodologia de análise geoestatística para verificar sua relação com a fertilidade do solo na cultivar Grande Naine. O experimento foi realizado no município de Registro, SP. Demarcou-se, no campo, malha regular de 30 x 30 m, totalizando-se 30 pontos amostrais georreferenciados com aparelho de GPS. Foram realizadas avaliações da severidade da sigatoka-negra, com auxílio de escala diagramática. Coletaram-se amostras de solo na camada de 0-20 cm, para análise de fertilidade. Com base na análise do semivariograma isotrópico, verificou-se a forte dependência espacial da severidade da doença, com alcance de 25,28 m. Posteriormente, por meio de Mapas de krigagem ordinária, foi possível constatar o padrão agregado e forte dependência espacial do boro e moderada dependência espacial do zinco no solo.

Palavras-chave: Banana. Krigagem. Nutrientes.

ABSTRACT

The objective in this research was to characterize the spatial variability of the Black Sigatoka disease, using the geostatistic analysis methodology to identify its relation to soil fertility in the Grande Naine cultivar. The experiment was conducted in the city of Registro, São Paulo state, Brazil. A regular 30 x 30m field mesh was demarcated, using a Geographical Positioning System in the experimental field, composed of a total of 30 sampling points or georeferences. Evaluations of the severity of the Black Sigatoka were conducted using a diagrammatic scale. Soil samples were collected in the 0 - 20cm layer for fertility analysis. Based on the isotropic semivariogram, a clustered spatial dependence of the disease severity, with a range of 25.28m was verified. Afterwards, by means of ordinary kriging, it was possible to verify a clustered pattern and a negative relation of the disease severity to B and moderate Zn levels in the soil.

keywords: Banana. Kriging. Nutrients.

1 INTRODUÇÃO

O estado de São Paulo é o maior produtor nacional de bananas (*Musa* sp.), com destaque para o Vale do Ribeira, na região sul do estado, com área aproximada de 42,2 mil ha, produtividade média de 22,9 t.ha⁻¹ e cerca de 75% da população dependendo, direta ou indiretamente, das atividades ligadas à bananicultura (GONÇALVEZ et al., 2006). O Vale do Ribeira tem o maior índice pluviométrico do país, favorecendo o crescimento das bananeiras como também do agente etiológico da sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), o patógeno de maior importância da bananicultura (MORAES; FERRARI, 2007).

Apesar da importância de *M. fijiensis*, pouco se conhece dos efeitos das condições ambientais, variações genéticas do patógeno, tipo de resistência e a nutrição mineral das plantas, que pode influenciar na incidência da doença. A suscetibilidade do hospedeiro, um dos fatores relevantes à infecção por patógenos (HANADA; GASPAROTTO; PEREIRA, 2002; JACOME; SCHUH, 1993), é influenciada pelo desequilíbrio nutricional de macro e micronutrientes pelo fato de reduzir a resposta de defesa (BEDENDO, 1995; PINHEIRO, 2007).

Entre os nutrientes, destacam-se o cálcio, o potássio, o fósforo e o nitrogênio, tanto por seus benefícios individuais quanto na competitividade entre os íons, desencadeando o desequilíbrio nutricional. O Ca complementa a função do K na manutenção da organização celular, hidratação e permeabilidade, afetando a incidência de doenças (HUBER, 2002). No entanto, o K deve estar presente em quantidade mínima necessária para atender à demanda celular, pois, o excesso pode inibir a absorção de Ca e Mg (MALAVOLTA, 2006). Quando o padrão de distribuição da doença for agregado, existe dependência espacial entre as plantas infectadas, assim como a variabilidade do solo também não é aleatória

e apresenta dependência espacial (CAMPBELL; MADDEN, 1990; TRANGMAR; YOST; UEHARAA, 1985).

