



**AURIVAN SOARES DE FREITAS**

**PROCESSO INFECCIOSO DE *Pseudocercospora musae* E SEVERIDADE DA SIGATOKA AMARELA DA BANANEIRA EM FUNÇÃO DO SILÍCIO, POTÁSSIO E CÁLCIO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA**

**LAVRAS – MG**

**2016**

**AURIVAN SOARES DE FREITAS**

**PROCESSO INFECCIOSO DE *Pseudocercospora musae* E SEVERIDADE  
DA SIGATOKA AMARELA DA BANANEIRA EM FUNÇÃO DO  
SILÍCIO, POTÁSSIO E CÁLCIO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA**

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

Orientador

Dr. Edson Ampélio Pozza

Coorientadora

Dra. Adélia Aziz Alexandre Pozza

**LAVRAS – MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Freitas, Aurivan Soares de.

Processo infeccioso de *Pseudocercospora musae* e severidade da  
Sigatoka Amarela da bananeira em função do silício, potássio e cálcio em  
solução nutritiva / Aurivan Soares de Freitas. – Lavras: UFLA, 2016.

101 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador (a): Edson Ampélio Pozza.

Bibliografia.

1. *Musa* spp. 2. *Mycosphaerella musicola*. 3. Microscopia eletrônica  
de varredura. 4. Nutrição mineral. 5. Desequilíbrio nutricional. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**AURIVAN SOARES DE FREITAS**

**PROCESSO INFECCIOSO DE *Pseudocercospora musae* E SEVERIDADE DA  
SIGATOKA AMARELA DA BANANEIRA EM FUNÇÃO DO SILÍCIO,  
POTÁSSIO E CÁLCIO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA**

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

APROVADA em 28 de abril de 2016.

Dra. Deila Magno Santos Botelho	UFLA
Dr. Hudson Teixeira	EPAMIG
Dr. Mario Sobral de Abreu	UFLA
Dr. Rafael Pio	UFLA

Dr. Edson Ampélio Pozza  
Orientador

**LAVRAS – MG**  
**2016**

*À minha fiel e companheira esposa, Maria Gilmara, por fazer parte da minha vida e estar sempre ao meu lado. Aos meus estimados pais, Maria Lucia e Wilson.*

*Aos meus queridos irmãos, Aldinei, Auriene, Audione e Adriana.*

*Aos meus sobrinhos Izabella, João Vitor e Rakelly.*

*À minha querida sogra, Maria Solange.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela criação de tudo e pela presença constante na minha vida.

À Universidade Federal de Campina Grande pela formação em Agronomia.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia pela oportunidade de realização do mestrado e do doutorado.

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

Ao professor Edson Ampélio Pozza, pela orientação no mestrado e no doutorado.

À professora Adélia pela coorientação.

Aos amigos Humberson Rocha e Silvino Intra pela amizade e apoio durante o desenvolvimento dos trabalhos.

Ao amigo Silvio Calazans pela assistência durante a condução dos experimentos.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

A todos os alunos do DFP, especialmente, os amigos da Epidemiologia e do controle químico.

A todos os funcionários da UFLA pelos serviços prestados.

Aos membros da banca, Hudson Teixeira, Rafael Pio, Mario Sobral e Deila Magna e os membros suplentes, Paulo Márcio Norberto e Leila Aparecida Salles Pio, pelo aceite do convite e pelas correções e sugestões.

Aos membros da banca de qualificação, Marília Goulart, Douglas Ramos Guelfi e Eduardo Alves pelas valiosas contribuições para o terceiro artigo.

Ao núcleo de estudos em Fitopatologia (Nefit) pelo apoio durante os congressos e pelos eventos organizados.

À Universidade Vale do Rio Verde (Unincor) pela oportunidade de ministrar aulas no curso de Agronomia.

Aos professores (a) da Unincor, Eliana Alcantra, Ramiro Rezende e Wezer Lismar, pela amizade.

Aos meus pais Wilson Alves e Maria Lucia pelo carinho, amor e pela sinceridade.

Aos meus irmãos Aldinei, Auriene, Audione e Adriana, pela fiel amizade.

Ao grande amor da minha vida, Maria Gilmara, pela paciência, sinceridade e companheirismo.

A todos não mencionados e que contribuíram para a concretização desse sonho.

*“Já é saber muito quando se sabe  
que não se sabe nada”*

**François Fénelon**



## RESUMO GERAL

A Sigatoka Amarela, cujo agente etiológico é o fungo *Pseudocercospora musae* (*Mycosphaerella musicola*), está entre os principais fatores limitantes da produção mundial de bananas. Entretanto, informações disponíveis sobre o processo infeccioso de *P. musae* e a influência da nutrição mineral, na severidade da doença, poderiam auxiliar nas estratégias de manejo cultural e aumento da produção de frutos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi caracterizar o processo infeccioso de *P. musae*, em folhas de bananeira, estudar o efeito do silício (Si) e da interação do potássio (K) com o cálcio (Ca) na severidade da Sigatoka Amarela. No primeiro estudo, amostras foliares inoculadas na superfície abaxial com *P. musae* foram analisadas 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a inoculação (HAI) e 36 e 50 dias após a inoculação (DAI). Os conídios germinaram entre 24 e 36 HAI e penetraram através dos estômatos entre 96 e 120 HAI ou, geralmente, a partir de 144 HAI. *P. musae* colonizou, intercelularmente, o parênquima esponjoso aos 36 DAI e, inter e intracelularmente, o parênquima paliádico aos 50 DAI. A esporulação ocorreu aos 50 DAI na superfície adaxial das folhas. No segundo estudo, bananeiras cultivadas em solução nutritiva com 0; 0,5; 1,0; 1,8; e 3,6 mmol L<sup>-1</sup> de ácido silícico (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>) foram inoculadas com suspensão de conídios. A severidade da doença foi avaliada e os dados foram integralizados em área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD). A AACPSD foi 49,27% menor na concentração de 3,05 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> quando comparada às plantas cultivadas sem a adição de Si. Em relação ao acúmulo de silício, na concentração de 3,6 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>, o teor foliar do elemento foi 23,53% maior em relação à testemunha. No terceiro estudo, plantas cultivadas em solução nutritiva com 5 concentrações de K (1, 2, 4, 6 e 8 mmol L<sup>-1</sup>), combinadas com 5 de Ca (1, 3, 5, 7 e 9 mmol L<sup>-1</sup>), constituindo 25 tratamentos, foram inoculadas com suspensão de conídios. A severidade da doença foi avaliada e os dados da severidade, também, foram integrados em AACPSD. Não houve interação entre as concentrações do K e do Ca para a AACPSD, todavia a AACPSD aumentou com o incremento das concentrações do K de 1 para 6 mmol L<sup>-1</sup>. O incremento do K levou à redução dos teores de clorofilas *a* e *b* e dos nutrientes N, P, Mg, B, Cu, Zn e Mn e ao aumento do peso seco total das plantas.

Palavras-chave: *Musa* spp., *Mycosphaerella musicola*. Microscopia eletrônica de varredura. Nutrição mineral. Desequilíbrio nutricional.

## GENERAL ABSTRACT

Yellow Sigatoka leaf spot, caused by *Pseudocercospora musae* (*Mycosphaerella musicola*), is one of main threats to banana production around the world. However, information regarding the infection process of *P. musae* and the influence of mineral nutrition on the disease severity could help with cultural control strategies and increase the fruit yield. Therefore, this work aimed to characterize the infectious process of *P. musae* in banana leaves, to study the effect of silicon (Si) and the interaction between potassium (K) and calcium (Ca) on the Yellow Sigatoka leaf spot severity. In the first study, samples were inoculated on the abaxial leaf surface with *P. musae* and analyzed at 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144, and 168 hours after inoculation (HAI) as well as 36 and 50 days after inoculation (DAI). The conidia germinated between 24 and 36 HAI and penetrated through the stomata between 96 and 120 HAI, or usually from 144 HAI. *P. musae* colonized intercellularly the spongy parenchyma at 36 DAI and inter- and intracellularly the palisade parenchyma at 50 DAI. The sporulation occurred at 50 DAI on the adaxial leaf surfaces. In the second study, banana plants grown in nutrient solution with 0; 0.5; 1.0; 1.8 and 3.6 mmol L<sup>-1</sup> of silicic acid (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>) were inoculated with conidial suspension. The disease severity was assessed and data were integrated in the area under the disease severity progress curve (AUDSPC). The lower AUDSPC was 49.27% for the concentration of 3.05 mmol L<sup>-1</sup> of H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> compared to plants grown without Si addition. Regarding silicon accumulation, at 3.6 mmol L<sup>-1</sup> H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>, leaf Si content was 23.53% higher compared to the control. In the third study, plants grown in nutrient solution with 5 K concentrations (1, 2, 4, 6, and, 8 mmol L<sup>-1</sup>) combined with 5 Ca concentrations (1, 3, 5, 7, and, 9 mmol L<sup>-1</sup>), forming 25 treatments, were inoculated with conidial suspension. The disease severity was assessed and the data were integrated in the AUDSPC. There was no interaction between concentrations of K and Ca for AUDSPC, although the AUDSPC increased with the increase of K concentrations from 1 to 6 mmol L<sup>-1</sup>. The K increase led to a reduction in chlorophyll *a* and *b* contents and in the N, P, Mg, B, Cu, Zn, and, Mn nutrients as well as increased the total plant dry weight.

Keywords: *Musa* spp., *Mycosphaerella musicola*. Scanning electron microscopy. Mineral nutrition. Nutritional imbalance.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Características gerais da bananeira</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>A Sigatoka Amarela da bananeira</b> .....	15
<b>2.3</b>	<b>Processo infeccioso de <i>Pseudocercospora musae</i></b> .....	18
<b>2.4</b>	<b>O silício no controle de doenças de plantas</b> .....	19
<b>2.5</b>	<b>O potássio e o cálcio no controle de doenças de plantas</b> .....	23
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	27
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS</b> .....	35
	<b>ARTIGO 1 Characterization of the <i>Pseudocercospora musae</i> infectious process in banana leaves by scanning electron microscopy</b> .....	35
	<b>ARTIGO 2 Silício reduz a severidade da Sigatoka Amarela em bananeira cultivada em solução nutritiva</b> .....	55
	<b>ARTIGO 3 Interaction between K and Ca on the severity of Yellow Sigatoka in banana plants</b> .....	77

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

A banana está entre as frutas mais consumidas no mundo, constituindo importante papel social e econômico na geração de emprego e renda (FIORAVANÇO, 2003). A produção mundial de banana, em 2013, foi de 105, 96 milhões de toneladas, destacando-se como maiores produtores Índia, China, Filipinas, Brasil e Equador (FAOSTAT, 2016). Em 2015, o Brasil produziu cerca de sete milhões de toneladas, sendo os estados maiores produtores São Paulo, Bahia, Minas Gerais e Santa Catarina e Pará (IBGE, 2015). Apesar desses valores expressivos, vários fatores têm contribuído para reduzir a produtividade, destacando-se, entre eles, as doenças.

A Sigatoka Amarela, cujo agente etiológico é o fungo *Pseudocercospora musae* Zimm. Deighton/*Mycosphaerella musicola* Leach ocorre em todas as regiões produtoras de banana do mundo, ocasiona redução na margem de 50%, dependendo do microclima (CORDEIRO; MATOS, 2005; GOMES et al., 2013). O fungo infecta as folhas e os sintomas da doença são lesões necróticas com halos amarelos, responsáveis por reduzir a área fotossintetizante da planta e, conseqüentemente, a produção e a qualidade do fruto (CASTELAN et al., 2013).

O conhecimento do processo infeccioso de *P. musae*, bem como o momento da ocorrência dos eventos, poderá auxiliar nas estratégias de controle da doença. De acordo com Goos e Tschirch (1963), conídios de *P. musae* germinam na superfície de folhas de bananeira entre 24 e 48 h e penetram nos estômatos após 96 horas. Passos et al. (2013), também, constataram penetração de *P. musae* nos estômatos após um período de crescimento epifítico superior a 96 horas. Após penetrar, o patógeno coloniza o tecido do hospedeiro para estabelecer as relações de parasitismo (PAULA et al., 2015). Entretanto,

informações sobre a colonização de *P. musae* em folhas de bananeira são escassas. Os estudos realizados, anteriormente, constataram esporulação de *P. musae* ocorrendo tanto na superfície abaxial quanto na adaxial, embora com maior frequência nessa última superfície (STOVER, 1970; SURRIDGE et al., 2003). Contudo, esses trabalhos foram realizados com amostras coletadas no campo, onde as condições são favoráveis à penetração em ambos os lados da folha.

O manejo da Sigatoka Amarela envolve, basicamente, a aplicação periódica de fungicidas e o uso de variedades resistentes (CORDEIRO; MATOS, 2005; FERREIRA; CORDEIRO; MATOS, 2003; PATEL, 2009). Todavia, o uso sistemático de produtos químicos pode elevar o custo de produção, selecionar populações resistentes a fungicidas e aumentar os riscos de contaminação, humano e ambiental. Por outro lado, o uso de variedades resistentes, na maioria das vezes, desagrada o consumidor, em razão da oferta de variedades pouco palatáveis e sem apelo comercial.

Como método alternativo de manejo, o fornecimento de nutrientes em equilíbrio contribui para constituir barreiras de resistência (POZZA; POZZA, 2012). Dentre os elementos minerais, utilizados no manejo de doenças, destaca-se o silício (Si), por reduzir a severidade de importantes doenças em plantas de importância econômica (DATNOFF et al., 2007; POZZA et al., 2015). Em bananeira, alguns estudos preliminares comprovaram redução das doenças com o fornecimento do Si. Kablan et al. (2012) constataram redução na severidade da Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) de 20,5 para 18,8%, em plantas cultivadas em solução nutritiva e de 68,9 para 39,5%, em plantas cultivadas no solo. Vermeire et al. (2011) verificaram, com o fornecimento de Si, no solo, redução de até 50% na porcentagem de raízes necrosadas por *Cylindrocladium spathiphylli*. De forma semelhante, o Mal do Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) foi 15,98% maior em plantas crescidas sem o fornecimento de Si no

solo (FORTUNATO et al., 2012). Apesar desses resultados, trabalhos envolvendo a Sigatoka Amarela, nesse sentido, são escassos.

Além do efeito isolado, é importante conhecer como a interação dos nutrientes na planta influencia a intensidade das doenças. O K e o Ca competem entre si e com outros nutrientes por mesmos sítios de absorção, resultando em desbalanço nutricional das plantas (MARSCHNER, 2012). O desequilíbrio da relação K/Ca promoveu alterações no estado nutricional e favoreceu a infecção de patógenos em cafeeiro e soja (GARCIA JÚNIOR et al., 2003; PINHEIRO et al., 2011). Em bananeira, não existe relato enfatizando a interação desses nutrientes, na intensidade da Sigatoka Amarela, entretanto efeitos isolados foram encontrados. Freitas et al. (2015b) constataram maior intensidade da Sigatoka Amarela em plantas cultivadas em solução nutritiva deficiente em K. Por outro lado, a severidade dessa doença foi menor em plantas crescidas em solo com maiores teores de Ca (FREITAS et al., 2015a; GERALD et al., 2003).

Diante dos fatos abordados, os objetivos desse trabalho foram caracterizar o processo infeccioso de *Pseudocercospora musae* e avaliar o efeito do silício e da interação do K com o cálcio, na severidade da Sigatoka Amarela da bananeira, em plantas cultivadas em solução nutritiva.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Características gerais da bananeira

A bananeira, produtora de frutas comestíveis, pertence à classe Monocotiledônea, ordem Scitaminea, família Musaceae, subfamília Musoideae, gênero *Musa* e ao subgênero *Eumusa* (DANTAS et al., 1997; DANTAS; SOARES FILHO, 2000; SIMMONDS, 1973). A fruta está entre as mais produzidas e consumidas no mundo (DA SILVA; TARSITANO; BOLIANI, 2005). De acordo com dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (2016), a produção mundial de banana, em 2013, foi de 105,96 milhões de toneladas, destacando-se como maiores produtores Índia, China, Filipinas, Brasil e Equador. No Brasil, segundo informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2016), a produção, em 2015, foi cerca de sete milhões de toneladas, tendo como os estados maiores produtores São Paulo (1,15 milhão de toneladas), Bahia (995 mil toneladas), Minas Gerais (796 mil toneladas), Santa Catarina (710 mil toneladas) e Pará (586 mil toneladas).

A bananeira é uma planta tipicamente tropical, cujo desenvolvimento é favorecido por temperatura em torno de 28 °C, precipitação anual de 1.900 mm, bem distribuída no decorrer do ano e umidade relativa superior a 80% (CRISÓSTOMO; NAUMOV, 2009). As plantas apresentam crescimento e desenvolvimento rápido, necessitando de concentrações adequadas de nutrientes disponíveis no solo e consequente nutrição equilibrada para alcançar maiores produções (SANTOS et al., 2009; SILVA, SILVA; PEREIRA, 2011). Entre os macronutrientes, potássio (K) e nitrogênio (N) são os absorvidos, em maiores quantidades, seguidos por magnésio (Mg) e cálcio (Ca). Em sequência e com menor grau de absorção estão enxofre (S) e fósforo (P). Dos micronutrientes,

boro (B), zinco (Zn) e cobre (Cu) são os mais absorvidos. Os demais nutrientes, mesmo sendo absorvidos em menores quantidades, exercem funções essenciais, durante o crescimento e o desenvolvimento da planta, não devendo, em qualquer circunstância, serem dispensados. Além da produção, estudos realizados recentemente com a bananeira têm evidenciado que a nutrição equilibrada, também, aumenta a resistência às doenças (FREITAS et al., 2015a, 2015b; FURTADO et al., 2009; SILVA; RODRIGUES, 2013; UCHÔA et al., 2011).

Entre as principais doenças da bananeira, destacam-se a Sigatoka Amarela (*Pseudocercospora musae*), a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) e o Mal do Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). A Sigatoka Negra, apesar da sua natureza devastadora, continua restrita em algumas regiões produtoras, provavelmente, em função das condições climáticas desfavoráveis ao progresso da doença. Em contrapartida, a Sigatoka Amarela, por ser endêmica em todas as áreas produtoras, continua sendo um grande problema para a bananicultura mundial, ocasionando em ambiente favorável, redução em torno de 50% no potencial produtivo (CORDEIRO; MATOS, 2005; GOMES et al., 2013; ROCHA et al., 2012; SURRIDGE et al., 2003).

## **2.2 A Sigatoka Amarela da bananeira**

A Sigatoka Amarela, cujo agente etiológico é o fungo *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton, na fase anamórfica ou assexuada e *Mycosphaerella musicola* Leach, na fase teleomórfica ou sexuada, foi relatada pela primeira vez próximo a Biotenzorg, em Java, por Zimmermann, em 1902. No entanto, os primeiros prejuízos de importância foram relatados nas Ilhas Fiji, vale de Sigatoka em 1912, resultando no nome popular da doença (PHILPOTT; KNOWLES, 1913). No Brasil, a doença foi constatada, inicialmente, no estado



do Amazonas, em 1944, estendendo-se, posteriormente, para todos os estados brasileiros (CORDEIRO; MATOS; KIMATI, 2005).

Os sintomas iniciais da doença são pequenas estrias de cor verde-clara, com, aproximadamente, 1 mm de comprimento, visíveis na superfície superior das folhas. Essas estrias crescem no sentido das nervuras secundárias, expandindo-se e adquirindo forma elíptica, podendo ocorrer formação de um halo amarelo ao redor delas. O centro da lesão torna-se necrótico e acinzentado. As lesões adquirem formato oval e podem coalescer e afetar grandes áreas da folha (VENTURA; HINZ, 2002).

No interior das lesões são produzidos três tipos de frutificações, espermogônios, peritécios e esporodóquios (STOVER, 1970). Os espermogônios são formados em ambas as superfícies foliares, porém, com maior predominância, na abaxial. Essas estruturas correspondem à fase sexuada, responsável por produzir os gametas masculinos, as espermásias e o órgão sexual feminino, uma hifa espiralada, formada no interior de jovens ascocarpos, denominadas de tricógines (SIMMONDS, 1933; WARDLAW, 1961). Segundo Simmonds (1933), os espermogônios surgem no interior de uma base estromática de velhas frutificações conidiais ou independentemente, formando frutificações negras em formato de frascos. Já as espermásias são formadas em longas cadeias e possuem formato semelhante ao de bactérias, são minúsculas, oblongas e hialinas e podem ser visualizadas sendo expelidas a partir de um ostíolo ou poro no ápice dos espermogônios. O esporo sexual resultante é o ascósporo, formado no interior dos ascos, os quais se encontram contidos nos peritécios imersos no tecido foliar. Na fase assexuada, massas de conídios em esporodóquios são produzidas a partir dos estômatos, tanto na superfície abaxial quanto na adaxial, embora com maior frequência nessa última superfície (STOVER, 1970; SURRIDGE et al., 2003). Portanto, estão envolvidos dois

tipos de esporos no aparecimento da doença, o ascósporo, esporo sexuado e o conídio, esporo assexuado (ROCHA et al., 2012).