A influência meteorológica e da fertilidade do solo sobre o patógeno pode ser representada por regras ou modelos geoestatísticos para a previsão de ocorrência de doenças (WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION - WMO, 1988). A geoestatística busca retirar dos dados coletados aleatoriamente de um fenômeno suas características estruturais probabilísticas, detectando a existência de variabilidade e a dependência espacial, interpolando as variáveis estudadas de forma exata e precisa. Para realizar a modelagem geoestatística, pode-se utilizar a técnica da krigagem. Essa técnica estima, por meio de médias móveis, valores de variáveis distribuídas no espaço a partir de valores próximos, enquanto considerados como interdependentes por uma função denominada variograma ou semivariograma. No processo básico da krigagem, a estimativa é feita para determinar um valor médio em um local não amostrado (LANDIM; STURARO, 2002).

A geoestatística é uma importante ferramenta de análise da distribuição espacial de doenças (ALVES et al., 2006) e da variabilidade de características do solo (CARVALHO; SILVERIA; VIEIRA, 2002), pois permite quantificar a magnitude e o grau de dependência espacial e descrever detalhadamente a variabilidade espacial das variáveis estudadas por meio de um interpolador exato e preciso. Ademais, a geoestatística é capaz de determinar a acurácia e a confiabilidade dos experimentos, e mostrar diferenças entre tratamentos que não se constataria com o pressuposto de erros aleatórios, considerados na análise clássica de dados (PONTES, 2002).

Assim, objetivou-se, com a realização deste trabalho, realizar a modelagem geoestatística da sigatoka-negra e verificar sua relação com a fertilidade do solo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os dados foram coletados em bananal da variedade Grande Naine, no município de Registro, estado de São Paulo, Brasil, cujas coordenadas geográficas são 24°27' de latitude Sul e 47°48' de longitude Oeste. Foi demarcada malha regular de 30 x 30 m, totalizando 30 pontos amostrais ou interseções georreferenciadas e área total de 900 m². Em cada ponto amostral avaliou-se a severidade da sigatoka-negra e também a fertilidade do solo. A severidade da doença foi avaliada com base na escala diagramática proposta por Stover, modificada por Gauhl (1994). A análise geoestatística foi realizada com os valores da severidade média em cada ponto.

Foram coletadas três amostras simples de solo na camada de 0 a 20 cm, utilizando-se de um trado e, após homogeneização dessas amostras, foi retirada uma amostra composta com cerca de 500 g e enviada ao laboratório para determinar a fertilidade do solo. As análises foram realizadas pelo Laboratório de Análise de Solo do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, em conformidade com a Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais – CFSEMG (1999).

Os teores de Ca e Mg foram determinados por meio do extrator KCl na concentração de 1 mol L⁻¹. Já os nutrientes P e K foram quantificados utilizando-se solução extratora Mehlich e o S, com o extrator fosfato monocálcio em ácido acético. Os resultados da análise granulométrica da área amostrada encontram-se na Tabela 1.

As análises geoestatísticas foram realizadas no programa GS+ v.7.0, pela determinação dos semivariogramas isotrópicos, com base na pressuposição de estacionariedade da hipótese intrínseca, de acordo com metodologia Burrough e McDonnell (1998). O ajuste dos modelos de semivariogramas foi

escolhido em função do quadrado médio do erro, do erro padrão de predição e da autovalidação (jackknife).

O grau de dependência espacial das variáveis foi analisado com base na classificação de Cambardella et al. (1994), em que são considerados de forte dependência espacial os semivariogramas com efeito pepita de 25% do patamar, moderada quando entre 25% e 75% e de fraca quando >75%. Após o ajuste dos semivariogramas, foi realizada a interpolação dos dados por krigagem ordinária, de forma a possibilitar a construção de Gráficos bidimensionais e a consequente visualização da distribuição espacial das variáveis na lavoura.

Realizou-se a correlação de Pearson entre os teores dos nutrientes no solo e severidade da doença, utilizando-se o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS) versão 8.1 (SAS INSTITUTE, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise geoestatística, a severidade da sigatoka-negra seguiu padrão de distribuição agregado com alta dependência espacial. Dessa forma, ajustou-se, para esse patossistema, o semivariograma experimental isotrópico de modelo linear, com alcance de 25,26 m (Tabela 1 e Mapa 1).

O ajuste do modelo linear ao semivariograma experimental da severidade da sigatoka-negra demonstra que a doença progrediu a partir de um foco primário para as plantas circunzinhas e a disseminação de *M. fijiensis* ocorreu principalmente por vento.

Alves et al. (2006), utilizando geoestatística, estudando a dinâmica espaço-temporal da antracnose em feijoeiro (*Colletotrichum lindemuthianum*) e da ramulose do algodão (*C. gossypii* (South) var. *cephalosporioides*), também encontraram padrão agregado dessas doenças da parte aérea veiculadas por sementes. Esses autores verificaram que aos 61 dias após a semeadura (DAS),

foram relatados alcances máximos de 3,15 m para a antracnose com o modelo esférico e aos 80 DAS um alcance de 6,82 m para a ramulose, com o modelo gaussiano. Para as doenças de final de ciclo da soja (*Glycine max*), Carvalho (2008) verificou moderada dependência espacial da severidade das doenças, com alcance de 70m. Posteriormente, por meio de Mapas de krigagem ordinária, foi possível constatar o padrão agregado e a relação negativa da severidade da doença com o potássio e o fósforo e relação positiva com o cálcio no solo.

Tabela 1 Parâmetros e coeficientes dos semivariogramas isotrópicos da severidade da sigatoka-negra e dos teores de nutrientes: fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), enxofre (S), magnésio (Mg), zinco (Zn), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu) e boro (B) no solo.

Variáveis	Parâmetros				
	Modelo	Co	Co+C	Ao	Co/Co+C
Severidade	Linear	8,37	8,37	25,28	0,01
P	Esférico	0,29	1,38	10,48	0,79
K	Esférico	0,63	2,90	11,13	0,78
Ca	Exponencial	0,005	0,024	2,85	0,79
S	Esférico	0,07	0,35	11,89	0,79
Mg	Exponencial	0,01	0,04	46,37	0,75
Zn	Esférico	0,18	0,36	26,89	0,50
Fe	Exponencial	1,83	8,00	6,55	0,77
Mn	Exponencial	0,03	0,14	4,06	0,76
Cu	Linear	0,10	0,10	25,28	0,01
B	Esférico	0,0004	0,0023	10,91	0,79

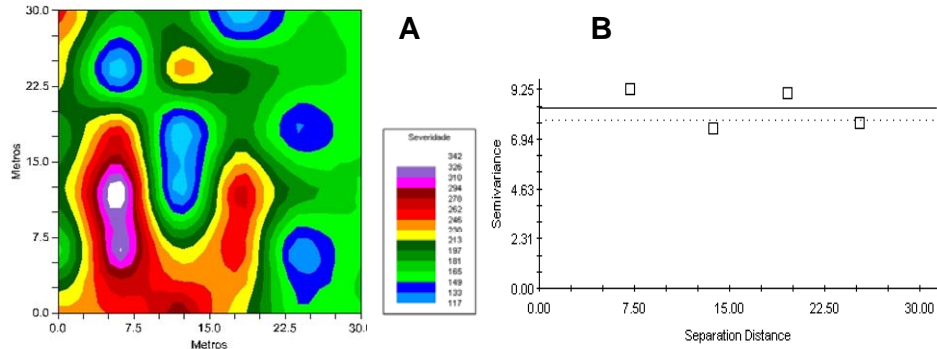
Co – efeito pepita; Co+C – patamar; Ao – Alcance; Co/Co+C – razão (k) indicativa do grau de dependência espacial.

Em relação à fertilidade do solo, o nutriente zinco (Zn) (Mapa 2) apresentou padrão agregado, com alcance de 26,89 m e, para o cobre (Cu) (Mapa 3), o padrão de distribuição moderada dependência espacial (Tabela 1).