Os conídios são produzidos, continuamente, ao longo das estações chuvosas do ano, declinando, acentuadamente, durante épocas frias e secas (LEACH, 1946). Por outro lado, os ascósporos são liberados mais tardiamente e forçados para fora dos peritécios, durante épocas úmidas ou secas, mas associados às ocorrências de fortes orvalhos (SIMMONDS, 1966). Rocha et al. (2012) constataram maiores concentrações de ascósporos, nas primeiras horas do dia e maiores picos de conídios, após o escorrimento do orvalho aderido às folhas. Segundo esses autores, o aumento da severidade da doença, nos períodos secos e chuvosos, foi em virtude das infecções causadas por ascósporos e conídios, respectivamente.

A Sigatoka Amarela é uma doença de difícil controle. Recomenda-se usar um conjunto de medidas, que envolvem, principalmente, a utilização de variedades resistentes e a aplicação de fungicidas (CORDEIRO; MATOS, 2005). A utilização de variedades resistentes, por ser eficiente e ambientalmente ecológica, deve ser sempre preferível. Contudo, a dificuldade de aliar, em uma única cultivar, resistência às doenças com características necessárias, para o consumo, exige o emprego de outras medidas de controle. Sendo assim, a aplicação periódica de fungicidas sistêmicos e protetores constitui a principal medida empregada no manejo da Sigatoka Amarela (BRITO, 2015; CORDEIRO; MATOS, 2005; FERREIRA; CORDEIRO; MATOS, 2003; PATEL, 2009). Todavia, o uso sistemático de produtos químicos pode elevar o custo de produção, selecionar populações resistentes aos fungicidas e aumentar os riscos de contaminação humana e ambiental. Outras medidas complementares, como o uso de plantas adequadamente nutridas, têm sido alvo de pesquisas recentes (FREITAS et al., 2015b). A bananeira, adequadamente, nutrida apresenta rápida emissão de folhas, ocorrendo, nesta condição, o

aparecimento de folhas em intervalos menores, além da melhoria nas barreiras de resistência física e química, pela melhor expressão da resistência, principalmente, a horizontal (CORDEIRO; MATOS, 2005).

### **2.3 Processo infeccioso de *Pseudocercospora musae***

A infecção é uma das etapas básicas do ciclo das relações patógeno-hospedeiro. Ela tem início na pré-penetração e termina com o estabelecimento de relações parasitárias estáveis entre patógeno e hospedeiro, ou seja, o início da patogênese (PAULA et al., 2015). Em folhas de bananeira, conídios de *P. musae* germinam entre 24 e 48 h e penetram nos estômatos após um período de crescimento epifítico superior a 96 horas na superfície foliar (GOOS; TSCHIRCH, 1963; PASSOS et al., 2013). Não há evidências de penetração de *P. musae* por outras vias, porém, em trabalhos realizados com outros fungos, cercosporioides foram relatadas diferentes formas de penetração, incluindo pela epiderme para *C. henningsii* em mandioca (BABU et al., 2009), por meio de achaduras na epiderme e estômatos para *C. coffeicola* em café (SOUZA et al., 2011) ou apenas pelos estômatos para *P. macadamiae* em macadâmia (MILES et al., 2009), *C. moricola* em amoreira (GUPTA et al., 1995) e *C. caricis* em tiririca (BORGES NETO et al., 1998). Além disso, várias espécies de fungos, incluindo alguns cercosporioides, produziram apressórios em resposta a sinais físicos específicos na superfície hospedeira ou sinais químicos liberados por seu hospedeiro (BABU; KUMAR; GOVINDAIAH, 2009; GUPTA et al., 1995; KUMAR et al., 2001). Todavia, essas informações, ainda, não estão disponíveis para *P. musae* em bananeira.

Após penetrar, o patógeno coloniza o tecido do hospedeiro para estabelecer as relações de parasitismo (PAULA et al., 2015). Na literatura, informações sobre a colonização de *P. musae*, em folhas de bananeira, também,

são escassas. Entretanto, para alguns fungos cercosporioides, esse evento está bem esclarecido. Como exemplos, citam-se a colonização intercelular de *P. macadamiae*, nos parênquimas paliçádico e esponjoso de frutos de macadâmia (MILES et al., 2009) e a inter e intracelular de *C. coffeicola* no parênquima esponjoso de folhas de cafeeiro (SOUZA et al., 2011).

Em relação à esporulação de *P. musae*, Surridge et al. (2003) e Stover (1970) verificaram que ela ocorre tanto na superfície abaxial quanto na adaxial, embora com maior frequência nessa última. No entanto, esses trabalhos foram realizados com amostras coletadas no campo, onde as condições são favoráveis à penetração em ambos os lados da folha. De acordo com Surridge et al. (2003), os conídios surgem pelo poro estomático. Porém, além dos estômatos, outras formas de liberação de conídios de fungos cercosporioides foram descritas na literatura, tais como, na subepiderme rompida para *P. macadamiae* (MILES et al., 2009), em torno dos estômatos para *C. coffeicola* (SOUZA et al., 2011), nas papilas epidérmicas e nervuras da folha para *C. henningsii* (BABU et al., 2009) e na epiderme rompida em torno da base dos tricomas para *C. moricola* (GUPTA et al., 1995).

## 2.4 O silício no controle de doenças de plantas

O silício (Si) é o segundo elemento mineral mais abundante no solo e constitui, aproximadamente, 28% da crosta terrestre (DATNOFF et al., 2007; EPSTEIN, 1994). Esse elemento está presente na solução do solo como ácido monomérico ou monossilícico ( $H_4SiO_4$ ) e é prontamente absorvido no sistema radicular (POZZA; POZZA; BOTELHO, 2015). Segundo Marschner (2012), todas as plantas cultivadas no solo contêm Si nos seus tecidos, porém a concentração varia conforme a espécie de planta. Quanto ao acúmulo de Si, as plantas são classificadas como acumuladoras, ou seja, aquelas cujos teores

foliares são superiores a 1% do peso seco e não acumuladoras com menos de 0,5% (MA; MIYAKE; TAKAHASHI, 2001).

Embora o Si não seja considerado essencial, para a maioria das espécies, seu acúmulo nas plantas traz inúmeros benefícios, como resistência às pragas e doenças e a diversos tipos de estresses abióticos tais como altas temperaturas, déficit hídrico e toxidez de ferro e manganês às raízes (DATNOFF et al., 2007; MARSCHNER, 2012; PEREIRA et al., 2009; POZZA; POZZA; BOTELHO, 2015).

O Si reduz a severidade de várias doenças de plantas, incluindo mono e dicotiledóneas (POZZA; POZZA; BOTELHO, 2015). No cultivo da bananeira, um estudo pioneiro foi realizado, em plantas cultivadas em solução nutritiva, contendo  $1,66 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  (HENRIET et al., 2006). Esses autores detectaram teores de 14,14 e  $21,25 \text{ g kg}^{-1}$  em folhas jovens e velhas, respectivamente. Após esse trabalho, iniciaram-se alguns estudos envolvendo o efeito do Si nas doenças da bananeira. Vermeire et al. (2011) verificaram que aplicação de  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ , no solo, elevou o acúmulo foliar de Si de 2,09 para  $16,71 \text{ g kg}^{-1}$  e reduziu, aproximadamente, 50% a porcentagem de raízes necrosadas por *Cylindrocladium spathiphylli*. Resultados semelhantes foram encontrados por Kablan et al. (2012), ao constatarem redução na severidade da Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) de 20,5 para 18,8%, em plantas cultivadas em solução nutritiva ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ) e de 68,9 para 39,5%, em cultivadas no solo ( $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ). Os autores atribuíram esses resultados ao acúmulo de Si, nos tecidos das plantas, que foram, em média,  $22,07$  e  $22,6 \text{ g kg}^{-1}$ , em plantas cultivadas em solução nutritiva e, no solo, respectivamente.

Em outro estudo realizado com Si, porém, utilizando  $1,75 \text{ g}$  de silicato de cálcio (10,5% Si, 25% Ca e 6% Mg)  $\text{kg}^{-1}$  de solo, o Mal do Panamá foi 15,98% maior nas plantas crescidas sem o fornecimento desse nutriente e o

aumento nos teores de Si nas raízes e no rizoma da bananeira foi 30,26 e 58,82%, respectivamente (FORTUNATO et al., 2012). Embora os resultados relatados sejam promissores, mais estudos são necessários, principalmente, envolvendo a Sigatoka Amarela.

Os benefícios do Si, na redução de doenças, estendem-se para outras plantas, incluindo as dicotiledôneas. A adição de 1 g de silicato de cálcio ( $\text{CaSiO}_3$ )  $\text{kg}^{-1}$  de substrato proporcionou, em mudas de cafeeiro (*Coffea arabica*), redução de 63,2%, nas folhas lesionadas por *Cercospora coffeicola* e de 43%, no total de lesões por planta, em comparação à testemunha sem aplicação de silicato (POZZA et al., 2004). Em outro trabalho, porém, utilizando  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  como fonte de Si, a área abaixo da curva de progresso do número de lesões/folha (AACPNLF) da Cercosporiose do cafeeiro foi reduzida de 44,27 para 32,75% com o aumento das doses no solo de 0 para 6 g  $\text{kg}^{-1}$ , respectivamente (BOTELHO et al., 2011). O Si, também, reduziu a intensidade de doenças em culturas anuais. No feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) foi 62,4% menor em plantas suplementadas com 1,89 g de silicato de cálcio ( $\text{SiO}_2$ )  $\text{kg}^{-1}$  de solo, quando comparada com plantas crescidas sem aplicação de silicato de cálcio (MORAES et al., 2006). Da mesma forma, porém, em solução nutritiva, o número de lesões da Ferrugem Asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) da soja (*Glycine max*) foi 24,3% menor em plantas supridas com 280 mg  $\text{L}^{-1}$  de silicato de potássio em relação às plantas cultivadas sem a adição de Si (LIMA et al., 2010).

Apesar dos resultados promissores do Si, para diversos patossistemas, seu mecanismo de ação, na resistência de plantas a patógenos, não está totalmente compreendido. Duas hipóteses foram propostas, para explicar a potencialidade do Si, na resistência às doenças. A primeira diz respeito à formação de uma barreira física de maneira a impedir a penetração dos

patógenos (POZZA et al., 2015). Para a bananeira, essa hipótese pode estar relacionada à modificação da parede celular. As evidências estão no trabalho de Asmar et al. (2013), ao constatarem em brotos de bananeira, crescidos em meio de cultura com  $1 \text{ g L}^{-1}$  de silicato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ), aumento de 1,44 para 1,9%, nos conteúdos foliares de celulose e de 1,05 para 1,83% nos de hemicelulose. Outra explicação, já consolidada para diversas plantas, mas ainda não confirmada para a bananeira, é a formação de uma dupla camada abaixo da cutícula após polimerização do ácido monossilícico (SANGSTER; HODSON; TUBB et al., 2001). De acordo com Kim et al. (2002), essa dupla camada atrasou a penetração de *Pyricularia grisea* em folhas de arroz. Pozza et al. (2004) observaram a presença de cutícula mais espessa, na superfície inferior de cafeeiro nutrido com Si, principalmente, em razão da camada de cera epicuticular mais desenvolvida. Para esses autores, essa camada contribuiu na redução do número de folhas lesionadas por *C. coffeicola*.

A segunda hipótese é a possível ativação dos mecanismos de defesa naturais da planta (POZZA et al., 2015). Asmar et al. (2013), citados anteriormente, também, constataram, em brotos de bananeira nutridos com  $1 \text{ g L}^{-1}$  de silicato de sódio, aumento nos teores foliares de tanino de 532,61 para 838,95%. De acordo com Khan et al. (2009), tanino é um metabólito secundário com propriedades antimicrobianas. Assim, o Si, também, atuaria na indução das reações de defesa da bananeira aos patógenos. Alguns estudos detectaram ação conjunta do Si, tanto na formação de barreira física como na ativação de enzimas relacionadas à defesa da planta (Pozza et al., 2015). Resende et al. (2013) constataram em plantas de sorgo, cultivadas com  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de Si e inoculadas com *Colletotrichum sublineolum*, alta deposição de Si, nos locais de infecção, menor tamanho de lesão e menor quantidade de acérvulos, quando comparadas com plantas não nutridas com Si. Além disso, com o fornecimento de Si, foram

detectados 48 e 96 h, após a inoculação, aumentos significativos de 140 e 75% na atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, respectivamente.

## **2.5 O potássio e o cálcio no controle de doenças de plantas**

O potássio, presente nas plantas como cátion  $K^+$ , desempenha diversas funções na planta (TAIZ; ZEIGER, 2013). Esse nutriente atua como ativador enzimático e participa de processos como abertura e fechamento de estômatos, fotossíntese, transporte de carboidratos e respiração (MARSCHNER, 2012; SHIMAZAKI et al., 2007). Além dessas funções, o  $K^+$  é importante no balanço de água na planta, na produção de cachos, de pencas e na qualidade dos frutos (MELO et al., 2010). O  $K^+$ , também, aumenta a resistência de plantas a patógenos, elevando a disponibilidade de proteínas e aminoácidos, entre elas, as envolvidas em constituir barreiras de resistência. Além disso, aumenta os teores de fitoalexinas e fenóis, ao redor dos locais de infecção, de forma a reduzir a colonização e a reprodução dos patógenos (HUBER; ARNY, 1985). Indiretamente, o  $K^+$  reforça a parede celular e a formação de material inter e intracelular, dificultando a penetração de agentes patogênicos e promovendo a cicatrização de ferimentos (LI; PING; JIN et al., 2010; POZZA; POZZA, 2012).

No cultivo da bananeira, Freitas et al. (2015b), objetivando avaliar a incidência da Sigatoka Amarela, em plantas cultivadas em solução nutritiva deficiente em macronutrientes e Boro, constataram que a maior área abaixo da curva de progresso do número de lesões (AACPNL) ocorreu nas plantas do tratamento deficiente em  $K^+$ . De acordo com esses autores, possivelmente, o resultado foi em decorrência do  $K^+$  ser requerido em maior quantidade pela bananeira e, também, em virtude das diversas funções exercidas por esse nutriente na planta. O  $K^+$ , também, influenciou outras doenças da bananeira, porém, em trabalhos realizados no solo. Uchôa et al. (2011) observaram, por



meio da geoestatística, redução na intensidade da Sigatoka Negra de 260 para 117, com o aumento dos teores de  $K^+$  de 28 para 57,5  $mg\ dm^{-3}$ , respectivamente. Em outro estudo, o número de plantas, com sintomas de Mal do Panamá, foi maior em áreas onde as plantas apresentaram menores teores foliares de  $K^+$  (FURTADO et al., 2009). Da mesma forma, Silva e Rodrigues (2013) observaram que adubações, com doses crescentes de  $K_2O$  até 800  $kg\ ha^{-1}$  ano, reduziram a porcentagem de bananeiras infectadas com o Mal do Panamá.

Em relação ao cálcio ( $Ca^{2+}$ ), seus íons são utilizados, na síntese de novas paredes celulares, em particular a lamela média, que separa células recentemente divididas. O cálcio, também, é utilizado no fuso mitótico durante a divisão celular. Ele é necessário, para o funcionamento normal das membranas vegetais e tem papel de mensageiro secundário, em várias respostas das plantas, tanto a sinais ambientais quanto hormonais (TAIZ; ZEIGER, 2013). Esse nutriente é um dos mais importantes no manejo de doenças de plantas. Segundo Marschner (2012), a concentração de Ca, nos tecidos das plantas, afeta a incidência de doenças por meio de três mecanismos. Desempenha papel chave no reconhecimento de patógenos invasores na membrana plasmática, atuando como mensageiro secundário (YANG; SHAH; KLESSIG, 1997), mantém a estabilidade de biomembranas, evitando o efluxo de compostos de baixo peso molecular do citoplasma para o apoplasto (MARSCHNER, 2012) e fortalece a parede celular, dificultando a infecção de patógenos (BATEMAN; LUMSDEN, 1965).

Para doenças da bananeira, Freitas et al. (2015a), estudando a distribuição da espacial da Sigatoka Amarela, constataram, por meio de mapas de Krigagem, menor índice de infecção nas áreas com maiores teores de Ca. De forma semelhante, mas, utilizando a estatística clássica, Gerald et al. (2003) verificaram redução na severidade da Sigatoka Amarela, em áreas com maiores teores de Ca.

A importância do Ca, na redução de doenças, foi relatada para vários outros patossistemas. Garcia Júnior et al. (2003) constataram redução de 17,76 para 14,78, na área abaixo da curva de progresso de incidência (AACPI) de *C. coffeicola*, em cafeeiro, em função do aumento da concentração de Ca em solução nutritiva de 2 para 8 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Em outro trabalho semelhante, porém, utilizando solução nutritiva para irrigar plantas de carvalho (*Quercus ilex* subsp. *ballota*), Serrano et al. (2013) constataram maior número de plantas com sintomas de podridão radicular (*Phytophthora cinnamomi*), em plantas irrigadas com solução deficiente em Ca. Já, no solo, a aplicação de CaCO<sub>3</sub> e calcário dolomítico (125, 250 ou 500 g/m<sup>2</sup>) reduziu o desenvolvimento de pseudotécios e a produção de ascósporos de *Mycosphaerella citri* (MONDAL; TIMMER, 2003).

Além do efeito isolado, é importante conhecer como a interação dos nutrientes na planta influencia a intensidade das doenças. Segundo Marschner (2012), os cátions K<sup>+</sup> e o Ca<sup>2+</sup> competem entre si e com outros nutrientes, por mesmos sítios de absorção, resultando em desbalanço nutricional das plantas. Na literatura, são encontrados diversos trabalhos atribuindo o aumento da intensidade das doenças ao desequilíbrio da relação K<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Porém, para as doenças da bananeira, os estudos são escassos, todavia, nota-se que a planta é extremamente sensível ao desequilíbrio nutricional (SILVA et al., 2008).

Em cafeeiro, o acréscimo de K, em solução nutritiva de 4 para 7 mmol L<sup>-1</sup>, elevou a área abaixo da curva de progresso da Cercosporiose de 14,6 para 17,39, respectivamente (GARCIA JÚNIOR et al., 2003). Segundo esses autores, nas maiores concentrações de K, houve baixa absorção de Ca, resultante da competição entre os íons. Essa informação foi comprovada por Pinheiro et al. (2011), ao detectarem redução de 26,4% nos teores foliares de Ca em soja, com o aumento de K em solução nutritiva. Também, no cafeeiro, a Mancha de Phoma (*Phoma tarda*) apresentou aumento na área abaixo da curva de progresso da

incidência (AACPI) e da severidade (AACPS), em concentrações de K, acima de 6,59 e 6,57 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente (LIMA et al., 2010). O excesso de K, até 30 mmol L<sup>-1</sup>, influenciou o aumento da Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em morangueiro (NAM et al., 2006). No solo, o K aplicado de forma adequada, 8% de K<sub>2</sub>O, reduziu a Antracnose (*Discula destructiva*) em *Cornus florida* L. Entretanto o oposto foi constatado quando o dobro de K<sub>2</sub>O foi fornecido (HOLZMUELLER; JOSE; JENKINS, 2007). Apesar desses resultados, vale ressaltar que o K, quando disponibilizado para a planta, em níveis adequados, não compete com os demais nutrientes presentes nos tecidos foliares (GARCIA JÚNIOR et al., 2003). Dessa forma, o conhecimento dos efeitos dos nutrientes, para cada patossistema, poderá contribuir na elaboração de estratégias de manejo e, conseqüentemente, reduzir o número de aplicações de defensivos agrícolas, aumentando a sustentabilidade ambiental e lucratividade no cultivo de bananas.

## REFERÊNCIAS

- ASMAR, S. A. et al. Características morfofisiológicas de bananeiras ‘Grande Naine’ aclimatizadas em resposta a utilização de silício in vitro. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p.73-82, jan.-fev. 2013.
- BABU, A. M. et al. Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora henningsii* on cassava leaves. **Journal of phytopathology**, Berlin, v. 157, n. 1, p.57-62, Jan. 2009.
- BABU, A. M.; KUMAR, V.; GOVINDAIAH. Surface ultrastructural studies on the infection process of *Pseudocercospora mori* causing grey leaf spot disease in mulberry. **Mycological Research** v. 106, n. 08, p.938-945, 2002.
- BATEMAN, D. F.; LUMSDEN, R. D. Relation between calcium content and nature of the peptic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology** v. 55, p.734-738, 1965.
- BORGES NETO, C. R. et al. Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora caricis* on purple nutsedge. **Fitopatologia Brasileira** v. 23, n.2, p.169-172, 1998.
- BOTELHO, D. M. S. et al. Efeito do silício na intensidade da cercosporiose e na nutrição mineral de mudas de cafeeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p.23-29, jan.-mar. 2011.
- BRITO, F. S. D. **Diversidade genética de populações de *Mycosphaerella musicola* e caracterização do efetor LysM em *Mycosphaerella graminicola***. 2015. 169p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
- CASTELAN, F. P. et al. Relation between the severity of Sigatoka disease and banana quality characterized by pomological traits and fruit green life. **Crop Protection**, Amsterdam, v. 50, p.61-65, Ago. 2013.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P. Expressão da Resistência de Variedades de Banana à Sigatoka-Amarela. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 30, n. 5, p.534, set.-out. 2005.

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

CRISÓSTOMO, L. A.; NAUMOV, A. Adubando para alta produtividade e qualidade: fruteiras tropicais do Brasil. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2009. 238p.