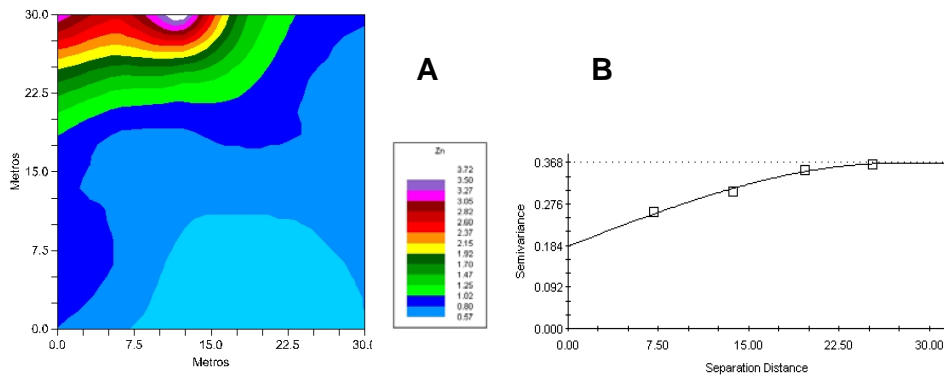
Segundo Gomes et al. (2009), a maior parte dos bananais no Vale do Ribeira apresentou teor adequado de Zn e B nas folhas. A média do teor de Zn variou de 25 a 35 mg kg⁻¹ e o de B, de 15 a 19 mg kg⁻¹. Mais de 80% dos talhões amostrados apresentou teor adequado de Cu. Segundo López e Espinosa (1995), é muito rara a deficiência de Cu na bananeira, além disso, os solos de bananais do Vale do Ribeira, normalmente, apresentam alto teor de Cu (GODOY et al., 2009). As deficiências de P, Ca, S, Mg e Zn foram frequentes no bananal amostrado (Quadro 1).

Quadro 1 Teores médios dos nutrientes no solo em bananal em Registro, SP.

Nutriente	Teores mg/kg solo
P	7,0
K	57,5
Ca	2,2
S	9,5
Mg	1,0
Zn	1,3
Fe	210,5
Mn	5,0
Cu	0,8
B	0,3



Mapa 1 Severidade da sigatoka-negra em bananal no Vale do Ribeira, SP. A) Mapas da krigagem e B) semivariograma.

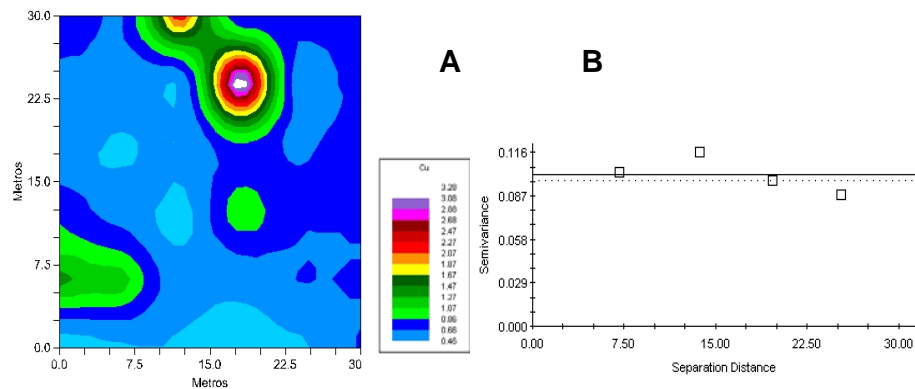


Mapa 2 Teores de zinco no solo de bananal com alta severidade de sigatoka-negra. A) Mapas da krigagem e B) semivariograma.

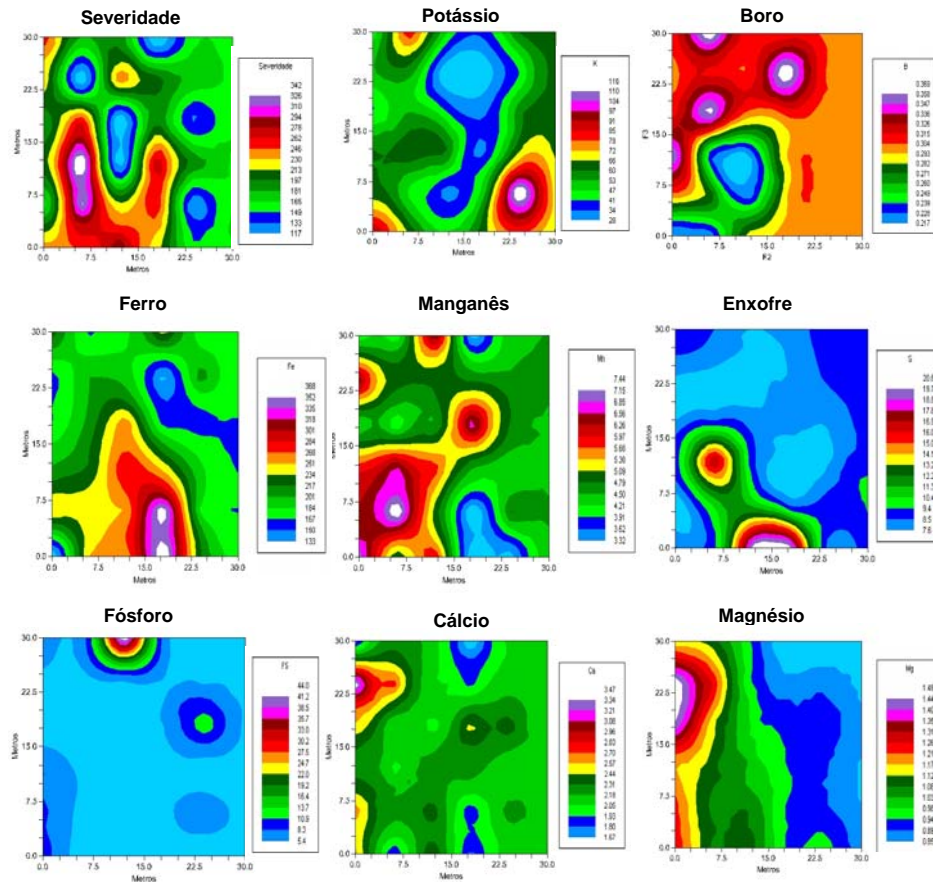
De acordo com os Mapas de krigagem, gerados após o ajuste dos semivariogramas isotrópicos experimentais, pode-se observar o padrão agregado e a relação negativa dos nutrientes K e B com a severidade da sigatoka-negra (Mapa 4). Áreas com níveis mais altos de K e B apresentaram menor severidade. Assim, em áreas com teores médios de K ($57,5 \text{ mg dm}^{-3}$) e B ($0,3 \text{ mg dm}^{-3}$), foi

verificada menor severidade média das doenças (117 a 180 de intensidade). Por outro lado, as maiores severidades (260 a 340 de intensidade) foram observadas quando os teores destes nutrientes foram de inferiores a 28 mg dm^{-3} de K e de $0,21 \text{ mg dm}^{-3}$ de B.

Os baixos teores de potássio na planta em propriedades agrícolas dos Estados Unidos responderam pelo aparecimento da mancha-foliar (*Alternaria*, *Cercospora* ou *Stemphylium*) do algodoeiro (*Gossypium herbaceum*). Quanto maior a restrição pelo nutriente, seja por deficiência no solo ou déficit hídrico, maior foi a incidência do patógeno, em casos com maior severidade, promovendo o desfolhamento total (HARRIS, 2001). Ito et al. (1993) constataram a influência do K sobre o crestamento foliar da soja (*Cercospora kikuchii*), com reduções na incidência da doença de 22% na safra de 1986/87 e de 18% na safra 1987/88, com doses de potássio variando de 0 a 600 kg ha^{-1} de K_2O .



Mapa 3 Teores de cobre no solo de bananal com alta severidade de sigatoka-negra. Em A-Mapas da krikagem e B-semivariograma



Mapa 4 Mapas de krigagem, gerados após o ajuste dos semivariogramas isotrópicos experimentais.

O B tem como funções principais a lignificação, o alongamento celular, a síntese de ácidos nucleicos e o funcionamento da membrana citoplasmática (TAIZ; ZEIGER, 2004). A deficiência de B promove baixa lignificação e paredes menos espessas, com redução na glicólise, na síntese do felogênio e na velocidade de formação da periderme de cicatrização (MALAVOLTA; VITTI;

OLIVEIRA, 1989). Silveira (1996), avaliando o estado nutricional de *Eucalyptus citriodora* sob doses de B, verificou, na testemunha sem aplicação de B, diminuição da altura, diâmetro, biomassa e aumento da incidência de *Botryosphaeria ribis*. O autor associou a deficiência de B com a deficiência de K observada no ensaio.