DA SILVA, M. D. C. A.; TARSITANO, M. A. A.; BOLIANI, A. C. Análises técnica e econômica da cultura da bananeira 'Maçã' (*Musa* spp.) na região noroeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n.1, p. 139-142, abr. 2005.

DANTAS, J. L. L. et al. Classificação botânica, origem, evolução e distribuição geográfica. In: E.J. Alves (Ed.), **A Cultura da Banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**, Brasília, Embrapa, 1997. pp. 27-34.

DANTAS, J. L. L.; SOARES FILHO, W. S. Classificação botânica, origem e evolução. In: Cordeiro, Z. J. M. (Org). **Banana. Produção: aspectos técnicos**. Embrapa: Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 12-16.

DATNOFF, L. E.; RODRIGUES, F. A.; SEEBOLT, K. W. (2007) Silicon and Plant Disease. Pages 233–246 in: **Mineral Nutrition and Plant disease**. DATNOFF L, E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

EPSTEIN, E. **The anomaly of silicon in plant biology**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11-17, 1994.

FERREIRA, D. M. V.; CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. D. Sistema de pré-aviso para o controle da Sigatoka-amarela da bananeira no Recôncavo Baiano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p.429-431, dez. 2003.

FIORAVANÇO, J. C. Mercado mundial da banana: produção, comércio e participação brasileira. *Informações econômicas* v.33, p.15-27, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS DIVISION. **Production/Crops**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. >. Acesso em: 22 fev. 2016.

FORTUNATO, A. A. et al. Silicon suppresses Fusarium wilt development in banana plants. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 11-12, p. 674-679, Dez. 2012.

FREITAS, A. S. et al. Impact of nutritional deficiency on Yellow Sigatoka of banana. **Australasian Plant Pathology**, Toowoomba, v. 44, n. 5, p.583-590, ago. 2015b.

FREITAS, A. S. et al. Spatial distribution of Yellow Sigatoka Leaf Spot correlated with soil fertility and plant nutrition. **Precision Agriculture**, Oxford, v. 17, n. 1, p.93-107, jul. 2015a.

FURTADO, E. L. et al. Relações entre ocorrência do Mal-de-Panama em bananeira da cv. Nanicão e nutrientes no solo e nas folhas. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 4, p.201-2015, jul.-ago. 2009.

GÁRCIA JÚNIOR, D. et al. Incidência e severidade da cercosporiose do cafeeiro em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p.286-291, maio-jun. 2003.

GERALD, S. F. et al. Survey of Sigatoka leaf disease (*Mycosphaerella musicola* Leach) of banana and soil calcium levels in North Queensland. **Animal Production Science**, v. 43, n. 9, p. 1157-1161, out. 2003.

GOMES L. I. S. et al. *Mycosphaerella musicola* identified as the only pathogen of the Sigatoka disease complex present in Minas Gerais State, Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 12, p.1537-1543, nov. 2013.

GOOS, R. D.; TSCHIRCH, M. Greenhouse studies on the cercospora leaf spot of banana. **Transactions of the British Mycological Society** v. 46, p.321-330, 1963.

GUPTA, V. P. et al. Observations on the surface ultrastructure of conidial stage of *Cercospora moricola* and its infection process in mulberry. *Sericologia*, New Delhi, v. 35, p. 123-128, 1995.

HENRIET, C. et al. Effects, distribution and uptake of silicon in banana (*Musa* spp.) under controlled conditions. **Plant and soil**, The Hague, v. 287, n.1, p.359-374, ago. 2006.

HOLZMUELLER, E. J.; JOSE, S.; JENKINS, M. A. Influence of calcium, potassium, and magnesium on *Cornus florida* L. density and resistance to dogwood anthracnose. **Plant and Soil**, The Hague, v. 290, n.1-2, p.189-199, jan. 2007.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção agrícola municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

KABLAN, L. et al. Silicon reduces black Sigatoka development in banana. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 96, n. 2, p. 273-278, fev. 2012.

KHAN, R. et al. Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. **Molecules**, Switzerland, v. 14, n. 2, p.586-597, fev. 2009.

KIM, S. G. et al. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, p.1095-1103, out. 2002.

KUMAR, V. et al. Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease. **Journal of phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 11-12, p.629-633, dec. 2001.

LEACH, R. Banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola*) on the Gros Michel variety in Jamaica. Kingston: The Government Printer, 1946. 118p.

LI, W. J.; PING, H. E.; JIN, J. Y. Effect of potassium on ultrastructure of maize stalk pith and young root and their relation to stalk rot resistance. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n.10, p.1467-1474, oct. 2010.

LIMA, L. M. et al. Quantificação da ferrugem asiática e aspectos nutricionais de soja suprida com silício em solução nutritiva. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 1, p.51-56, 2010.

- MA, J. F.; MIYAKE, Y.; TAKAHASHI, E. Silicon as beneficial elements for crop.Plants. In: DATNOFF, L. E.; SNYDER, G. A.; KORNDÖRFER, G. H. Silicon in agriculture. Amsterdam: Elsevier, (Studies in Plant Science), v.8, p.17-39, 2001.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. London: Academic Press, 2012.
- MELO, A. S. et al. Crescimento, produção de biomassa e eficiência fotossintética da bananeira sob fertirrigação com nitrogênio e potássio. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 41 n. 3, p.417-426, jul.-set. 2010.
- MILES, A. K. et al. A. Infection, colonisation and sporulation by *Pseudocercospora macadamiae* on macadamia fruit. **Australasian Plant Pathology**, Toowoomba, v.38, n.1, p.36-43, jan. 2009.
- MONDAL, S. N.; TIMMER, L. W. Effect of urea, CaCO<sub>3</sub>, and dolomite on pseudothecial development and ascospore production of *Mycosphaerella citri*. **Plant disease**, Saint Paul, v. 87, n. 5, p.478-483, may 2003.
- MORAES, S. R. et al. Efeito de Fontes de Silício na Incidência e na Severidade da Antracnose do Feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.1, jan.-fev. 2006.
- NAM, M. H. et al. Effects of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium nutrition on strawberry anthracnose. **Plant pathology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 246-249, Apr. 2006.
- PASSOS, M. A. et al. Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, feb. 2013.
- PATEL, P. Chemical control of sigatoka leaf spot (*Mycosphaerella musicola*) of banana. **International Journal of Plant Protection** v. 2, n. 1, p.98-100, apr.-sep. 2009.
- PAULA, P. V. A. A. et al. Formas de penetração do gênero *Cercospora*. **Nucleus** v. 12, n. 2, p.271-280, out. 2015.
- PEREIRA, S. C. et al. Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34 n. 3, p.164-170, may-june. 2009.



PHILPOTT, J. C.; KNOWLES, C. H. Report on a visit to Sigatoka. Fiji: Pamphlet of the Department of Agriculture, n. 3, 1913.

PINHEIRO, J. B. et al. Severidade da ferrugem da soja, em função do suprimento de potássio e cálcio em solução nutritiva. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 1, p.43-50, jan.-fev. 2011.

POZZA, A. A. A. et al. Efeito do silício no controle da cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v. 29, n. 2, p.185-188, mar.-abr. 2004.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A. Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. In: SIMPÓSIO AVANÇOS NA OTIMIZAÇÃO DO USO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO MANEJO FITOSSANITÁRIO, 2012, Lavras: núcleo de estudos em fitopatologia, 2012.

POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; BOTELHO, D. M. D. S. Silicon in plant disease control. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n. 3, p.323-331, mai.-jun. 2015.

RESENDE, R. S. et al. Microscopic and biochemical aspects of sorghum resistance to anthracnose mediated by silicon. **Annals of Applied Biology**, v. 163, n. 1, p.114-123, jul. 2013.

ROCHA, H. S. et al. Temporal progress of Yellow Sigatoka and aerobiology of *Mycosphaerella musicola* Spores. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 6, p.277-285, jun. 2012.

SANGSTER, A. G.; HODSON, M. J.; TUBB, H. J. Silicon deposition in higher plants. In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndörfer GH (Eds) Silicon in Agriculture. **Amsterdam, Elsevier**. p.85-113, 2001.

SANTOS, V. P. et al. Fertirrigação da bananeira cv. Prata-Anã com N e K em um argissolo vermelho-amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 2, p.567-573, jun. 2009.

SERRANO, M. S. et al. Calcium mineral nutrition increases the tolerance of *Quercus ilex* to *Phytophthora* root disease affecting oak rangeland ecosystems in Spain. **Agroforestry systems**, v. 87, n. 1, p.173-179, feb. 2013.

SHIMAZAKI, K. et al. Light regulation of stomatal movement. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, n. 5, p. 219-247, jan. 2007.

SILVA, E. B.; RODRIGUES, M. G. V. Levantamento nutricional dos bananais da região norte de minas gerais pela análise foliar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p.695-698, dez. 2001.

SILVA, J. T. A. et al. Aplicação de potássio, magnésio e calcário em mudas de bananeira 'prata-anã' (AAB). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n.3, p.782-786, sep. 2008.

SILVA, J. T. A.; SILVA, I. P.; PEREIRA, R. D. Adubação fosfatada em mudas de bananeira 'Prata anã' (AAB), cultivadas em dois Latossolos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 2, p. 238-242, mar.-abr. 2011.

SIMMONDS, J. H. Banana Leaf Spot. Queensland: Department of Agriculture and Stock Division of Entomology and Plant Pathology, 1933. (Pamphlet, 6).

SIMMONDS, N. W. Bananas. 2nd ed. Longmans, Green & Co. Ltd. 1966. 512p.

SIMMONDS, N. W. Los platanos. Barcelona: Blume, 1973. 539p.

SOUZA, A. G. C. et al. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 159, n. 1, p. 6-11, June 2011.

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

SURRIDGE, A. K. J. et al. Identification of the pathogen associated with Sigatoka disease of banana in South Africa. **Australasian Plant Pathology** Toowoomba, v. 32, n. 1, p.27-31, mar. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, Porto Alegre Artmed., 2013.

UCHÔA, C. N. et al. Modelagem geoestatística da Sigatoka-negra e sua relação com a fertilidade do solo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 3, p.357-362, May-June 2011.

VENTURA, J. A.; HINS, R. H. Controle das doenças da bananeira. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTERIO, A. J. A.; COSTA, H. Controle de doenças de plantas fruteiras, v.2, p.839-938, 2002.

VERMEIRE, M. L. et al. Protective role of silicon in the banana-*Cylindrocladium spathiphylli* pathosystem. **European journal of plant pathology**, Dordrecht, v. 131, n. 4, p. 621-630, July 2011.

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.

YANG, Y.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Signal perception and transduction in  
plant defence responses. **Genes Development**, v. 11, n. 13, p.1621-1639, jul.  
1997.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**

**ARTIGO 1**

**Characterization of the *Pseudocercospora musae* infectious process in  
banana leaves by scanning electron microscopy**

Artigos submetidos ou em processo de submissão em periódicos.

Aurivan S. Freitas<sup>1</sup> • Edson A. Pozza<sup>1</sup> • Silvino I. Moreira<sup>1</sup> • Maria G. O.  
Soares<sup>1</sup> • Humberson R. Silva<sup>1</sup> • Eduardo Alves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plant Pathology Department, Federal University of Lavras, PO Box 3037, CEP  
37200-000, Lavras, MG, Brazil.

Corresponding author: Silvino I. Moreira, email: silvinoindra1@gmail.com

Preparado em concordância com as normas do periódico

**“Tropical Plant Pathology”**

(Versão preliminar – submetido)

**Abstract**

Yellow Sigatoka, caused by *Pseudocercospora musae*, is an important disease of banana. The aim of this study was to use scanning electron microscopy to elucidate the infection process of *P. musae* on leaf surfaces of banana seedlings. Leaf samples were inoculated on the abaxial surface of *P. musae* and analyzed at 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours after inoculation (HAI) and at 36 and 50 days after inoculation (DAI). The conidia germinated between 24 and 36 HAI and penetrated through the stomata between 96 and 120 HAI, or generally from 144 HAI. *P. musae* colonized the intercellular spongy parenchyma space at 36 DAI and the inter- and intracellular space of the palisade parenchyma at 50 DAI. The sporulation occurred at 50 DAI on the adaxial surface of leaves through emergence of conidia on conidiophores through the stomata. Considering the importance of Yellow Sigatoka for banana production, these results allow a better understanding of the life cycle of the fungus and may be useful in the development of disease management strategies.

**Keywords:** Yellow Sigatoka, germination, infection, colonization, sporulation.

## Introduction

The banana tree (*Musa* spp.) is widely cultivated in tropical and subtropical climates and is considered an important source of income in several countries (Araujo et al. 2014). The world production of bananas in 2013 was 105.96 million tons, with the largest producers being India, China, the Philippines, Brazil and Ecuador (Faostat 2013). Banana development and production can be affected by various diseases, especially Yellow Sigatoka leaf spot, which is responsible for reducing the productive potential by up to 50% in favorable microclimates (Aman and Rai 2015; Burt et al. 1997; Cordeiro and Matos 2005; Rocha et al. 2012). The etiologic agent is the fungus *Pseudocercospora musae* Zimm (teleomorph *Mycosphaerella musicola* Leach). This pathogen is found in all banana-producing regions across the world (Freitas et al. 2015a; Gomes et al. 2013; Noorulla et al. 2013; SurrIDGE et al. 2003). The fungus causes leaf lesions that are responsible for reducing the photosynthetic area of the plant and consequently the yield and fruit quality (Castelan et al. 2013). However, before symptoms are observed, the pathogen needs to germinate and infect the plant by crossing the structural and chemical resistance barriers to establish the parasitism relationship with the host.

The information available on the infectious process of *P. musae* in banana leaves is limited, especially in relation to the time of occurrence of the events. Goos and Tschirch (1963) observed *P. musae* conidia germination in banana leaves between 24 and 48 h. This process is slow and typical of the fungus and can influence the type and the place of penetration on the leaf surface. Previous studies showed penetration of the conidia germ tube of *P. musae* in stomata, after an epiphytic growth period of more than 4 days or 96 hours on the leaf surface (Goos and Tschirch 1963; Passos et al. 2013). However, other different forms of cercosporoid penetration have been found,

including via the epidermis for *Cercospora henningsii* on cassava (Babu et al. 2009), cracks in the epidermis and stomata for *C. coffeicola* on coffee (Souza et al. 2011) or only through stomata for *P. macadamiae* on macadamia (Miles et al. 2009), *C. moricola* on mulberry (Gupta et al. 1995) and *C. caricis* on sedge (Borges Neto et al. 1998). Furthermore, various species of fungi, including some cercosporoids, produced appressoria in response to specific physical characteristics on the host surface or chemical signals released from the host (Gupta et al. 1995; Kumar et al. 2001; Babu et al. 2002). However, this information is not yet available for *P. musae* on banana.

After penetrating, the pathogen colonizes the host tissue establishing parasite relations (Paula et al. 2015). In the literature, there is a lack of information on the colonization of *P. musae* in banana leaves. However, for some cercosporoid fungi this event is very clear; for instance, with intercellular colonization by *P. macadamiae* in the palisade and spongy parenchyma of macadamia fruit (Miles et al. 2009) and inter and intracellular colonization by *C. coffeicola* in spongy parenchyma coffee leaves (Souza et al. 2011).

Considering the sporulation of *P. musae*, SurrIDGE et al. (2003) and Stover (1970) found that the sporulation occurred both on the adaxial and, more frequently, on the abaxial leaf surface. However, these studies were performed with samples collected in the field, where the penetration conditions are favorable on both sides of the leaf. According to SurrIDGE et al. (2003), conidia arise from the stomatal pore. However, other forms of release have been described in the literature, such as in the sub-epidermis for *P. macadamiae* (Miles et al. 2009), around the stomata for *C. coffeicola* (Souza et al. 2011), in the epidermal buds and leaf ribs for *C. henningsii* (Babu et al. 2009) and the disrupted epidermis around the base of trichomes for *C. moricola* (Gupta et al. 1995).

This study was conducted in order to characterize the infectious process of *Pseudocercospora musae* in banana leaves, including germination, penetration, colonization and sporulation events, using scanning electron microscopy.

## **Material and Methods**

### **Growing conditions and plant material**

The experiment was conducted in the greenhouse, and the average relative humidity and the average temperature were 80.9% and 21.9 °C, respectively. A total of 33 banana seedlings were used (*Musa acuminata* 'Grande Naine AAA Cavendish'), which are highly susceptible to Yellow Sigatoka, with 49 days age, obtained from tissue culture. The seedlings were transplanted from the trays and grown in plastic pots containing 5 kg of substrate composed of a mixture of soil and sand in the proportion 1:1 (v:v). The soil was of type 2 class, Alfissol and clayey. The acidity was adjusted at 30 days before the transplant, using 1 g kg<sup>-1</sup> of calcium carbonate. Fertilization was applied by using 0.91, 0.62, 2.86 and 0.35 g per kg of soil of urea, potassium chloride, superphosphate and magnesium sulfate, respectively. Micronutrients were supplied by applying 1 mL of stock solution (2.82 g boric acid L<sup>-1</sup>, 3.75 g copper sulfate L<sup>-1</sup>, 11.73 g manganese sulfate L<sup>-1</sup>, 0.37 g molybdate L<sup>-1</sup>, 7.4 g ammonium and zinc sulfate L<sup>-1</sup>) kg<sup>-1</sup> of soil. Surface fertilization was applied at 30 and 60 days after transplanting, with the same amounts of urea and potassium chloride previously reported.



### **Isolation, mycelial growth and induction of sporulation of *Pseudocercospora musae***

*P. musae* was isolated from banana leaves that presented symptoms that are typical of Yellow Sigatoka (Cordeiro et al. 2011). After isolation, the mycelium was grown on Petri dishes with malt extract medium (20 g of malt extract, 20 g of agar and 1,000 mL of distilled water). In this step, the Petri dishes were incubated in a growth chamber for 12 h photoperiod, using four fluorescent lights of 20 Watts at 25 °C. In order to obtain the conidia we used the methodology proposed by Freitas et al. (2015b). Ten fragments of mycelium (5 mm diameter) from colonies after 26 days of growth were macerated. Then, the mash was diluted in 15 mL of tomato juice (200 mL of tomato juice, 1 g of CaCO<sub>3</sub> and 900 mL of distilled water) and transferred to Petri dishes of 9 cm diameter (200 mL of tomato juice, 20 g agar, 1 g of CaCO<sub>3</sub> and 900 mL of distilled water). To facilitate drying, the plates were left open inside an incubator with four 20-watt fluorescent bulbs, at a temperature of 25 °C and continuous fluorescent light. After drying the culture medium, approximately 48 hours of incubation, we added 10 mL of sterilized distilled water into each Petri dish and used a previously sterile glass rod to release the conidia from the dry mycelium. The obtained suspension was filtered on a double layer of gauze and concentrated by centrifugation at 5,000 g for 5 minutes. The concentration of the suspension was adjusted to  $8 \times 10^4$  conidia mL<sup>-1</sup> by counting using a light microscope and a Neubauer chamber, taking an average from four readings.

### **Inoculation procedure using *Pseudocercospora musae***

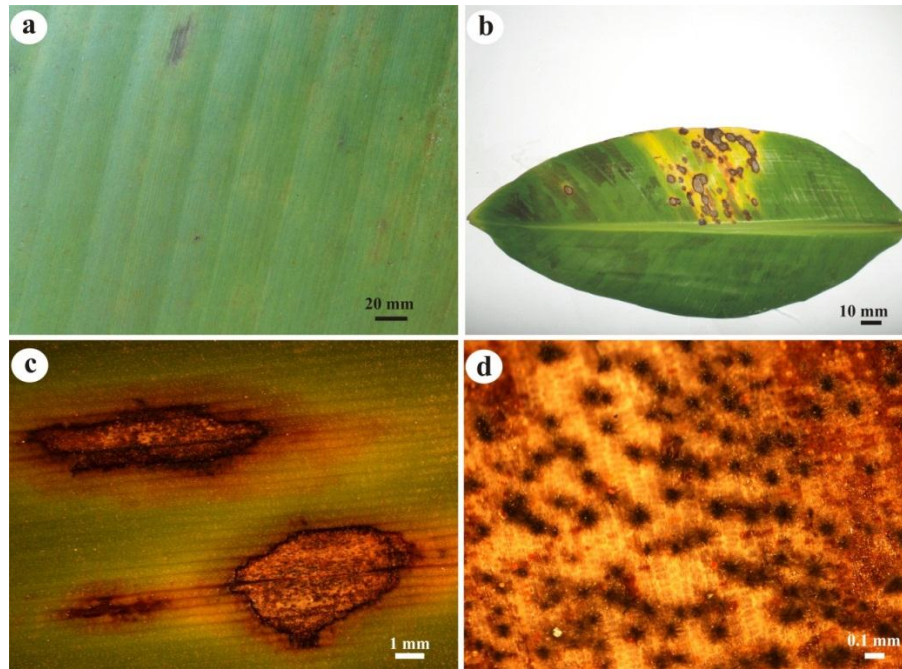
Inoculation was performed four months after transplanting by spraying 0.7 mL of spore suspension in an area of 36 cm<sup>2</sup> that was delimited in the middle

region of the abaxial surface of leaves 1 and 2. After inoculation, the plants were individually covered with transparent plastic bags, and remained in relative humidity 92% and temperature 23 °C. The removal of the plastic bags was performed according to the period of sample collection. For samples taken at 36 and 50 days after inoculation (DAI), the removal was performed at seven DAI.

### **Germination, penetration, colonization and sporulation of *Pseudocercospora musae* by scanning electron microscopy**

Germination and penetration of *P. musae* conidia were evaluated at 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours after inoculation (HAI), collecting 12 samples of 5 mm in diameter at each sampling time in the inoculated areas. The colonization and sporulation were analyzed when the first signs of symptoms started to appear and the sporulation in the lesions became evident (Fig. 1). In this case, there were samples collected at 24 and 36 samples of 5 mm diameter at 36 and 50 days after inoculation (DAI), respectively. Initially, all samples were fixed in modified Karnovsky solution (2.5% glutaraldehyde and 2.5% formaldehyde in sodium cacodylate buffer 0.05 M, pH 7.2 and 0.001 M CaCl<sub>2</sub>) for 24 h. After this stage, aiming to analyze the colonization of *P. musae* in leaf tissues, 12 samples were collected at 36 and 12 at 50 DAI and these were infiltrated in cryoprotectant solution (30% glycerol in water) for 30 minutes and sectioned transversely with a scalpel blade after being immersed in liquid nitrogen. After fixed and sectioned, samples were transferred to buffer solution of 0.05 M sodium cacodylate for 10 min. This procedure was repeated three times for each sample. Then, the material was transferred to 1% osmium tetroxide in water for one hour, then washed in distilled water three times and subsequently dehydrated in an ascending graded series of acetone (25%, 50%, 75%, 90% 10 min each once, and 100% three times for 10 min each). After

drying, the material was subjected to drying on a Critical Point Drier (Balzers CPD 030<sup>®</sup>). Then the samples were placed on aluminum supports and covered with a film of aluminum foil, using double-sided carbon tape. After adding the sample to aluminum substrates, pathogen colonization was also investigated in samples 12 to 36 and 12 to 50 DAI, by removing the epidermis using a transparent tape. In 12 samples collected at 50 DAI, we evaluated the sporulation on the abaxial and adaxial surface following the same procedure used to investigate the germination and penetration. Finally, all samples were covered with a gold layer on a Sputter coater (Balzers SCD 050<sup>®</sup>) and observed using a SEM LEO Evo 40 Zeiss operating at 20 kV with working distance of 8.5 mm. In total, 295 images were obtained by SmartSEM Zeiss<sup>®</sup> software. The selected images were edited using Corel Draw v.12.0<sup>®</sup> software, in order to locate and observe the germination events, penetration, colonization and sporulation of the pathogen.



**Fig. 1** Photographs of the symptoms of Yellow Sigatoka leaf spot on banana leaves. The beginning of the first symptoms at 36 days after inoculation (DAI) on the abaxial leaf surface (**a**). Necrotic lesions surrounded by yellow halo and necrotic center at 50 DAI on the adaxial leaf surface (**b-c**). Sporulation of *Pseudocercospora musae* in necrotic leaf tissue at 50 DAI (**d**).

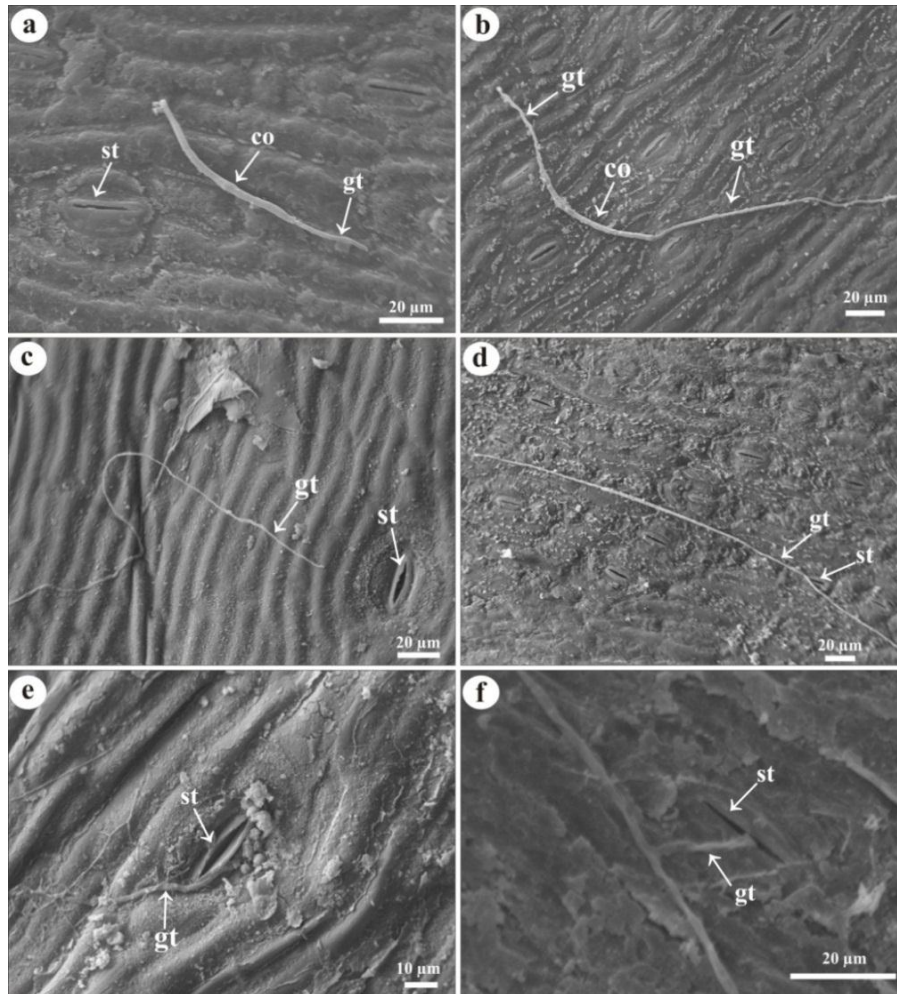
## Results

By using electron microscopy techniques we observed all infection events of *P. musae* from germination to sporulation.

### Germination and penetration of *Pseudocercospora musae*

There were variations in spore germination period on the abaxial surface of the leaves. Although some germinated within 12 hours, most started between 24 and 36 HAI (Fig. 2 a), presenting two germinal tubes located at each pole of

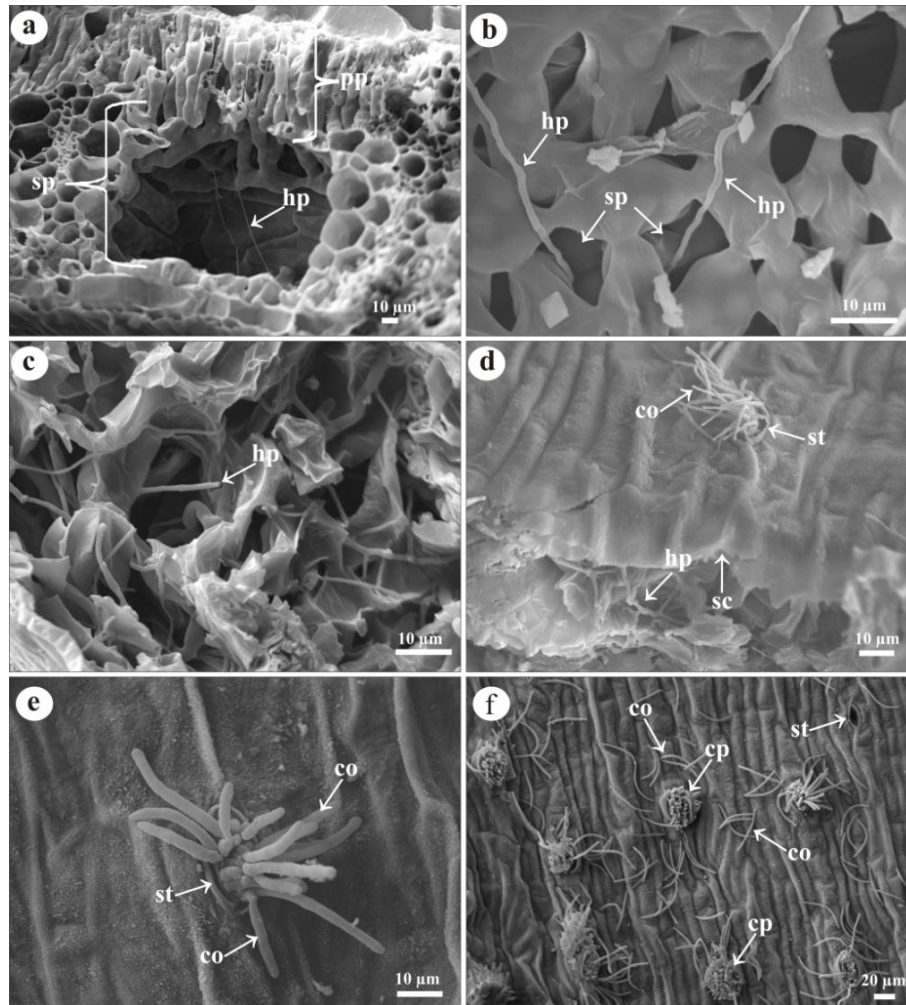
conidia (Fig. 2 b). However, some conidia issued more than two germinal tubes. On several occasions the growth of conidia towards the stomata has been observed (Fig. 2 c). In some cases, the germinal tubes distanced themselves from the stomata or passed over the guard cells without penetrating or moving toward the inside of the sub-stomatal cavity; however, there were no penetration wounds (Fig. 2 d and e). The penetration of the stomata occurred between 96 and 120 HAI or generally from 144 HAI (Fig. 2 f).



**Fig. 2** Scanning electron micrograph of germination and penetration of *Pseudocercospora musae* conidia in banana leaves. Conidia germinating at 12 hours after inoculation (HAI) (a). Growth of two germ tubes at 96 HAI (b). Germ tube growing toward open stomata at 96 hours after inoculation (c). Germinal tube away from stomata that had not been penetrated by 96 HAI (d). Lateral development of germinal tube to the guard cells of stomata at 96 HAI (e). Penetration through the stomata at 144 HAI (f). co, conidia; st, stomata; gt, germ tube.

### **Colonization and sporulation of *Pseudocercospora musae***

At 36 DAI *P. musae* colonized the spongy parenchyma intracellularly (Fig. 3 a and b) and at 50 DAI, the inter and intracellular spaces of the parenchyma, below the sub-stomatal chamber of the adaxial surface, where the conidiophores were grown (Fig. 3 c and d). Sporulation was observed at 50 DAI on the adaxial leaf surface, on the opposite side from where inoculation took place (abaxial). The conidiophores emerged from the stomata in the sporodochial form (Fig. 3 e) and conidial masses were produced (Fig. 3 f).



**Fig. 3** Scanning electron micrograph of colonization and sporulation of *Pseudocercospora musae* in banana leaves. Hyphae colonizing the spongy parenchyma at 36 days after inoculation (DAI) (**a and b**). Hyphae colonizing the intra and intercellular spaces of the palisade parenchyma at 50 DAI (**c and d**). Conidiophores emerging in fascicles through stomata on the adaxial leaf surface at 50 DAI (**d and e**). Conidiophores emerging with high intensity on the adaxial leaf surface at 50 DAI (**f**). hp, hyphae; pp, palisade parenchyma; sp, spongy parenchyma; co, conidium; st, stomata; sc, substomatal chamber; cp, conidiophores.



## Discussion

Germination of *P. musae* conidia occurred in most events between 24 and 36 HAI. Similar results were observed by Goos and Tschirch (1963) when verifying germination between 24 and 48 HAI in inoculated plants that were individually covered with plastic bags. The longer period found by these authors may be related to the environmental conditions where the work was conducted. In this study, the temperature and the relative humidity of the greenhouse ranged from 18 to 28.7 °C and 56.9 to 96.9%, respectively. Nevertheless, in Goos and Tschirch (1963), the experiment was conducted at temperatures ranging from 21 to 35 °C and relative humidity of 20 to 90%. *Paracercospora fijiensis*, the causal agent of Black Sigatoka of banana, also showed this behavior when starting the growth of colonies from conidia only after 120 hours of incubation in culture medium (Hanada et al. 2002).

Two germinal tubes were produced in most of the conidia. However, some issued more than two germ tubes. The formation of multiple germinal tubes per conidia was also observed for *C. coffeicola* on coffee (Souza et al. 2011), *C. moricola* on mulberry (Gupta et al. 1995) and *C. henningsii* on cassava (Babu et al. 2007). Jacome et al. (1991) correlated the increase of germinal tubes per conidium with the higher probability of the pathogen finding one or more stomata to penetrate. This feature allows one to explain the epidemiology of the disease in the field, the efficiency of infection and the number of lesions per leaf, leading to losses of more than 50% in a favorable environment (Aman and Rai 2015; Burt et al. 1997; Cordeiro and Matos 2005; Rocha et al. 2012).

The penetration occurred through stomata either between 96 and 120 HAI or generally from 144 HAI, appressorium formation or other infection structures were not observed. In previous studies with *P. musae* penetration was also observed through the stomata between 96 and 144 hours after inoculation

(Goos and Tschirch 1963; Passos et al. 2013). For many cercosporoid fungi there have been reports of penetration in stomata, including *P. mori* in mulberry (Babu et al. 2002), *P. macadamiae* in macadamia (Miles et al. 2009) and *C. coffeicola* in coffee (Souza et al. 2011). The direction of the germinating tubes for the stomata was also shown for *Cercospora*, such as *C. zea-maydis* (Beckman and Payne 1982), *C. caricis* (Borges Neto et al. 1998) and *C. coffeicola* (Souza et al. 2011). These results may be attributed to chemical signals as described for *C. zea-maydis* (Payne and Beckman 1982). However, in this work, some germinal tubes moved away and passed over the stomata without penetrating them, which could be an indication of the absence of chemotropism. Similar results were found for *C. coffeicola* (Souza et al. 2011) and *Ramularia areola* (Curvelo et al. 2010). Therefore, it emphasizes the need for further studies to clarify possible stimulus of substances released from stomata, as well as physiological changes in response to those during the pre-penetration of *P. musae*. However, the penetration in the stomata and the lack of appressoria or direct penetration confirms that the stoma is the preferential entry of this pathogen.

After penetration, *P. musae* colonized the spongy parenchyma intracellularly at 36 DAI, culminating with the first symptoms in the leaf tissue. Later, at 50 DAI, there was inter- and intracellular colonization of the palisade parenchyma resulting in necrosis of leaf tissue. In coffee leaves, *C. coffeicola* also colonized the spongy parenchyma from inter and intracellularly within a shorter time, at 35 DAI (Souza et al. 2011). However, Miles et al. (2009) found only intercellular colonization of *P. macadamiae* in palisade and spongy parenchyma of macadamia that were naturally infected in the field. The type of *P. musae* colonization found in this work can be explained by leaf morphology and plant anatomy. According to Costa et al. (2009), in banana plants the palisade parenchyma faces the adaxial epidermis while the spongy parenchyma

is directed toward the abaxial epidermis. Thus, as the inoculation was done on the abaxial surface of the leaves first, there was first the colonization of the spongy parenchyma and afterwards of the palisade. Regarding inter- and intracellular spaces, *P. musae* probably colonized the apoplast, absorbing nutrients and other solutes from the xylem (Marschner 2012), causing no severe damage. However, over time the fungus invaded the cell cytoplasm, rupturing the membrane and showing the characteristics of a necrotrophic pathogen, removing nutrients from organelles and resulting in cell and tissue death.

The sporulation of *P. musae* occurred only on the adaxial surface of the leaves at 50 DAI, but Surridge et al. (2003) and Stover (1970) observed mass production of conidia of *P. musae* on both sides of the leaf, with greater intensity on the adaxial surface. This difference may be due to the fact that the injection site was on the surface opposite to the sporulation, and the fungus needs to colonize both parenchymas for nutrients that are required for both inter- and intracellular sporulation. In this work, the inoculation was performed only on the abaxial surface. However, Surridge et al. (2003) and Stover (1970) collected samples under natural conditions, in which penetration can occur on both sides of the leaves. Since the banana plant is classified as amphihypostomatic, the stomata are present on both sides of the epidermis, but more numerous on the abaxial (Sandoval et al. 1994; Costa et al. 2009). Therefore, it became evident that sporulation occurred when the rear surface was penetrated.

The stomata were the only way for *P. musae* to sporulate at 50 DAI. Similarly, in naturally infected samples, Surridge et al. (2003) observed sporulation through the stomata and mass of conidia of *P. musae* in sporodochia. Also in naturally infected samples the stomata are the only route for the sporulation of *P. mori* (Babu et al. 2002) and *P. kolansis* (Singh and Bhalla 2000). However, besides the stomata, other pathways for cercosporoid fungi sporulation were observed, such as on the subepidermis for *P. macadamiae*

(Miles et al. 2009), around stomata for *C. coffeicola* at 35 DAI (Souza et al. 2011), on the epidermal buds and leaf ribs for *C. henningsii* at 14 DAI (Babu et al. 2009) and on the disrupted epidermis around the base of trichomes for *C. moricola* (Gupta et al. 1995).

To conclude, *P. musae* penetrated the stomata at 144 HAI, colonized (intracellular) spongy parenchyma at 36 DAI and the palisade parenchyma inter- and intracellularly at 50 DAI. Finally, at 50 DAI, sporulation also started through the stomata located on the adaxial surface opposite to the inoculation side. Considering the importance of Yellow Sigatoka in the banana crop and the limited nature of studies on the *P. musae* infection process, the results of this study allow us to better understand the life cycle of the fungus and may be useful in developing disease management strategies.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for a PhD scholarship to the first author and a productivity grant to the second and last authors; the Higher Education Personnel Coordination (CAPES); the Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG); and the Federal University of Lavras (UFLA) for financing the research, and the Laboratory of Electron Microscopy and Ultra structural Analysis of UFLA for their technical support.

### **References**

- Aman M, Rai VR (2015) Potent toxigenic effect of *Mycosphaerella musicola* on locally growing banana varieties. *Phytoparasitica* 43:295–301.
- Araujo AG, Val ADB, Soares JDR, Rodrigues FA, Pasqual M, Rocha HS, ... Silva SDO (2014) Host–pathogen interactions of *Musa* spp. and *Mycosphaerella musicola* with epidemiological variables and leaf anatomy within the pathosystem of Yellow Sigatoka disease. *Australian Journal of Crop Science* 8:1200–1209.

Babu AM, Kumar V, Govindaiah (2002) Surface ultrastructural studies on the infection process of *Pseudocercospora mori* causing grey leaf spot disease in mulberry. *Mycological Research* 106:938–945.

Babu AM, Philip T, Kariappa BK, Kamble CK (2009) Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora henningsii* on cassava leaves. *Journal of phytopathology* 157:57–62.

Babu AM, Philip T, Kumar V (2007) Development of the leaf spot fungus, *Cercospora ricinella*, on castor leaf – an SEM account. *Journal of phytopathology* 155:426–430.

Beckman PM, Payne GA (1982) External growth, penetration, and development of *Cercospora zea-maydis* in corn leaves. *Phytopathology* 72:810–815.

Borges Neto CR, Silveira EB, Mello SCM, Fontes EMG (1998) Scanning electron microscopy of the infection process of *Cercospora caricis* on purple nutsedge. *Fitopatologia Brasileira* 23:169–172.

Burt JA, Rutter J, Gonzalez H (1997) Short distance wind dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain. *Plant Pathology* 40: 451–458.

Castelan FP, Abadie C, Hubert O, Chilin-Charles Y, De Bellaire LL, Chillet M (2013) Relation between the severity of Sigatoka disease and banana quality characterized by pomological traits and fruit green life. *Crop Protection* 50:61–65.

Cordeiro ZJM, Matos AP (2005) Expressão da resistência de variedades de banana à Sigatoka-amarela. *Fitopatologia Brasileira* 30:534–535.

Cordeiro ZJM, Rocha HS, Araújo AG (2011) Metodologia para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, p 32.

Costa FHS, Castro EM, Pasqual M, Pereira JES, Oliveira C (2009) Alterações anatômicas de bananeiras micropropagadas em resposta a aclimatização ex vitro. *Ciência Rural* 39:386–392.

Curvelo CRS, Rodrigues FA, Berger P.G, Rezende DC (2010) Microscopia eletrônica de varredura do processo infeccioso de *Ramularia areola* em folhas de algodoeiro. *Tropical Plant Pathology* 35:108–113.

Faostat (2013) Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Accessed 03 feb 2016.

Freitas AS, Pozza EA, Alves MC, Coelho G, Rocha HS, Pozza AA (2015). Spatial distribution of Yellow Sigatoka Leaf Spot correlated with soil fertility and plant nutrition. *Precision Agriculture* 17:93–107.

Gomes LIS, Douhan GW, Bibiano LB, Maffia LA, Mizubuti ES (2013) *Mycosphaerella musicola* identified as the only pathogen of the Sigatoka disease complex present in Minas Gerais State, Brazil. *Plant Disease* 97:1537–1543.

Goos RD, Tschirch M (1963) Greenhouse studies on the cercospora leaf spot of banana. Transactions of the British Mycological Society 46:321–330.

Gupta VP, Tewari SK, Govindaiah BAK, Datta RK (1995) Observations on the surface ultrastructure of conidial stage of *Cercospora moricola* and its infection process in mulberry. Sericologia 35:123–128.

Hanada RE, Gasparotto L, Pereira JCR (2002) Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. Fitopatologia Brasileira 27:170–173.