Nas áreas com maiores teores de ferro, manganês e enxofre, no presente trabalho, verificou-se elevada severidade da doença (260 a 340 de intensidade), embora o ferro e o manganês sejam responsáveis pela síntese de fenóis e lignina, com efeitos na redução da severidade de doenças. A maior severidade da sigatoka-negra nessas áreas deve-se, possivelmente, a desequilíbrios devido aos baixos níveis dos outros nutrientes, já que os teores de P, Ca, Mg, Zn e Cu estavam abaixo das quantidades recomendadas para a cultura da banana (Mapa 4 e Tabela 2).

O equilíbrio de nutrientes pode ser tão importante quanto o nível de um elemento específico, ressaltando a importância de condições adequadas de fertilidade do solo, com adequado fornecimento de nutrientes às plantas para se conseguir o controle de doenças como as bacterioses (*Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas campestris*), podridão-de-carvão (*Macrophomina phaseolina*), fusariose (*Fusarium oxysporum*), cancro-da-haste (*Diaporthe*), podridão de raiz e da base da haste (*Rhizoctonia solani*) e nematoides, (HARTMAN; SINCLAIR; RUPE, 1999; HUBER; ARNY, 1985).

4 CONCLUSÕES

O semivariograma isotrópico esférico foi ajustado para sigatoka-negra, com alta dependência espacial e alcance de 25,26 m.

Os Mapas de krigagem possibilitaram a constatação do padrão agregado e da relação negativa da severidade da doença com o potássio e o boro, e positiva com teores de ferro, manganês e enxofre no solo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. C. et al. Geoestatística como metodologia para estudar a dinâmica espaço-temporal de doenças associadas a *Colletotrichum* spp. transmitidos por sementes. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 31, n. 6, p.557-563, 2006.
- BEDENDO, I. P. Oídios. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. *Manual de fitopatologia*. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. p. 866-871.
- BURROUGH, P. A.; MCDONNELL, R. A. *Principles of geographical information systems: spatial information systems and geostatistics*. 2. ed. Oxford: Oxford University, 1998. 333 p.
- BURT, P. J. A. Airborne dispersal of *Mycosphaerella fijiensis*. In: BURT, P. J. A. ***Mycosphaerella leaf spot diseases of bananas: present status and outlook***. San José: INIBAP, 2003. p. 111-121.
- CAMBARDELLA, C. A. et al. Fieldscale variability of soil properties in Central Iowa soil. ***Soil Science Society of America Journal***, Madison, v. 58, n. 5, p. 1501-1511, May 1994.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. ***Introduction to plant disease epidemiology***. New York: J. Wiley, 1990. 532 p.
- CARVALHO, E. A. ***Modelagem geoestatística da distribuição espacial de doenças do feijoeiro comum e da soja e sua relação com a fertilidade do solo e nutrição mineral de plantas***. 2008. 83 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
- CARVALHO, J. R. P.; SILVEIRA, P. M da; VIEIRA, S. R. Geoestatística na determinação da variabilidade espacial de características químicas do solo sob diferentes preparos. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, Brasília, v. 37, n. 8, p. 1151-1159, ago. 2002.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. 5. ed. Lavras, 1999. 359 p.

GAUHL, F. **Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Micosphaella fijiensis* Morelet) on Plantain and Banana (*Musa spp.*) in Costa Rica, Central America**. Montpellier: INIBAP, 1994. 120 p.

GODOY, L. J. G. et al. **Fertilidade do solo em bananais do Vale do Ribeira**. In: GODOY, L. J. G.; GOMES, J. M. (Ed.). Tópicos sobre a nutrição e adubação da cultura da banana. São Paulo: UNESP, 2009. p. 121-143.