Jacome LH, Schuh W, Stevenson RE (1991) Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Phytopathology 81:1480–1485.

Kumar V, Gupta VP, Babu AM, Mishra RK, Thiagarajan V, Datta RK (2001) Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing black spot disease. Journal of phytopathology 149:629–633.

Marschner H (2012) Mineral nutrition of higher plants, 3rd edn. Academic, San Diego, 643p.

Miles AK, Akinsanmi OA, Sutherland PW, Aitken EAB, Drenth A (2009) Infection, colonisation and sporulation by *Pseudocercospora macadamiae* on macadamia fruit. Australasian Plant Pathology 38:36–43.

Noorulla H, Naik MK, Gururaj S, Amaresh YS (2013) Prevalence of sigatoka disease of banana in major growing areas of karnataka, india. Asian Journal of Science and Technology 4:042–045.

Passos MA, Cruz VO, Emediato FL, Teixeira CC, Azevedo VCR, Brasileiro, AC,... Miller RN (2013) Analysis of the leaf transcriptome of *Musa acuminata* during interaction with *Mycosphaerella musicola*: gene assembly, annotation and marker development. BMC genomics 14:78.

Paula PVAA, Pozza EA, Santos, LA, Teixeira, OHS, Paula, JCA (2015) Formas de penetração do gênero *Cercospora*. Nucleus 12:271–280.

Rocha HS, Pozza EA, Uchôa CDN, Cordeiro ZJM, Souza PE, Sussel ÂAB, Rezende CA (2012) Temporal progress of Yellow Sigatoka and aerobiology of *Mycosphaerella musicola* Spores. Journal of Phytopathology 160:277–285.

Sandoval JA, Müller LE, Weberling F (1994) Foliar morphology and anatomy of *Musa* cv. Grande Naine (AAA) plants grown in vitro and during hardening as compared to field-grown plants. Fruits 49:37–46.

Singh SK, Bhalla K (2000) New *Pseudocercospora* species causing foliar diseases in plain forests of Vindhya region in India. Indian Phytopathology 53:399–403.

Souza AGC, Rodrigues FÁ, Maffia LA, Mizubuti ESG (2011) Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf. Journal of Phytopathology 159:6–11.

Stover RH (1970) Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella musicola*: role of conidia in epidemiology. *Phytopathology* 60:856–860.

SurrIDGE AKJ, Viljoen A, Crous RW, Wehner FC (2003) Identification of the pathogen associated with Sigatoka disease of banana in South Africa. *Australasian Plant Pathology* 32:27–31.

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

## ARTIGO 2

### **Sílicio reduz a severidade da Sigatoka Amarela em bananeira cultivada em solução nutritiva**

Artigos submetidos ou em processo de submissão em periódicos.

Aurivan S. Freitas<sup>1</sup> • Edson A. Pozza<sup>1</sup> • Maria G. O. Soares<sup>1</sup> • Humberson R. Silva<sup>1</sup> • Adélia A. A. Pozza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Plant Pathology Department, Federal University of Lavras, PO Box 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

<sup>2</sup>Department of Soil Science, Federal University of Lavras, PO Box 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

Autor para correspondência: Aurivan S. Freitas, e-mail:  
aurivan.soares@hotmail.com

Preparado em concordância com as normas do periódico  
“**Australasian Plant Pathology**”

(Versão preliminar – em processo de submissão)



## Resumo

O silício (Si) está entre os nutrientes minerais com potencial para reduzir a intensidade de doenças de plantas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do Si, na severidade da Sigatoka Amarela (*Pseudocercospora musae*), em bananeira cultivada em solução nutritiva. O experimento foi implantado em delineamento experimental de blocos casualizados, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram de cinco concentrações de ácido silícico ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ): 0; 0,5; 1,0; 1,8 e 3,6  $\text{mmol L}^{-1}$ . A inoculação foi realizada em uma área de 36  $\text{cm}^2$  delimitada na região mediana da superfície abaxial das folhas 1, 2, 3 e 4. A severidade da doença foi avaliada, em intervalos de seis dias, totalizando seis avaliações. Após o término das avaliações, determinaram-se os teores foliares de Si e de macro e micronutrientes. Os dados da severidade foram integralizados em área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD). A AACPSD foi 49,27% menor na concentração de 3,05  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ , quando comparada às plantas cultivadas sem a adição de Si. Por outro lado, na concentração de 3,6  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ , o teor foliar de Si foi 23,53% maior em relação às plantas cultivadas sem o fornecimento de Si. Portanto, o Si é uma alternativa complementar no manejo da Sigatoka Amarela em bananeira.

**Palavras chave:** *Musa* spp.. *Pseudocercospora musae*. Nutrição mineral. Solução nutritiva

## Introdução

A banana (*Musa* spp.) está entre os mais valiosos produtos agrícolas do mundo (Ploetz et al. 2015). Além de ser um alimento complementar da dieta da população, com alto teor energético e nutricional, seu cultivo contribui para a sustentabilidade financeira e social da população de áreas produtoras (Ribeiro et al. 2013; Su et al. 2015). No entanto, sua produção está sujeita à ocorrência de várias doenças, incluindo a Sigatoka Amarela, cujo agente etiológico é o fungo *Pseudocercospora musae* Zimm (*Mycosphaerella musicola* Leach). Esse fungo é um patógeno necrotrófico capaz de reduzir a área fotossintética da planta e, conseqüentemente, a qualidade da fruta, causando perdas acima de 50% dependendo do microclima (Aman e Rai 2015; Burt et al. 1997; Castelan et al. 2013; Cordeiro e Matos 2005; Rocha et al. 2012). A aplicação periódica de fungicidas tem sido a estratégia utilizada no controle da Sigatoka Amarela (Ferreira et al. 2003; Patel 2009). Todavia, o uso sistemático de produtos químicos pode aumentar o custo de produção, selecionar isolados resistentes do patógeno e reduzir o equilíbrio ambiental do agroecossistema (Cordeiro e Matos 2000; Ferreira et al. 2003). Como medida complementar, a utilização de plantas, adequadamente nutridas, vem sendo estudada, com o objetivo de reduzir as perdas causadas por essa doença (Freitas et al. 2015a; Freitas et al. 2015b). O fornecimento de nutrientes em equilíbrio contribui para constituir barreiras de resistência (Pozza e Pozza 2012).

Dentre os elementos minerais utilizados, no manejo de doenças, destaca-se o silício (Si), muitas vezes, classificado como indutor de resistência (Resende et al. 2013), por reduzir a severidade de importantes doenças (Datnoff et al. 2007; Pozza et al. 2015). O Si é considerado essencial apenas para algumas espécies de plantas, entretanto, para muitas outras, a exemplo da bananeira, esse nutriente é classificado como benéfico (Marschner 2012). Segundo Henriot et al.

(2006), a bananeira, além de absorver Si da solução do solo com relativa capacidade, comporta-se como boa acumuladora. Muitas plantas com esse comportamento têm apresentado resultados promissores na redução da intensidade de doenças (Pereira et al. 2009). Duas hipóteses foram propostas, para explicar essa potencialidade do Si, a formação de uma barreira física de maneira a impedir a penetração dos patógenos e a ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro aos agentes patogênicos (Pozza et al. 2004; Pereira et al. 2009; Marschner 2012; Pozza et al. 2015).

Alguns estudos comprovaram resultados promissores do Si na redução de doenças da bananeira. Kablan et al. (2012) constataram, com fornecimento de 2 mmol L<sup>-1</sup> de ácido silício (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>), redução na severidade da Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) de 20,5 para 18,8%, em plantas cultivadas em solução nutritiva e de 68,9 para 39,5%, em plantas cultivadas no solo. Segundo esses autores, a elevada concentração de Si, nas folhas das plantas, contribuiu para reduzir os sintomas da doença. O Si foi, também, eficiente na redução de doenças em bananeira causadas por patógenos de solos. A aplicação de 2 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>, no solo, reduziu a porcentagem de raízes necrosadas por *Cylindrocladium spathiphylli* em até 50% (Vermeire et al. 2011). De forma semelhante, porém, com o fornecimento de 1,75 g de silicato de cálcio kg<sup>-1</sup> de solo, o Mal do Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) foi 15,98% maior nas plantas crescidas sem o fornecimento desse nutriente (Fortunato et al. 2012).

Os benefícios do Si, na redução de doenças, estendem-se para outras plantas, incluindo as dicotiledôneas (Botelho et al. 2011; Lima et al. 2010b; Moraes et al. 2006; Pozza et al. 2004). No entanto, para a Sigatoka Amarela da bananeira, poucas informações foram relatadas. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a severidade da Sigatoka Amarela em bananeira cultivada em solução nutritiva.

## Material e métodos

### Material vegetal e condições de crescimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com umidade relativa e temperatura média de 80% e 25°C, respectivamente. Mudanças de bananeira micropropagadas (*Musa acuminata* 'Grande Naine AAA Cavendish'), com 49 dias de idade, obtidas a partir de cultura de tecidos, foram adaptadas em bandejas, contendo 16 L de solução nutritiva (Hoagland e Arnon 1950), a 50% da força iônica, com aeração contínua durante 15 dias. Depois de adaptadas, as plantas foram transferidas para vasos de 6 L, com solução nutritiva (Hoagland e Arnon 1950), a 100% da força iônica, sob aeração contínua e seus devidos tratamentos. Os macronutrientes foram fornecidos, aplicando-se 1 mL L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mL L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>, 5 mL L<sup>-1</sup> de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O e 2 mL L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; e, para micronutrientes, adicionou-se, em todos os tratamentos, 1 mL L<sup>-1</sup> da solução estoque, composta por 2,86 g L<sup>-1</sup> de ácido bórico, 1,81 g L<sup>-1</sup> de cloreto de manganês, 0,10 g L<sup>-1</sup> de cloreto de zinco, 0,04 g L<sup>-1</sup> de cloreto de cobre e 0,02 g L<sup>-1</sup> de ácido molíbdico. O ferro foi fornecido adicionando-se 1 mL da solução estoque desse nutriente (33,3 g Na<sub>2</sub>-EDTA, 100,4 mL NaOH 1N, 24,9 g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 4 mL HCl 1N) L<sup>-1</sup> na solução nutritiva (Lima et al. 2010a).

O experimento foi conduzido, em delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. A unidade experimental foi composta por uma planta por vaso. Os tratamentos consistiram de cinco concentrações de ácido silícico (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>), 0; 0,5; 1,0; 1,8 e 3,6 mmol L<sup>-1</sup> adicionadas à solução nutritiva. Todo o experimento foi repetido, no tempo, uma vez.

Monitorou-se o pH da solução nutritiva, semanalmente, mantendo-o entre 5,5 e 6,0 com a adição de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> ou NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Quando necessário, o volume dos vasos foi completado com água deionizada. A

depleção de íons da solução nutritiva foi verificada, semanalmente, com o aparelho Compaction Meter para  $K^+$  (Horiba-CARDY®). A troca da solução nutritiva foi realizada, nos diferentes tratamentos, quando a depleção atingiu 30% do valor inicial de  $K^+$  (Braccini et al. 1999).

### **Obtenção, preparo do inóculo e inoculação**

O isolado de *P. musae* foi obtido a partir de folhas de bananeira doentes (Cordeiro et al. 2011). Para obter conídios, utilizou-se a metodologia descrita por Freitas et al. (2015b) com modificações. Dez fragmentos de micélio (5 mm de diâmetro), retirados de colônias, após 26 dias de crescimento em placa de Petri, contendo meio de malte (20 g de extrato de malte, 20 g ágar e 1000 mL de água destilada), foram macerados com almofariz e pistilo. Em seguida, o macerado foi diluído em 15 mL de suco de tomate (200 mL de suco tomate, 1 g de  $CaCO_3$  e 900 mL de água destilada) e transferido para placa de Petri, de 9 cm de diâmetro, com suco de tomate sólido (200 mL de suco tomate, 20 g ágar, 1 g de  $CaCO_3$  e 900 mL de água destilada). Para facilitar a secagem, as placas foram mantidas abertas, dentro de BOD, a 25°C com fotoperíodo de 24h, com quatro lâmpadas fluorescentes de 20 Watts cada. Após o meio de cultura secar, adicionaram-se 10 mL de água destilada esterilizada, em cada placa de Petri e com bastão de vidro, previamente, esterilizado procedeu-se à liberação dos conídios a partir do micélio seco. A suspensão obtida foi filtrada em dupla camada de gaze e a concentração ajustada para  $4 \times 10^4$  conídios  $mL^{-1}$ , utilizando hemacitômetro, estabelecendo-se média de 4 leituras.

A inoculação foi realizada, três meses após a transferência das plantas, para as concentrações de Si. As folhas 1, 2, 3 e 4 foram inoculadas, na superfície abaxial, pulverizando-se 0,7 mL da suspensão de conídios, em uma área de 36  $cm^2$  delimitada, na região mediana. Após a inoculação, as plantas foram

cobertas, individualmente, com sacos plásticos transparentes, durante 60 h, permanecendo em ambiente controlado, na temperatura de 23°C e umidade relativa de 92%.

### **Avaliação da severidade da doença**

Após surgirem os primeiros sintomas, foi avaliada a severidade da doença na superfície abaxial de cada área inoculada. Foram realizadas seis avaliações, em intervalos de seis dias, baseando-se na escala diagramática descrita por Stover (1971) e modificada por Gauhl (1994). As notas variaram de 0 a 5, sendo 0-área sem sintomas, 1-área apresentando até 10 manchas, 2-área apresentando entre 1 e 5% de manchas, 3-área inoculada apresentando entre 6 e 15% de manchas, 4-área inoculada apresentando entre 16 e 33% de manchas e 5-área inoculada apresentando entre 34 e 50% de manchas.

A média da severidade da doença, nas quatro folhas, foi integrada em área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) com a equação proposta por Shaner e Finney (1977):

$$\text{AACPSD} = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{y_i + (y_i + 1)}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

em que:

$y_i$  = severidade da doença na  $i$ -ésima observação;

$t_i$  = tempo em dias, na  $i$ -ésima observação;

$n$  = número total de observações.

### **Determinação dos nutrientes nas folhas**

Os teores de nutrientes foram determinados ao final dos experimentos. As folhas 2 e 3, excetuando-se as nervuras centrais, foram lavadas em água destilada, acondicionadas, separadamente, em sacos de papel, secas em estufa, a 60°C, até atingirem peso constante, moídas e analisadas (Martinez et al. 1999). Os teores de Si foram determinados, nas folhas 3, de acordo com a metodologia proposta por Korndörfer et al. (2004). Os teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (B), cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn) foram determinados nas folhas 2, conforme propôs Malavolta et al. (1997).

### **Análise de dados**

Para averiguar os pressupostos da análise de variância, o teste de Shapiro-Wilk (Shapiro e Wilk 1965) foi aplicado aos dados de cada experimento repetido no tempo, para avaliar sua distribuição normal. Foi verificada a distribuição normal e não foi necessário transformar as variáveis. Sendo assim, os dados dos experimentos foram submetidos à análise conjunta, ao longo do tempo, para avaliar se houve diferenças entre os dois experimentos. As variáveis AACPSD, os teores de Si e demais nutrientes foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As variáveis significativas, no teste F ( $p \leq 0,05$ ), foram submetidas ao ajuste de modelos de regressão linear. As análises foram realizadas, utilizando-se o software R e os gráficos foram elaborados com o auxílio do software Sigma Plot 10 (SigmaPlot® 2008).

## **Resultados**

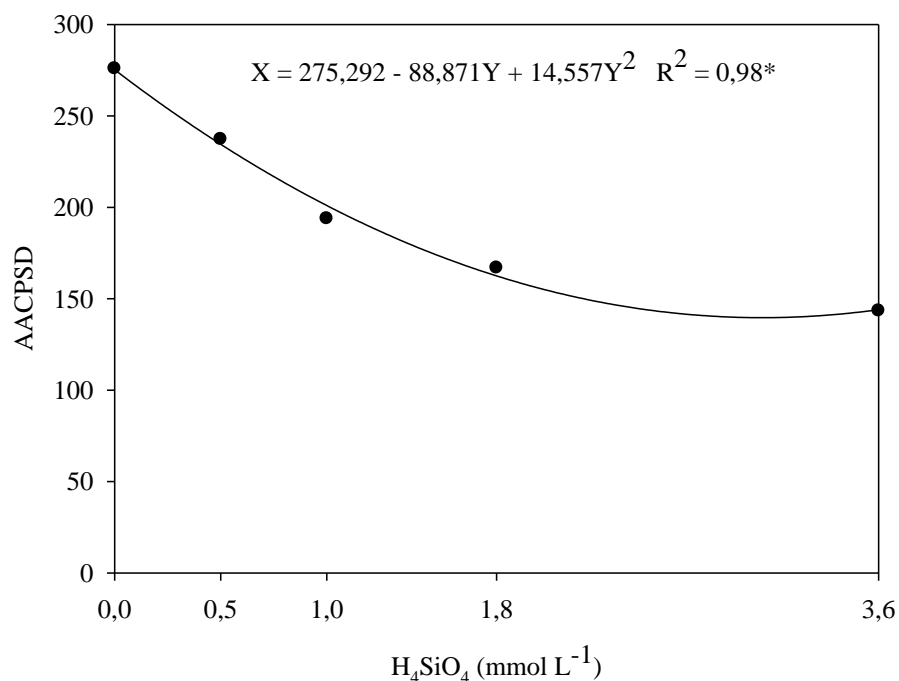
### **Análise conjunta dos dados**

Na análise conjunta das variáveis, ao longo do tempo, não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os experimentos. Sendo assim, os resultados apresentados referem-se à média dos dois experimentos repetidos no tempo.

### **Severidade da Sigatoka Amarela em função das concentrações de Si em solução nutritiva**

Os primeiros sintomas de Sigatoka Amarela, nas áreas inoculadas com *P. musae*, foram observados 28 dias após a inoculação. As diferentes concentrações de  $H_4SiO_4$ , acrescidas na solução nutritiva, influenciaram, significativamente, ( $p \leq 0,05$ ) a área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD). O maior valor da AACPSD foi verificado na concentração de  $0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $H_4SiO_4$ , cuja média foi 275,29. Com auxílio da derivada de primeira ordem do modelo de regressão ajustado, verificou-se, na concentração de  $3,05 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $H_4SiO_4$ , menor valor da AACPSD, cuja média foi 139,65, 49,27% inferior em relação às plantas cultivadas sem a adição de Si (Fig. 1).



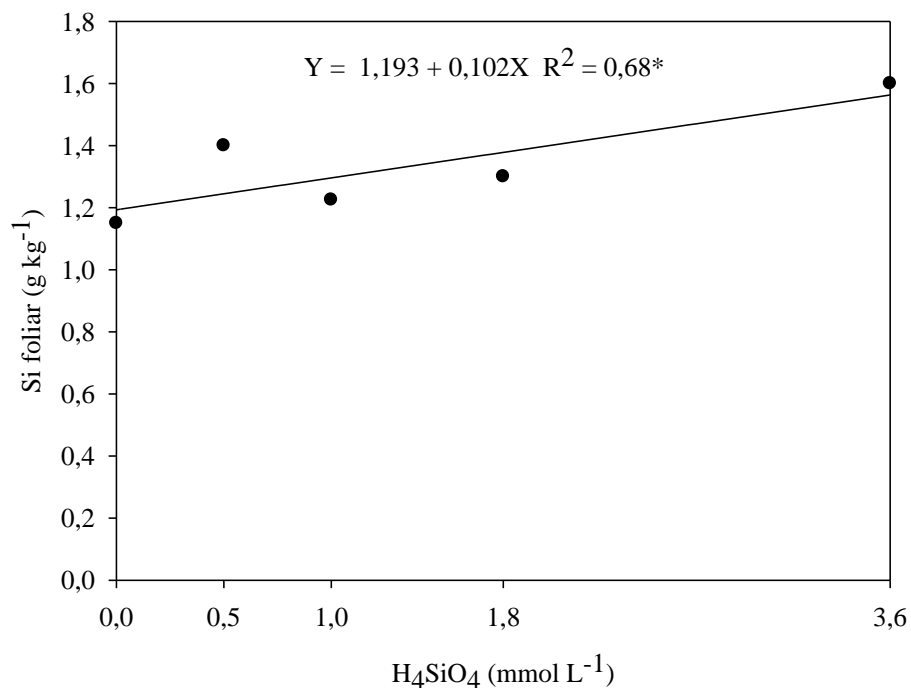


**Fig.1** Área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD), em função das concentrações de ácido silícico ( $H_4SiO_4$ ), em solução nutritiva. \*Significativo ( $p \leq 0,05$ ).

### Aspectos nutricionais de bananeira em função das concentrações de Si em solução nutritiva

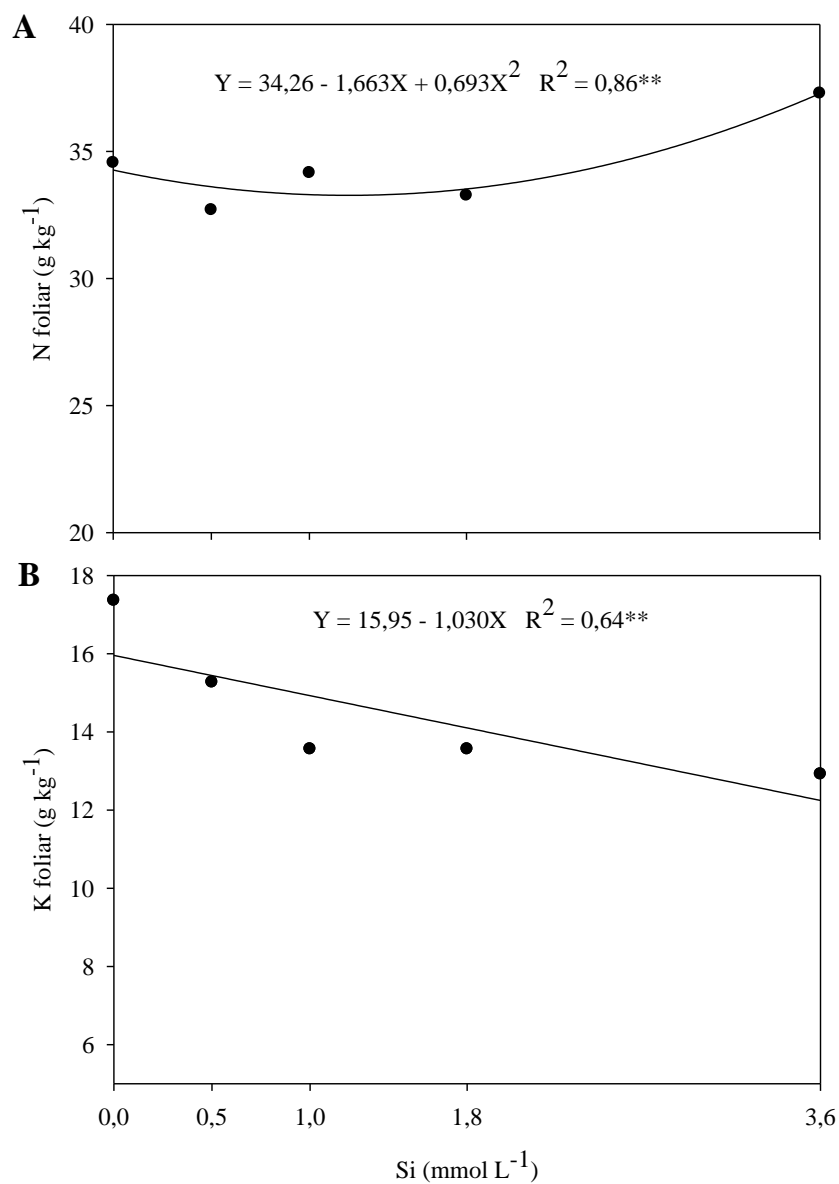
A nutrição das plantas de bananeira sofreu influência do suprimento de Si na solução nutritiva.

O aumento das concentrações de  $H_4SiO_4$ , na solução nutritiva, influenciou, significativamente, ( $p \leq 0,05$ ), os teores foliares de Si, N e K. Com o incremento das concentrações de  $H_4SiO_4$  de 0 para 3,6 mmol  $L^{-1}$  houve aumento nos teores foliares de Si de 1,19 para 1,56 g  $kg^{-1}$ , respectivamente, ou seja, ocorreu aumento de 23,53% da menor para a maior concentração de  $H_4SiO_4$  (Fig. 2).



**Fig. 2** Teores de silício (Si) em folhas da bananeira, em função das concentrações de ácido silícico (H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>), em solução nutritiva. \*Significativo ( $p \leq 0,05$ ).

Os teores de N nas folhas foram reduzidos de 34,26 para 33,26 g kg<sup>-1</sup> entre as concentrações 0 e 1,2 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> na solução nutritiva e aumentaram a partir dessa concentração, atingindo o teor máximo de 37,25 g kg<sup>-1</sup> na concentração de 3,6 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> (Fig. 3A). Com o incremento das concentrações de H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> de 0 para 3,6 mmol L<sup>-1</sup>, houve redução nos teores foliares de K de 15,95 para 12,24 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 3B).



**Fig. 3** Teores de N (A) e K (B) em folhas da bananeira, em função das concentrações de ácido silícico ( $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ), em solução nutritiva. **\*\***Significativo ( $p \leq 0,01$ ).

A média dos teores foliares de nutrientes de todos os tratamentos apresentaram valores próximos à faixa considerada adequada, para a bananeira,

com exceção de K, Mg e Zn com níveis abaixo, e de S e B acima do recomendado (Tabela 1).

**Tabela 1** Faixas de teores de macro e micronutrientes consideradas adequadas \*(Borges e Souza 2004) e valores de referência \*\*(Martinez et al. 1999) para as cultivares Nanica, Nanicão e Grande Naine de bananeira. \*\*\*Teores médios de nutrientes obtidos no experimento

N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Zn	Fe	Mn
-----g·kg <sup>-1</sup> -----					-----mg·kg <sup>-1</sup> -----					
*27-36	1,6-2,7	32-54	6,6-12	2,7-6,0	1,6-3,0	10-25	6-30	20-50	80-360	200-1800
**26	2,2	28	6	3	2	15	8	20	100	88
***32,79	1,58	19,98	8,72	2,23	3,62	29,13	9,12	17,36	122,52	273,12

## Discussão

Nesse estudo, o fornecimento de  $3,05 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ , em solução nutritiva, reduziu em 49,27% a AACPSD da Sigatoka Amarela, em bananeira, quando comparada às plantas cultivadas sem o fornecimento de Si. Resultados semelhantes foram encontrados por Kablan et al. (2012), ao constatarem redução na severidade da Sigatoka Negra (*M. fijiensis*) de 20,5 para 18,8%, em plantas cultivadas em solução nutritiva com 0 e  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ , respectivamente. O Si, também, apresentou resultados promissores, quando aplicado no solo. Kablan et al. (2012), no mesmo trabalho relatado anteriormente, comprovaram redução na severidade da Sigatoka Negra de 68,9 para 39,5%, em plantas cultivadas no solo sem aplicação e com o suprimento de  $1,7 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ , respectivamente. Em outro estudo, a aplicação de  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ , no solo, reduziu, aproximadamente, 50% a porcentagem de raízes necrosadas por *Cylindrocladium spathiphylli*, em bananeira, quando comparada com plantas cultivadas sem fornecimento desse nutriente (Vermeire et al. 2011). Fortunato et al. (2012), estudando o Si, também, no solo, porém, na forma de silicato de cálcio (10,5% Si, 25% Ca e 6% Mg), verificaram aumento de 15,98%, na área abaixo da curva de progresso do escurecimento do rizoma (AACPER), em plantas cultivadas sem aplicação de Si, quando comparadas com plantas nutridas com  $1,75 \text{ g kg}^{-1}$  de solo.

Diante desses resultados, torna-se evidente que o Si tem potencial para reduzir as doenças da bananeira. De acordo com Pereira et al. (2009), isso é possível, quando o Si é absorvido pelas raízes da planta e atinge teores elevados nas folhas. No presente trabalho, os teores foliares de Si aumentaram de 1,19 para  $1,56 \text{ g kg}^{-1}$  com o incremento das concentrações de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  em solução nutritiva. Esses resultados estão de acordo com Henriët et al. (2006), ao estabelecerem a bananeira como boa acumuladora de Si. Além disso, nos

trabalhos citados anteriormente, houve redução na intensidade das doenças da bananeira com o acúmulo de Si nos tecidos das plantas. De acordo com Kablan et al. (2012), os teores médios de Si aumentaram de 0,42 para 22,07 g kg<sup>-1</sup>, em plantas cultivadas em solução nutritiva e de 1,2 para 22,6 g kg<sup>-1</sup> em plantas cultivadas no solo. Da mesma forma, porém, em estudo realizado apenas no solo, Vermeire et al. (2011) constataram aumento de 2,09 para 16,71 g kg<sup>-1</sup> nos teores foliares de Si em bananeira. Além das folhas, com fornecimento de silicato de cálcio no solo, Fortunato et al. (2012) constataram aumento nos teores de Si nas raízes e no rizoma da bananeira de 30,26 e 58,82%, respectivamente.

Apesar desses resultados, o mecanismo de ação do Si na resistência de plantas a patógenos não está totalmente compreendido (Kablan et al. 2012; Pereira et al. 2009; Pozza et al. 2015). Alguns estudos atribuem ao Si a formação de uma barreira física que impede penetração dos patógenos (Pozza et al. 2015). Em brotos de bananeira, crescidos em meio de cultura com 1 g L<sup>-1</sup> de silicato de sódio (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>), os conteúdos foliares de celulose e hemicelulose foram 1,9 e 1,83%, respectivamente. Por outro lado, nessa mesma sequência, os conteúdos foliares, nos brotos crescidos sem aplicação de Si, foram 1,44 e 1,05% (Asmar et al. 2013). Com base nesses resultados, pressupõe que um dos mecanismos de ação do Si na resistência de bananeira é a modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque dos patógenos. Segundo Sangster et al. (2001), o Si, também, forma uma camada dupla abaixo da cutícula após polimerização do ácido monossilícico. De acordo com Kim et al. (2002), essa dupla camada atrasou a penetração de *Pyricularia grisea* em folhas de arroz. Pozza et al. (2004) observaram a presença de cutícula mais espessa, na superfície inferior de cafeeiro nutrido com Si, principalmente, em razão da camada de cera epicuticular mais desenvolvida. Para esses autores, essa camada contribuiu na redução do número de folhas lesionadas por *C. coffeicola*.

Outro mecanismo de ação do Si, na resistência de plantas a patógenos, é a possível ativação dos mecanismos de defesa naturais da planta (Pozza et al. 2015). Em brotos de bananeira, a aplicação de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de silicato de sódio elevou o conteúdo foliar de tanino para 838,95%, por outro lado, sem aplicação desse nutriente, o valor foi 532,61% (Asmar et al. 2013). Segundo Khan et al. (2009), o tanino é um metabólito secundário com propriedades antimicrobianas. Assim, o Si, também, atua na indução das reações de defesa da bananeira aos patógenos. Alguns estudos detectaram ação conjunta do Si na formação de barreira física e na ativação de enzimas relacionadas à defesa da planta (Pozza et al. 2015). Resende et al. (2013) constataram, em plantas de sorgo cultivadas com  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de Si e inoculadas com *Colletotrichum sublineolum*, alta deposição de Si, nos locais de infecção, menor tamanho de lesão e menor quantidade de acérvulos. Além disso, com o fornecimento de Si foram detectados, as 48 e 96 h após a inoculação, aumentos significativos de 140 e 75%, na atividade de peroxidases e polifenoloxidasas, respectivamente.

Além das condições citadas anteriormente, o Si pode influenciar a nutrição das plantas (Pozza et al. 2015). No presente trabalho, apenas os teores foliares de N e K foram influenciados com o suprimento de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  em solução nutritiva. Os teores de N foram reduzidos até a concentração de  $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  e aumentaram a partir dessa concentração. Resultados semelhantes foram relatados por Botelho et al. (2005), ao constatarem em mudas de café, decréscimo nos teores de N até a dose de  $0,85 \text{ g de SiO}_2 \text{ kg}^{-1}$  de substrato e aumento após essa dose. Embora tenha ocorrido interferência nos teores foliares de N, o valor médio permaneceu próximo ao considerado adequado para a bananeira (Martinez et al. 1999; Borges e Souza 2004). Assim, possivelmente, esse nutriente não influenciou a severidade da Sigatoka Amarela. Freitas et al. (2015b) constataram, com ausência de N em solução nutritiva, aumento na AACPSD de bananeira à *P. musae*. Os autores atribuíram os resultados,



principalmente, ao desequilíbrio de nutrientes. Segundo Huber e Thompson (2007), concentrações adequadas de N contribuem, para a síntese de lignina, fitoalexinas e taninos, os quais são importantes na resistência de plantas às doenças.

Em relação aos teores de K, houve redução de 15,95 para 12,24 g kg<sup>-1</sup> com o incremento das concentrações de H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>. Botelho et al. (2011) observaram, por meio de microanálise de raio X, menores picos de K em mudas de cafeeiro nutridas com 1 g kg<sup>-1</sup> de solo silicato de cálcio. Apesar da leve redução nos teores de K, em geral, os demais nutrientes encontravam-se com níveis próximos aos considerados adequados para a bananeira (Martinez et al. 1999; Borges e Souza 2004). Esses resultados evidenciam que H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub> é uma fonte pura de Si e possibilita estudar, isoladamente, seu efeito no desenvolvimento da Sigatoka Amarela. De acordo com Botelho et al. (2011), a utilização de fontes não puras, como silicatos, pode influenciar os resultados, em função da presença de Ca e K na sua composição, nutrientes com influência no progresso de doenças (Marschner 2012).

Portanto, o fornecimento de H<sub>4</sub>SiO<sub>4</sub>, em solução nutritiva, influenciou a redução da AACPSD da Sigatoka Amarela e o aumento nos teores foliares de Si em bananeira. Resultados semelhantes foram encontrados, anteriormente, para outras doenças da bananeira (Vermeire et al. 2011; Fortunato et al. 2012; Kablan et al. 2012). Assim, acredita-se que o Si tem potencial para reduzir a severidade da Sigatoka Amarela e poderá ser uma alternativa complementar no manejo dessa doença.

### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por nos apoiar financeiramente.

## Referências

- Aman M, Rai VR (2015) Potent toxigenic effect of *Mycosphaerella musicola* on locally growing banana varieties. *Phytoparasitica* 43:295–301. doi:10.1007/s12600-015-0456-3
- Asmar SA, Pasqual M, Araujo AG, Silva RAL, Rodrigues FA, Pio LAS (2013) Morphophysiological characteristics of acclimatized ‘Grande Naine’ banana plants in response to in vitro use of silicon. *Semina: Ciências Agrárias* 34:73–82. doi:10.5433/1679-0359.2013v34n1p73
- Borges AL, Souza LS (2004) O cultivo da bananeira. Cruz das Almas, Brazil
- Botelho DMS, Pozza EA, Alves E, Botelho CE, Pozza AAA, Júnior PR, Souza PE (2011) Effect of silicon on the intensity of brown eye spot and on the mineral nutrition of coffee seedlings. *Arq Inst Biol* 78:23–29
- Botelho DMS, Pozza EA, Pozza AA, Carvalho JD, Botelho CE, Souza PD (2005) Effect of silicon doses and sources on the intensity of the brown eye spot of coffee seedlings. *Fitopatol Bras* 30:582–588. doi:10.1590/S0100-41582005000600003
- Braccini MDCL, Lucca A, Martinez HEP (1999) Critérios para renovação ou manutenção de solução nutritiva em cultivo hidropônico. *Semina: Ciências Agrárias* 20:48–58. doi:10.5433/1679-0359.1999v20n1p48
- Burt JA, Rutter J, Gonzalez H (1997) Short distance wind dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain. *Plant Pathol* 40: 451–458
- Castelan FP, Abadie C, Hubert O, Chilin-Charles Y, De Bellaire LL, Chillet M (2013) Relation between the severity of Sigatoka disease and banana quality characterized by pomological traits and fruit green life. *Crop Protection* 50:61–65 doi:10.1016/j.cropro.2013.02.019
- Cordeiro ZJM, Matos AP (2000) Doenças fúngicas e bacterianas. In: Cordeiro ZJM. (Ed.). *Banana: fitossanidade*. Cruz das Almas: EMBRAPA Mandioca e Fruticultura; Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 36–65
- Cordeiro ZJM, Matos AP (2005) Expression of resistance of banana varieties to yellow Sigatoka. *Fitopatol Bras* 30:534–535. doi:10.1590/S0100-41582005000500013
- Cordeiro ZJM, Rocha HS, Araújo AG (2011) Metodologia para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, p 32
- Datnoff LE, Rodrigues FA, Seebolt KW (2007) Silicon and Plant Disease. Pages 233–246 in: *Mineral Nutrition and Plant disease*. Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN

Ferreira DMV, Cordeiro ZJM, Matos AD (2003) Forecasting for the control of banana 'yellow sigatoka' in the recôncavo baiano region, Brazil. *Rev Bras Frutic* 25:429–431. doi:10.1590/S0100-29452003000300017

Fortunato AA, Rodrigues FÁ, Baroni JCP, Soares GCB, Rodriguez MAD, Pereira OL (2012) Silicon suppresses *Fusarium* wilt development in banana plants. *J Phytopathol* 160:674–679. doi: 10.1111/jph.12005

Freitas AS, Pozza EA, Alves MC, Coelho G, Rocha HS, Pozza AAA (2015a). Spatial distribution of Yellow Sigatoka Leaf Spot correlated with soil fertility and plant nutrition. *Precision Agric* 17:93–107. doi 10.1007/s11119-015-9409-6

Freitas AS, Pozza EA, Pozza AAA, Oliveira MGF, Silva HR, Rocha HS, Galvão LR (2015b) Impact of nutritional deficiency on Yellow Sigatoka of banana. *Australas Plant Pathol* 44:583–590. doi:10.1007/s13313-015-0371-6

Gauhl F (1994) Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain and banana (*Musa* spp) in Costa Rica, Central América. Montpellier: INIBAP, 120 p

Henriet C, Draye X, Oppitz I, Swennen R, Delvaux B (2006) Effects, distribution and uptake of silicon in banana (*Musa* spp.) under controlled conditions. *Plant and soil* 287:359–374. doi:10.1007/s11104-006-9085-4

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, Berkeley, 32 p

Huber DM, Thompson IA (2007) Nitrogen and plant disease. In: Datnoff LE, Elmer WH, Huber DM (eds) Mineral nutrition and plant disease. The American Phytopathological Society, Saint Paul, pp31–44

Kablan L, Lagauche A, Delvaux B, Legrève A (2012) Silicon reduces black Sigatoka development in banana. *Plant Disease* 96:273–278. doi:10.1094/PDIS-04-11-0274

Khan R, Islam B, Akram M, Shakil S, Ahmad A, Ali, SM, Siddiqui M, Khan AU (2009) Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules* 14:586–597. doi:10.3390/molecules14020586

Kim SG, Kim KW, Park EW, Choi D (2002) Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology* 92:1095–1103. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.10.1095

Korndörfer GH, Pereira HS, Nola A (2004) Análise de silício: Solo, Planta e Fertilizante. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia MG. GPSi-ICIAG-UFU

Lima LMD, Pozza EA, Torres HN, Pozza AA, Salgado M, Pfenning LH (2010a) Relationship between nitrogen/potassium with *Phoma* spot and nutrition of coffee seedlings cultivated in nutrient solution. *Trop Plant Pathol* 35:223–228. doi:10.1590/S1982-56762010000400003

Lima LM, Pozza EA, Pozza AAA, Fonseca TAPS, Carvalho JG (2010b) Quantification of Asian rust and nutritional aspects of soybean due to the use of silicon supplied via nutrient solution. *Summa Phytopathologica* 36:51–56. doi:10.1590/S0100-54052010000100009

Malavolta E, Vitti GC, Oliveira SA (1997) Avaliação do Estado Nutricional das Plantas: Princípios e Aplicações, 2nd edn. POTAFOS, Piracicaba, 319 p

Marschner H (2012) Mineral nutrition of higher plants, 3rd edn. Academic, San Diego, 643 p

Martinez HEP, Carvalho JG, Souza RB (1999) Diagnose foliar. In: Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez V VH. Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª aproximação. CFSEMG, Viçosa, 143–168

Moraes SR, Pozza EA, Alves E, Pozza AA, Carvalho JG, Lima PH, Botelho AO (2006) Effects of silicon sources on the incidence and severity of the common beans anthracnose. *Fitopatol Bras* 31:69–75. doi:10.1590/S0100-41582006000100012

Patel P (2009) Chemical control of sigatoka leaf spot (*Mycosphaerella musicola*) of banana. *International Journal of Plant Protection* 2:98–100

Pereira SC, Rodrigues FA, Carré-Missio V, Oliveira MGA, Zambolim L (2009) Effect of foliar application of silicon on soybean resistance against soybean rust and on the activity of defense enzymes. *Trop Plant Pathol* 34:164–170. doi: 10.1590/S1982-56762009000300005

Ploetz RC, Kema GHJ, Ma, LJ (2015) Impact of diseases on export and smallholder production of banana. *Annu Rev Phytopathol* 53:269–88. doi:10.1146/annurev-phyto-080614-120305

Pozza AAA, Alves E, Pozza EA, Carvalho JG, Montanari M, Guimarães PTG, Santos DM (2004) Effect of silicon on the control of brown eye spot in three coffee cultivars. *Fitopatol Bras* 29:185–188. doi:10.1590/S0100-41582004000200010

Pozza EA, Pozza AAA (2012) Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. In: SIMPÓSIO AVANÇOS NA OTIMIZAÇÃO DO USO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NO MANEJO FITOSSANITÁRIO, 12., Lavras. Anais...Lavras: UFLA, 2012. 1 CD-ROM.