GOMES, J. M.; GODOY, L. J. G.; MENDONÇA, J. C.; SAKAMOTO, C. Y. Levantamento do estado nutricional de bananais do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 22., 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBCS, 2009. 1 CD-ROM.

GONÇALVES, J. S. et al. Bananicultura no Estado de São Paulo, Brasil. In: SIMPÓSIO DE MANEJO ADEQUADO DA SIGATOKA-NEGRA NA CULTURA DA BANANA, 2006, Pariquera-Açu. **Anais...** Pariquera-Açu: Pólo Regional da Apta Vale do Ribeira, 2006.

HANADA, R. E.; GASPAROTTO, L.; PEREIRA, J. C. R. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 170-173, mar./abr. 2002.

HARRIS, G. Deficiência de potássio em algodoeiro relacionada à mancha foliar. **Informações Agronômicas**, São Paulo, v. 96, p. 1-2, dez. 2001.

HARTMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B.; RUPE, J. C. **Compendium of soybean diseases**. 4. ed. Saint Paul: 1999. 100 p.

HUBER, D. M. Relationship between mineral nutrition of plants and disease incidence. In: WORKSHOP RELAÇÃO ENTRE NUTRIÇÃO DE PLANTAS E INCIDÊNCIA DE DOENÇAS, 2002, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Potafós, 2002. 1 CD-ROM.

HUBER, D. M.; ARNY, D. C. Interactions of Potassium with plant disease. In: MUNSON, R. D. (Ed.). **Potassium in agriculture**. Madison: ASA/CSSA/SSA, 1985. p. 467-488.

ITO, M. F. et al. Efeito residual da calagem e da adubação potássica sobre a queima foliar (*Cercospora kikuchii*) da soja. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, 19, n. 1, p. 21-23, jan./mar. 1993.

JACOME, L. H.; SCHUH, W. 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*. **Japanese Journal of Tropical Agriculture**, Ibaraki, v. 70, n. 1, p. 51-59, 1993.

LANDIM, P. M. B.; STURARO, J. R. **Krigagem indicativa aplicada à elaboração de Mapas probabilísticos de riscos**. Rio Claro: Unesp, 2002. (Texto Didático, 6).

LÓPEZ, A.; ESPINOSA, J. **Manual de nutrición y fertilización del banano**. Quito: Corbana, 1995. 82 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafos, 1989. 201p.

MORAES, W. S.; FERRARI, J. T. Sigatoka-negra, o constante desafio para a bananicultura: focos da doença no sudeste e avanços em diagnose e controle. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA (Org.). **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007, p. 185-204.

PINHEIRO, J. B. **Manejo da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi* Sydow & P. Sydow) com nutrientes e fungicidas e a influência da nutrição mineral na distribuição espacial e reprodução do nematóide do cisto da soja (*Heterodera glycines* Ichinohe)**. 2007. 175 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

PONTES, J. M. **A geoestatística: aplicação em experimentos de campo**. 2002. 82 p. Dissertação (Mestrado em Estatística e Experimentação Agropecuária) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

ROMERO, J. O.; SANDOVAL, G. R.; VALVIDIA, V. V. Comportamiento del banano FHIA 01 y plátano FHIA 17 em México. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL SOBRE SIGATOKA-NEGRA, 1998, Manzanino. **Memórias...** Manzanino: SAGAR, 1998. p. 112-121.

SAS INSTITUTE. **SAS/QC Software**: reference, version 8. Cary, 2000.

SILVEIRA, RLVA. **Crescimento e estado nutricional de *Eucalyptus citriodora* cultivado sob doses de boro e sua relação com a agressividade de *Botryosphaeria ribis***. 1996. 100 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

STOVER, R. H. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. **Plant disease**, Saint Paul, v. 64, n. 8, p. 750-756, Aug. 1980.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2004. 719p.

TRANGMAR, B. B.; YOST, R. S.; UEHARAA, G. Application of geostatistics to spatial studies of soil properties. **Advances in Agronomy**, New York, v. 38, p. 45-94, Dec. 1985.

WORLD METEOROLOGICAL ORGANIZATION. **Agrometeorological aspects of operational crop protection**. Genebra, 1988. 185 p. (Technical Note, 192).