Pozza EA, Pozza AAA, Botelho DMDS (2015) Silicon in plant disease control. *Revista Ceres* 62:323–331. doi:10.1590/0034-737X201562030013

Resende RS, Rodrigues FA, Gomes RJ, Nascimento KJT (2013) Microscopic and biochemical aspects of sorghum resistance to anthracnose mediated by silicon. *Annals of Applied Biology* 163:114–123. doi:10.1111/aab.12040

Ribeiro LR, Oliveira LM, Silva SO, Borges AL (2013) Evaluation of banana cultivars in conventional and organic crop system. *Rev Bras Frutic* 35:508–517. doi:10.1590/S0100-29452013000200021

Rocha HS, Pozza EA, Uchôa CDN, Cordeiro ZJM, Souza PE, Sussel ÂAB, Rezende CA (2012) Temporal progress of yellow Sigatoka and aerobiology of *Mycosphaerella musicola* Spores. *J Phytopathol* 160:277–285. doi:10.1111/j.1439-0434.2012.01897.x

Sangster AG, Hodson MJ, Tubb HJ (2001) Silicon deposition in higher plants. In: Datnoff LE, Snyder GH, Korndörfer GH (Eds) *Silicon in Agriculture*. Amsterdam, Elsevier. p.85–113

Shaner G, Finney RE (1977) The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildew resistance in Knox wheat. *Phytopathology* 67:1051–1056

Shapiro SS, Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52:591–611

Stover RH (1971) A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola*). *Trop Agriculture* 48:185–196

Su L, Ruan Y, Yang X, Wang K, Li R, Shen Q (2015) Suppression on plant-parasitic nematodes using a soil fumigation strategy based on ammonium bicarbonate and its effects on the nematode community. *Scientific reports* 5. doi:10.1038/srep17597

Vermeire ML, Kablan L, Dorel M, Delvaux B, Risède JM, Legrève A (2011) Protective role of silicon in the banana-*Cylindrocladium spathiphylli* pathosystem. *Eur J Plant Pathol* 131:621–630. doi: 10.1007/s10658-011-9835-x

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

**ARTIGO 3****Interaction between K and Ca on the severity of Yellow Sigatoka in banana plants**

Artigo submetido ou em processo de submissão em periódicos.

Aurivan S. Freitas<sup>1</sup> • Edson A. Pozza<sup>1</sup> • Adélia A. A. Pozza<sup>2</sup> • Humberson R. Silva<sup>1</sup> • Maria G. O. Soares<sup>1</sup> • Cristian D. P. Pérez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Plant Pathology Department, Federal University of Lavras, PO Box 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

<sup>2</sup>Department of Soil Science, Federal University of Lavras, PO Box 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brazil

Corresponding author: Aurivan S. Freitas, email: aurivan.soares@hotmail.com

Preparado em concordância com as normas do periódico

**“European Journal of Plant Pathology”**

(Versão preliminar – submetido)

## Abstract

The main control measure of Yellow Sigatoka (*Pseudocercospora musae*) in banana plants (*Musa* spp.) has been the planting of resistant varieties and fungicide application. However, the use of adequately nourished plants is also emphasized as a complementary control method. This study evaluated the influence of interaction between potassium (K) and calcium (Ca) in nutrient solution on the severity of Yellow Sigatoka in banana. The experiment used a randomized block design with three replications and factorial analysis of variance 5 x 5 with 5 concentrations of K (1, 2, 4, 6, and 8 mmol L<sup>-1</sup>) combined with 5 concentrations of Ca (1, 3, 5, 7, and 9 mmol L<sup>-1</sup>) in 25 treatments. Inoculation was carried out in a 36 cm<sup>2</sup> area in the median abaxial surface of leaves 1, 2, 3, and 4. Evaluation included severity of disease, chlorophyll *a* and *b* contents, nutrient contents, and total dry weight (TDW). Severity data were integrated in the area under the disease severity progress curve (AUDSPC). There was no interaction between concentrations of K and Ca ( $p \leq 0.05$ ) for AUDSPC, although the AUDSPC increased in leaves 1 and 2 ( $p \leq 0.01$ ) with increasing concentrations of K from 1 to 6 mmol L<sup>-1</sup>. Increasing K led to a reduction in chlorophyll *a* and *b* contents ( $p \leq 0.05$ ) and in nutrients N, P, Mg, B, Cu, Zn, and Mn ( $p \leq 0.01$ ). TDW increased with increasing K ( $p \leq 0.01$ ). Therefore, high concentration of K causes nutritional imbalance in banana plants and favors the severity of Yellow Sigatoka.

**Keywords** *Pseudocercospora musae* • *Musa* spp. • hydroponics • nutritional imbalance

## Introduction

Banana (*Musa* spp.) is grown worldwide in tropical and subtropical countries. Yellow Sigatoka leaf spot disease, caused by the fungus *Pseudocercospora musae* Zimm (teleomorph *Mycosphaerella musicola* Leach), is a major factor affecting global production, particularly when susceptible varieties are grown in favorable microclimates (Rocha et al. 2012; Aman and Rai 2015). The disease reduces photosynthetic area and plant growth, thus affecting fruit quality with obvious consequences for productivity (Castelan et al. 2013). Disease management basically involves genetic and chemical control (Cordeiro and Matos 2005; Ferreira et al. 2003; Patel 2009). In many cases, genetic control for resistance displeases the consumer with a supply of unpalatable varieties without commercial appeal. Also, misuse of chemical control agents results in risks to the applicator, environment, and selection of fungicide resistant populations. It also weighs the cost of production, thus reducing producer profits.

However, an alternative method using properly nourished plants can reduce severity of disease (Pozza and Pozza 2012) without altering fruit taste. Among mineral nutrients, potassium (K) and calcium (Ca) participate in various plant defense responses to plant pathogens (Garcia Júnior et al. 2003; Sugimoto et al. 2005; Pinheiro et al. 2011; Belan et al. 2014). In general, K-deficient plants are susceptible to infection (Sharma et al. 2005; Balardin et al. 2006; Uchôa et al. 2011; Marschner 2012). This behavior is not a rule, however, as some studies report increased disease with increasing concentration of K, such as in the cases of *Cercospora coffeicola* in coffee and *Colletotrichum gloeosporioides* in strawberry, due to an imbalance of K and Ca (Pozza et al. 2001; Garcia Júnior et al. 2003; Nam et al. 2006). Potassium participates in regulating various physiological pathways, such as enzyme activation, protein synthesis,



photosynthesis, osmoregulation, transport, and stress resistance (Marschner 2012). Potassium contributes to improving plant resistance to pathogens with mechanisms such as increased availability of proteins and amino acids, including those involved in forming resistance barriers, and greater accumulation of phytoalexins and phenols around infection sites to reduce colonization and reproduction of pathogens (Huber and Arny 1985). With respect to calcium, studies have shown reduction in intensity of diseases with increasing concentration of Ca up to balance point with other ions (Pozza et al. 2012). Calcium plays a key role in recognizing invading pathogens in the plasma membrane, acting as a second messenger (Yang et al. 1997) to maintain biomembrane stability, thus avoiding the outflow of low molecular weight compounds from the cytoplasm to the apoplast (Marschner 2012). Calcium also acts to build and strengthen the cell wall, thus hindering pathogen infection (Bateman and Lumsden 1965).

In addition to the isolated effect, it is important to know how the interaction of these nutrients in plants influences the intensity of disease. According to Marschner (2012), cations  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  compete with each other and with other nutrients for the same absorption sites, which results in unbalanced plant nutrition. In other cultures, imbalance of  $K^+/Ca^{2+}$  ratio promoted changes in nutritional status and favored pathogen infection (Pozza et al. 2001; Garcia Júnior et al. 2003; Lima et al. 2010; Pinheiro et al. 2011; Carvalho et al. 2013). In the case of banana plants, the intensity of Yellow Sigatoka was higher in plants grown in K-deficient nutrient solution (Freitas et al. 2015b) and lower in plants grown in soil with higher contents of Ca (Freitas et al. 2015a; Gerald et al. 2003). Although there is no report emphasizing the effects of interaction of these nutrients in plants prone to *P. musae*, the culture was found to be sensitive to nutritional imbalance (Silva et al. 2008). Thus, knowledge of nutrient effects on the severity of Yellow Sigatoka can help

develop management strategies, consequently reducing crop protection applications and increasing environmental and financial sustainability of banana crops. This study evaluated K and Ca interaction in nutrient solution in the severity of Yellow Sigatoka in banana plants.

## **Material and methods**

### **Plant material and growth conditions**

The experiment was conducted under greenhouse conditions with relative humidity 80% and average temperature 25 °C. Seedlings of micropropagated banana plants (*Musa acuminata* 'Grande Naine AAA Cavendish') with 49 days age obtained from tissue culture were adapted in trays containing 16 L nutrient solution (Hoagland and Arnon 1950) at 50% ionic strength, with continuous ventilation for 15 days. Once adapted, plants were transferred to 6-liter pots containing nutrient solution with continuous aeration. Treatments consisted of five concentrations of K (1, 2, 4, 6, and 8 mmol L<sup>-1</sup>) combined with five concentrations of Ca (1, 3, 5, 7, and 9 mmol L<sup>-1</sup>) in a total of 25 treatments in factorial analysis of variance (5 x 5). The experiment was conducted in randomized block design with three replications. The experimental unit consisted of one plant per pot, and the whole experiment was replicated once.

Concentrations of N (15 mmol L<sup>-1</sup>), P (1 mmol L<sup>-1</sup>) Mg (2 mmol L<sup>-1</sup>), S (2 mmol L<sup>-1</sup>) and micronutrients (1 mL of L<sup>-1</sup> micronutrient stock solution) were the same in all treatments. Micronutrient stock solution was composed of 2.86 g L<sup>-1</sup> boric acid, 1.81 g L<sup>-1</sup> manganese chloride, 0.10 g L<sup>-1</sup> zinc chloride, 0.04 g L<sup>-1</sup> copper chloride, and 0.02 g L<sup>-1</sup> molybdic acid. Iron was provided by adding 1

mL of iron stock solution (33.3 g Na<sub>2</sub> EDTA, 100.4 mL NaOH 1N, 24.9 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O and 4 mL HCl 1N) L<sup>-1</sup> in the nutrient solution (Lima et al. 2010).

The pH of nutrient solution was monitored weekly and kept at 5.5-6 with addition of HCl 0.1 mol L<sup>-1</sup> or NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup>. When necessary, volume of pots was supplemented with deionized water. Depletion of ions from the nutrient solution was checked weekly with a Compaction Meter device for K<sup>+</sup> (Horiba-CARDY®). Nutrient solution was changed in all treatments when depletion reached 30% of the initial value of K<sup>+</sup> (Braccini et al. 1999).

### **Inoculum preparation and inoculation**

The isolate of *P. musae* came from diseased banana leaves (Cordeiro et al. 2011) and conidia was obtained using the method described by Freitas et al. (2015b) with modifications. Ten mycelial fragments (5 mm diameter) taken from the colonies after 26 days of growth in Petri dishes containing malt medium (20g malt extract, 20g agar and 1,000 mL distilled water) were macerated in mortar and pestle. Then, the mash was diluted in 15 mL tomato juice (200 mL tomato juice, 1g CaCO<sub>3</sub>, and 900 mL distilled water) and transferred to a 9-cm Petri dish with solid tomato juice (200 mL tomato juice, 20g agar, 1g CaCO<sub>3</sub>, and 900 mL distilled water). To facilitate drying, dishes were left open in BOD at 25 °C with a 24 h photoperiod and four 20-watt fluorescent bulbs. Once the culture medium was dry, about two days after incubation, 10 mL sterilized distilled water was added to each Petri dish and conidia were released from the dry mycelium with a toothbrush. This suspension was filtered on a double layer of cheesecloth and concentration was adjusted to 4 x 10<sup>4</sup> conidia mL<sup>-1</sup> using a hemocytometer, establishing an average of 4 readings.

Inoculation was carried out two months after transferring plants to the nutrient solution containing the treatments. Leaves 1, 2, 3 and 4 were inoculated on the abaxial surface by spraying 0.7 mL conidial suspension in a 36 cm<sup>2</sup> area delineated in the median region. After inoculation, plants were individually covered with transparent plastic bags for 60 h, remaining at 23°C and relative humidity 92%.

### Assessment of disease severity

Severity of disease was evaluated on the abaxial surface of each inoculated area after the first symptoms appeared. Five evaluations were performed at five-day intervals, based on the diagrammatic scale described by Stover (1971) and modified by Gauhl (1994). Scores ranged from 0 to 5, being: 0 - inoculated area without symptoms, 1- inoculated area with up to 10 stains, 2- inoculated area with 1% to 5% stains, 3 - inoculated area with 6% to 15% stains, 4 - inoculated area with 16% to 33% stains, and 5 - inoculated area with 34% to 50% stains.

All five evaluations were integrated in the area under the disease severity progress curve (AUDSPC) using the equation proposed by Shaner and Finney (1977):

$$\text{AUDSPC} = \sum_{i=1}^{n-1} \left( \frac{y_i + (y_i + 1)}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

Where:

$y_i$  = severity of disease in the  $i$ -th observation;

$t_i$  = time in days in the  $i$ -th observation;

$n$  = total number of observations.

### Chlorophyll assessment

Chlorophyll content was measured in samples of fresh leaf tissue of banana variety 'Grande Naine' with different shades of green, using a portable SPAD-502<sup>®</sup> for calibration. After reading, 0.2 g plant tissue was weighed and macerated in liquid nitrogen, then transferred into tubes containing 10 mL of 80% acetone (v/v), remaining for 24 h in cold chamber protected from light. After 24 h, extracts were filtered and reading was performed with spectrophotometer at wavelengths 663 and 645 nm for chlorophyll *a* and *b*, respectively. Determination of chlorophyll (mg gmf<sup>-1</sup>) was based on the following equations, according to Whitham et al. (1971):

$$\text{Chlorophyll } a = \frac{(12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645})V}{1000 \text{ MMF}}$$

$$\text{Chlorophyll } b = \frac{(22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663})V}{1000 \text{ MMF}}$$

Where:

A: absorbance at the indicated wavelength,

V: final volume of chlorophyll-acetone extract,

MMF: fresh weight in grams of plant material [mg (g MF)<sup>-1</sup>].

Once calibration curve was built, readings were taken with SPAD-502<sup>®</sup> near the inoculated areas, 24 h before inoculation. With the data obtained, contents of chlorophyll *a* and *b* were determined using the following equations:

$$Y_a = -0.0035 + 0.0007356X$$

$$Y_b = -0.0001734 + 0.0002983X$$

Where:

X = SPAD reading

Ya = chlorophyll *a*

Yb = chlorophyll *b*

### **Determination of leaf nutrient contents**

Nutrient contents were determined at the end of the experiments, after evaluations were completed. Leaves 3, except the central ribs, were washed in distilled water, placed in paper bags and dried in oven at 60°C until constant weight (Martinez et al. 1999). Then, samples were ground and analyzed according to the method proposed by Malavolta et al. (1997) to determine the contents of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, sulfur, boron, copper, zinc, and manganese.

### **Determination of plant dry weight**

Total dry weight of plants was determined after evaluations were completed at the end of the experiments. Leaves, stems, and roots were washed, packed in paper bags, and placed on a greenhouse bench for preliminary drying, then dried in an oven at 60°C until constant weight.

### **Data analysis**

The Shapiro-Wilk test (Shapiro and Wilk 1965) was applied to the data of each replication to evaluate normal distribution. As data were normally distributed, the variables required no transformation. Thus, data from both experiments were subjected to joint analysis over time to determine differences

between them. Variables underwent analysis of variance (ANOVA) in a factorial 5 x 5, i.e. 5 concentrations of potassium and 5 of calcium, in a total of 25 treatments. Linear regression models were fit to significant variables in F test ( $p \leq 0.05$ ). Response surfaces were fit in case of significant interaction. Normal distribution of data was analyzed using R software, while the remaining analyses were performed using PROC GLM procedure in SAS software (v.9.2, SAS Institute Inc.). Graphs were developed with Sigma Plot 10 software (SigmaPlot 2008).

## **Results**

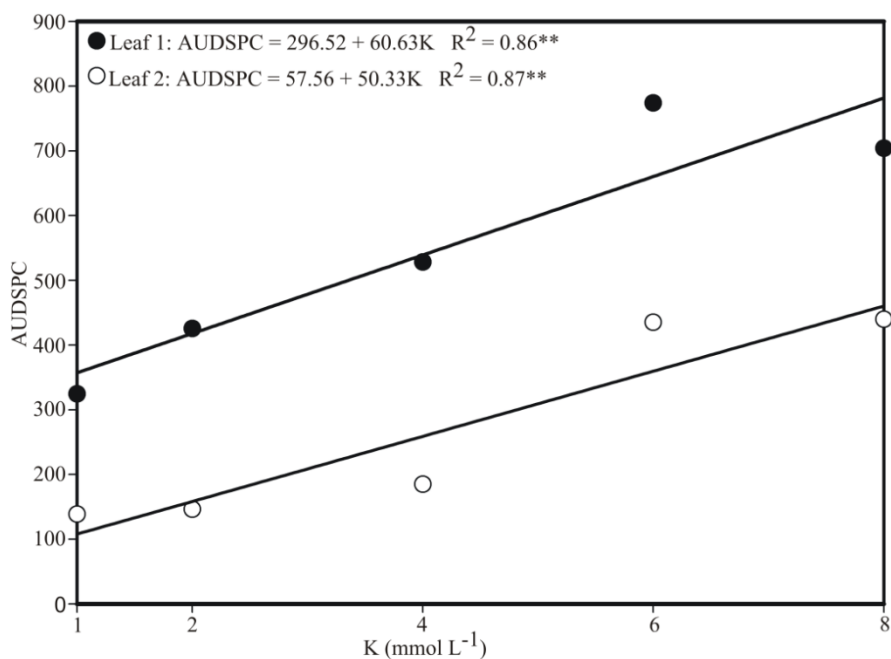
### **Joint analysis of data**

Joint analysis of variables over time showed no significant difference ( $p \leq 0.05$ ) between experiments. Thus, results are the average of two replications.

### **Severity of Yellow Sigatoka due to increased concentration of K and Ca**

Early symptoms of Yellow Sigatoka in areas inoculated with *P. musae* were observed 26 days after inoculation. There was no significant interaction ( $p \leq 0.05$ ) between K and Ca concentrations for the area under the disease severity progress curve (AUDSPC). There was no effect of isolated concentrations of Ca on AUDSPC with overall average 551.17 and 268.96 in leaves 1 and 2, respectively. However, increase in K concentrations from 1 to 6 mmol L<sup>-1</sup> influenced ( $p \leq 0.01$ ) increase in AUDSPC from 357.15 to 660.3 and 107.89 to 359.57 in leaves 1 and 2, respectively. AUDSPC in leaf 1 was on average 51.37% higher than in leaf 2 (Fig.1). AUDSPC in leaves 3 and 4 was

not significantly affected ( $p \leq 0.05$ ) either by interaction of K and Ca concentrations or by isolated effect of these nutrients.



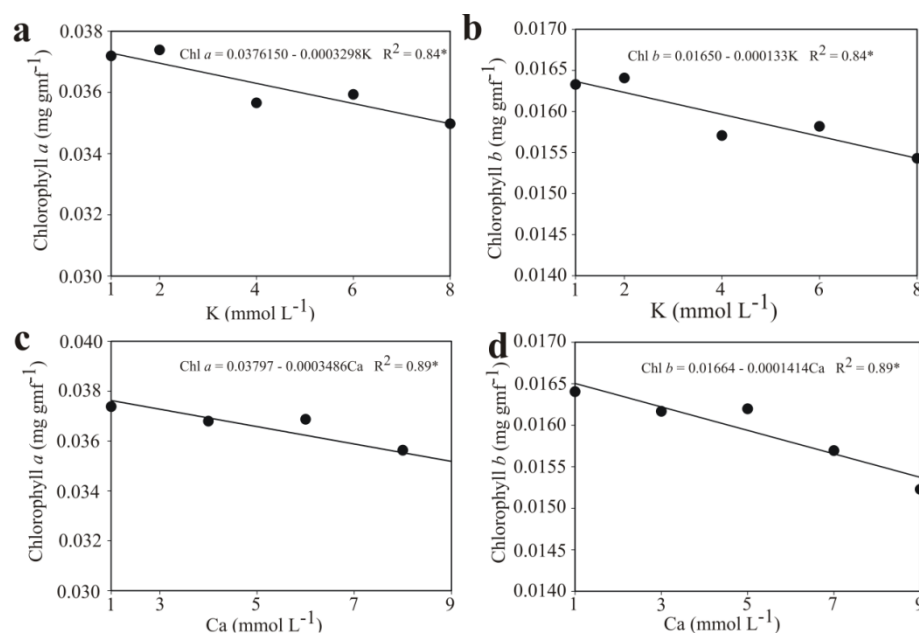
**Fig. 1** Area under the disease severity progress curve (AUDSPC) in leaves 1 and 2 of banana plants, depending on concentration of potassium (K) in nutrient solution. \*\*Significant ( $p \leq 0.01$ ).

### **Content of chlorophyll *a* and *b* depending on increase of K and Ca concentrations**

There was no significant interaction ( $p \leq 0.05$ ) between K and Ca concentrations for leaf contents of chlorophyll *a* and *b*. However, increase of these nutrients significantly reduced ( $p \leq 0.05$ ) the content of chlorophyll *a* and *b* in leaves in an independent way. With increasing concentrations of K from 2 to 8 mmol L<sup>-1</sup>, leaf content of chlorophyll *a* and *b* decreased from 0.0370 to 0.0350 mg gm<sup>-1</sup> and 0.0162 to 0.0154 mg gm<sup>-1</sup>, respectively (Fig. 2 a and b). Increase



of Ca from 1 to 9 mmol L<sup>-1</sup> decreased leaf contents of chlorophyll *a* and *b* from 0.0376 to 0.0348 mg gm<sup>-1</sup> mg and 0.0165 to 0.0154 mg gm<sup>-1</sup>, respectively (Fig. 2 c and d).



**Fig. 2** Leaf content of chlorophyll *a* (a and c) and *b* (b and d) in banana leaves depending on concentrations of potassium (K) and calcium (Ca) in nutrient solution. gm<sup>f</sup>: gramm of fresh weight. \*Significant ( $p \leq 0.05$ ).

### Nutritional aspects of banana plants depending on increase of K and Ca concentrations

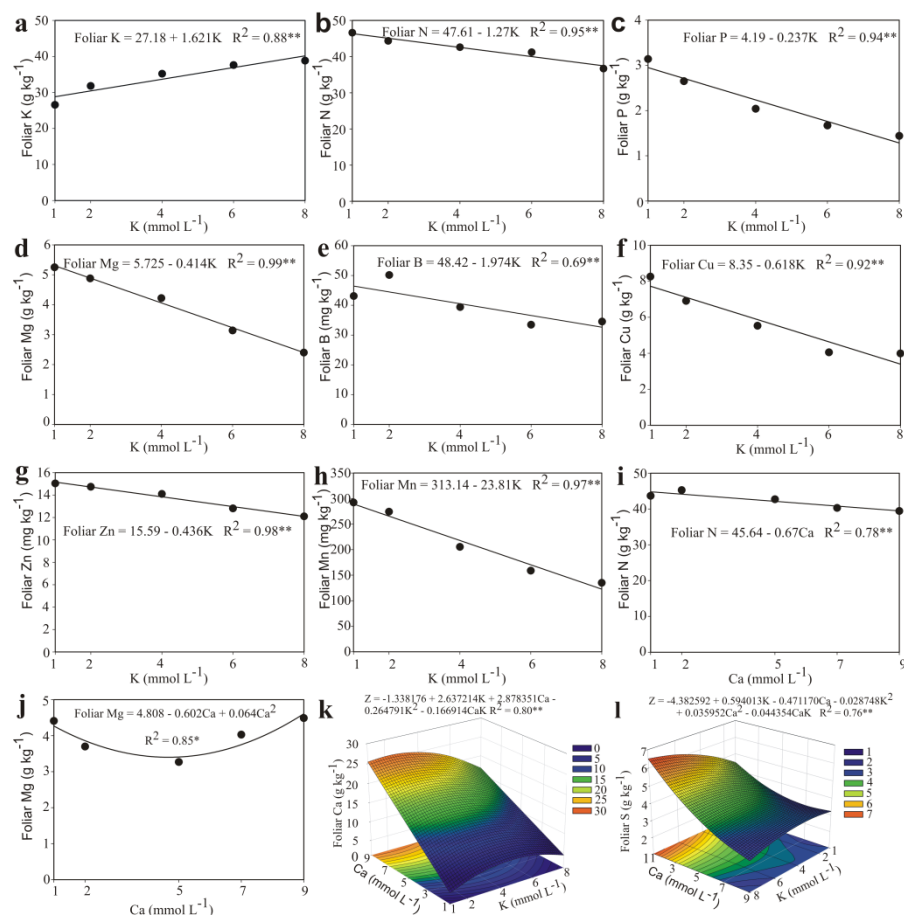
There was a significant interaction ( $p \leq 0.01$ ) between K and Ca concentrations for leaf contents of sulfur (S) and calcium (Ca). The highest Ca leaf content (25.77 g kg<sup>-1</sup>) was found in concentrations 9 and 2 mmol L<sup>-1</sup> of Ca and K, respectively (Fig. 3 k). Regarding S, the highest content (6.5 g kg<sup>-1</sup>) was

observed in the combination of concentrations 1 and 8 mmol L<sup>-1</sup> of Ca and K, respectively (Fig. 3 l).

Separately, increasing K and Ca concentrations significantly influenced ( $p \leq 0.05$ ) nutrition of banana plants.

Regarding K, increase in concentrations from 1 to 8 mmol L<sup>-1</sup> raised ( $p \leq 0.01$ ) K leaf content from 28.80 to 40.14 g kg<sup>-1</sup> respectively (Fig. 3 a). However, increasing K (Fig. 3 b-h) reduced ( $p \leq 0.01$ ) leaf contents of N (46.34 to 37.45 g kg<sup>-1</sup>), P (3.95 to 2.35 g kg<sup>-1</sup>), Mg (5.31 to 2.41 g kg<sup>-1</sup>), micronutrients B (46.44 to 32.62 mg kg<sup>-1</sup>), Cu (7.73 to 3.4 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (15.16 to 12.1 mg kg<sup>-1</sup>) and Mn (289.29 to 122.62 mg kg<sup>-1</sup>).

Increased concentration of calcium from 1 to 9 mmol L<sup>-1</sup> influenced ( $p \leq 0.01$ ) reduction in N leaf content from 44.80 to 39.47g kg<sup>-1</sup> (Fig. 3 i). In addition, Mg leaf content decreased from 4.27 to 3.39 g kg<sup>-1</sup> up to 4.70 mmol L<sup>-1</sup> and increased from this concentration up to 4.57g kg<sup>-1</sup> at 9 mmol L<sup>-1</sup> (Fig. 3 j).

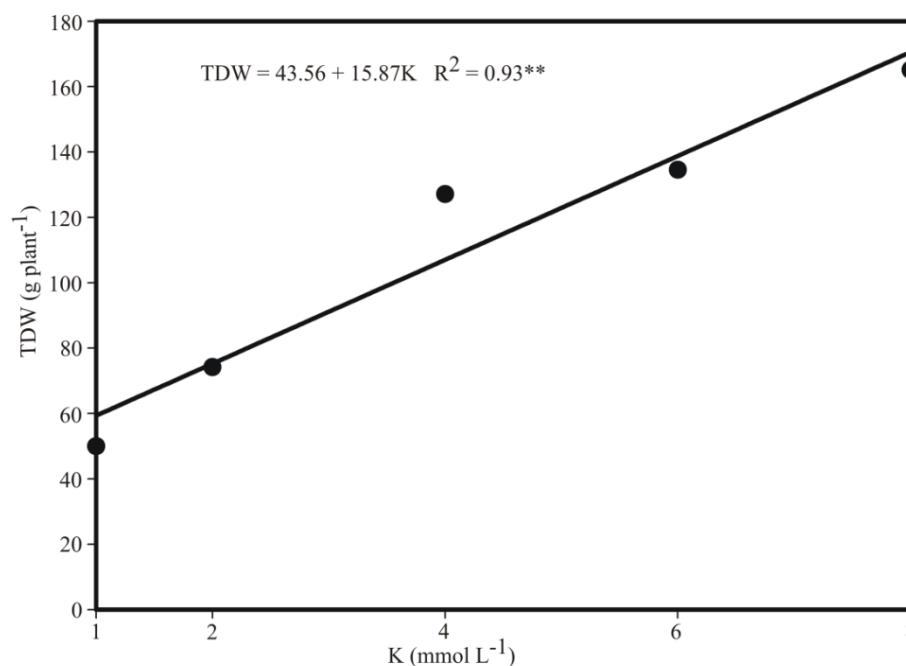


**Fig. 3** Leaf contents of potassium (a), nitrogen (b and i), phosphorus (c), magnesium (d and j), boron (e), copper (f), zinc (g), manganese (h), calcium (k) and sulfur (l) in banana leaves, depending on concentrations of K and Ca in nutrient solution. \*\*Significant ( $p \leq 0.01$ ) \*Significant ( $p \leq 0.05$ ).

### Plant dry weight depending on increased concentrations of K and Ca

Total dry weight (TDW) of plants was not significantly influenced ( $p \leq 0.01$ ) either by interaction of K and Ca concentrations or by isolated effect of Ca concentration. However, increased K concentrations significantly influenced

TDW increase, ranging from 59.43 to 170.52 g plant<sup>-1</sup> at K concentrations 1 and 8 mmol L<sup>-1</sup> respectively, i.e. TDW increased 15.87 g per 1 mmol L<sup>-1</sup> of K supplemented in nutrient solution (Fig. 4).



**Fig. 4** Total dry weight (TDW) of banana plants depending on concentrations of potassium (K) in nutrient solution. \*\*Significant ( $p \leq 0.01$ ).

## Discussion

Addition of K to nutrient solution influenced increase of area under the disease severity progress curve (AUDSPC) for *P. musae* in banana plants. However, Uchôa et al. (2011) found reduction in severity of Black Sigatoka (*M. fijiensis*) from 260 to 117 intensity with increasing potassium concentration in soil of planting areas from 28 to 57.5 mg dm<sup>-3</sup>, respectively. Conversely, Freitas et al. (2015b) found that absence of K in nutrient solution resulted in higher severity of *P. musae* in banana plants. The findings of this study are different

from those reported by Uchôa et al. (2011), obviously due to experiment conditions. Several soil factors can influence the nutritional status of plants. In nutrient solution, by contrast, it is possible to isolate the effect of each nutrient, enabling the study of relationship between nutrient effects and intensity of disease (Lima et al. 2010). Experiments also conducted in nutrient solution for other pathosystems showed similar results to this study. The area under the progress curve of cercospora leaf spot (*C. coffeicola*) of coffee increased from 14.6 to 17.39 with increase of K from 4 to 7 mmol L<sup>-1</sup>, respectively (Garcia Júnior et al. 2003). Also in coffee, phoma leaf spot (*Phoma tarda*) increased the area under incidence progress curve (AUIPC) and area under severity progress curve (AUSPC) with K contents above 6.59 and 6.57 mmol L<sup>-1</sup>, respectively (Lima et al. 2010). Excess of potassium, 30 mmol L<sup>-1</sup>, also influenced increase of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in strawberries (Nam et al. 2006). Potassium applied appropriately in soil, 8% K<sub>2</sub>O, reduced anthracnose (*Discula destructiva*) in *Cornus florida* L. However, opposite results were found with double amount of K, 16% K<sub>2</sub>O (Holzmueller et al. 2007). That is, as the effect of K on intensity of disease depends on the pathosystem, it is not possible to generalize the findings. Soil factors such as interaction between nutrients, organic matter and pH, and buffering capacity, texture, and structure should also be considered. Hosts may also influence this interaction depending on their nutritional requirements at each stage of life cycle. As it is known in the literature, banana plants require large amounts of K (Borges and Souza 2004).

Overall, leaf nutrient contents were outside both the range considered appropriate and the reference values established by Borges and Souza (2004) and Martinez et al. (1999) for banana growing, respectively (Table 1).

**Table 1** Ranges of macro and micronutrient contents considered adequate<sup>a</sup> (Borges and Souza 2004) and reference values<sup>b</sup> (Martinez et al. 1999) for banana cultivars Nanica, Nanicão and Grande Naine. <sup>c</sup>Upper and lower limits of nutrients obtained in the experiment using regression models.\*Limits obtained from K concentrations in nutritive solution; \*\*Limits obtained from interaction between K and Ca concentrations in nutrient solution.

N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Zn	Mn
-----g kg <sup>-1</sup> -----					-----mg kg <sup>-1</sup> -----				
<sup>a</sup> 27-36	1.6-2.7	32-54	6.6-12	2.7-6.0	1.6-3.0	10-25	6-30	20-50	200-1800
<sup>b</sup> 26	2.2	28	6	3	2	15	8	20	88
<sup>c</sup> 46.3-37.4*	3.9-2.3*	28.8-40.1*	25.7-3.7**	5.3-2.4*	6.5-2.7**	46.4-32.6*	7.7-3.4*	15.1-12.1*	289-122*

Thus, it can be concluded that increased severity of Yellow Sigatoka was due to plant nutrient imbalance. Freitas et al. (2015b) also found increasing severity of Yellow Sigatoka caused by nutrient imbalance in banana plants. Similarly, imbalance due to high contents of S and low contents of P, Ca, and Mg in the soil resulted in increased severity of Black Sigatoka from 117 to 340 intensity (Uchôa et al. 2011). In coffee, increase of K contents up to 7 mmol L<sup>-1</sup> reduced absorption of N and Ca, making plants more susceptible to cercospora leaf spot (Garcia Júnior et al. 2003; Pozza et al. 2001). In the same culture, imbalance in ratio N/K also promoted changes in the nutritional status of plants and favored infection by *P. tarda* (Lima et al. 2010). For Huber and Haneklaus (2007), nutrient imbalance can be as harmful to plant resistance to disease as nutrient deficiency. According to Marschner (2012), high concentrations of K can cause nutrient imbalance by reducing the uptake of other nutrients. This result was confirmed by Pinheiro et al. (2011), who found a reduction of 26.4% in Ca contents in soybean leaves with increasing K in nutrient solution.

Increasing K also reduced leaf contents of chlorophyll *a* and *b*. Chlorophylls are green pigments specialized in absorbing light and transferring energy and electrons during photosynthesis, and are thus related to this process efficiency (Taiz and Zeiger 2013). However, leaf chlorophyll content can be reduced under physiological stress (Larcher 2004). Thus, reduction in contents of chlorophyll *a* and *b* can be attributed to nutritional imbalance, as, besides being part of plant molecular structure, mineral nutrients also participate in important reactions during chlorophyll synthesis (Neves et al. 2005). As an example, Mg, N and Mn show contents outside the suitable range for banana (Table 1). As magnesium is part of the structure of chlorophyll molecule (Marschner 2012), Mg-deficient plants are more susceptible to disease (Huber and Jones 2013). In coffee, Alves et al. (2009) found higher intensity of rust (*Hemileia vastatrix*) in leaves and cercospora leaf spot in leaves and fruits in

crops with Mg, S, N, and Cu deficiency. In rice, sheath blight (*Rhizoctonia solani*) was reduced with increasing Mg concentration from 0.062 to 0.5 mmol L<sup>-1</sup> (Schurt et al. 2014).

Regarding N and Mn, the former is important as a chlorophyll constituent and the latter for its role in photosynthetic reaction, in which oxygen is produced from water (Taiz and Zeiger 2013). The positive effect of these nutrients in reduction of plant diseases has been demonstrated in other studies. Furtado et al. (2009) found higher incidence of Panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) in banana plants with lower contents of nitrogen. Incidence of cercospora leaf spot of coffee was reduced by 20.7% with increase of N from 3 to 15 mmol L<sup>-1</sup> (Pozza et al. 2001). In wheat, severity of spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) was reduced with increasing Mn in leaves (Zanão Júnior et al. 2009).

In addition to nutrient imbalance, plant growth stage may explain the difference in susceptibility to *P. musae*, as AUDSPC was higher in young leaves. Similar results were found in banana plants infected with *M. fijiensis* (Kablan et al. 2012; Romero 1995). Kablan et al. (2012) attributed these results to the formation of physical or physiological barriers in old leaves, acting either during or after fungal invasion. In this study, as there was no significant difference for AUDSPC in leaves 3 and 4, the formation of physical barriers such as lignification and cuticle thickening helped reduce the intensity of disease.

Although addition of K had increased AUDSPC and reduced leaf contents of N, P, Mg, B, Cu, Zn, Mn, and chlorophyll *a* and *b*, there was increase in total dry weight of plants. Likewise, Silva et al. (2008) found higher dry weight of banana plants grown with higher doses of K in soil, up to 1.600 mg dm<sup>-3</sup>. Increased dry weight in contrast to reduction in contents of most nutrients can be explained, since contents were still close to the suitable range



for banana even after reduction (Borges and Souza 2004; Martinez et al. 1999). In addition, availability of water and nutrients to plants is constant during experiments in nutrient solution, as water level is kept constant and nutrients are changed when depletion reaches 30% of the initial value (Braccini et al. 1999). Under these conditions, plant growth is possible even with low contents of some nutrients. According to Marschner (2012), although high concentrations of K decrease the contents of other nutrients, plant growth may increase. In banana culture, K and N are the most important nutrients for plant growth (Borges and Souza 2004). Thus, in this study, the favorable conditions of hydroponics and increase of K were responsible for increasing plant weight. Reduction in contents of chlorophyll *a* and *b* was insufficient to affect plant growth. Also, as disease manifested only in the inoculated area and not in the full leaf, there was no influence on total dry weight of plants.

High concentrations of K in nutrient solution promoted nutritional changes in banana plants, mainly by reducing leaf contents of N, P, Mg, B, Cu, Zn, and Mn. As a result of this imbalance, there was an increase in severity of Yellow Sigatoka. Therefore, proper and balanced fertilization can minimize nutritional changes in banana plants and reduce the number of fungicide sprays for controlling *P. musae*.

**Acknowledgements** To the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) for financial support.

## References

- Alves, M. C., Silva, F. M., Pozza, E. A., & Oliveira, M. S. (2009). Modeling spatial variability and pattern of rust and brown eye spot in coffee agroecosystem. *Journal of Pest Science*, doi:10.1007/s10340-008-0232-y
- Aman, M., & Rai, V. R. (2015). Potent toxigenic effect of *Mycosphaerella musicola* on locally growing banana varieties. *Phytoparasitica*, doi:10.1007/s12600-015-0456-3
- Balardin, R. S., Dallagnol, L. J., Didoné, H. T., & Navarini, L. (2006). Influence of phosphorus and potassium on severity of soy bean rust *Phakopsora Pachyrhizi*. *Fitopatologia Brasileira*. doi:10.1590/S0100-41582006000500005
- Bateman, D. F., & Lumsden, R. D. (1965). Relation between calcium content and nature of the peptic substances in bean hypocotyls of different ages to susceptibility to an isolate of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 55:734–738.
- Belan, L. L., Pozza, E. A., Freitas, M. L., Pozza, A. A. A., Abreu, M. S., & Alves, E. (2014). Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. *Australasian Plant Pathology*. doi:10.1007/s13313-014-0329-0
- Braccini, M. D. C. L., Lucca, A., & Martinez, H. E. P. (1999). Critérios para renovação ou manutenção de solução nutritiva em cultivo hidropônico. *Semina: Ciências Agrárias*. doi:10.5433/1679-0359.1999v20n1p48
- Borges, A. L., & Souza, L. S. (2004). *O cultivo da bananeira*. Cruz das Almas, Brazil.
- Carvalho, D. O., Pozza, E. A., Casela, C. R., Costa, R. V., Pozza, A. A. A., & Carvalho, C. O. (2013). Nitrogen and potassium fertilization influence on anthracnose severity in two corn cultivars. *Revista Ceres*. doi:10.1590/S0034-737X2013000300011
- Castelan, F. P., Abadie, C., Hubert, O., Chilin-Charles, Y., Bellaire, L. L., & Chillet, M. (2013). Relation between the severity of Sigatoka disease and banana quality characterized by pomological traits and fruit green life. *Crop Protection*. doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.019
- Cordeiro, Z. J. M., & Matos, A. P. (2005). Expression of resistance of banana varieties to yellow Sigatoka. *Fitopatologia Brasileira*. doi:10.1590/S0100-41582005000500013
- Cordeiro, Z. J. M., Rocha, H. S., & Araújo, A. G. (2011). *Metodologia para manuseio de Mycosphaerella musicola em laboratório*. Cruz das Almas, EMBRAPA Mandioca e Fruticultura.
- Ferreira, D. M. V., Cordeiro, Z. J. M., & Matos, A. D. (2003). Forecasting for the control of banana ‘yellow sigatoka’ in the recôncavo baiano region, Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura*. doi:10.1590/S0100-29452003000300017
- Freitas, A. S., Pozza, E. A., Alves, M. C., Coelho, G., Rocha, H. S., & Pozza, A. A. A. (2015a). Spatial distribution of Yellow Sigatoka Leaf Spot

correlated with soil fertility and plant nutrition. *Precision Agriculture*. doi:10.1007/s11119-015-9409-6

Freitas, A. S., Pozza, E. A., Pozza, A. A. A., Oliveira, M. G. F., Silva, H. R., Rocha, H. S., & Galvão L. R. (2015b). Impact of nutritional deficiency on Yellow Sigatoka of banana. *Australasian Plant Pathology*. doi:10.1007/s13313-015-0371-6

Furtado, E. L., Bueno, C. J., Oliveira, A. L. D., Menten, J. O. M., & Malavolta, E. (2009). Relationship between occurrence of Panama disease in banana trees of cv. Nanicão and nutrients in soil and leaves. *Tropical Plant Pathology*. doi:10.1590/S1982-56762009000400002

Garcia, Júnior. D., Pozza, E. A., Pozza, A. A., Souza, P. E., Carvalho, J. G., & Balieiro, A. C. (2003). Incidence and severity of the brown eye spot of coffee according to supply of potassium and calcium in nutrient solution. *Fitopatologia Brasileira*. doi:10.1590/S0100-41582003000300010

Gauhl, F. (1994). *Epidemiology and ecology of black sigatoka (Mycosphaerella fijiensis) on plantain and banana (Musa spp.) in Costa Rica, Central America*. The International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France. Montpellier, France.

Gerald, S. F., White, S. D., Dickinson, A. A., & Goldman, B. (2003). A survey of Sigatoka leaf disease (*Mycosphaerella musicola* Leach) of banana and soil calcium levels in North Queensland. *Animal Production Science*. doi:10.1071/EA02094

Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). *The water-culture method of growing plants without soil*. Berkeley, University of California.

Holzmueller, E. J., Jose, S., & Jenkins, M. A. (2007). Influence of calcium, potassium, and magnesium on *Cornus florida* L. density and resistance to dogwood anthracnose. *Plant and Soil*. doi:10.1007/s11104-006-9151-y

Huber, D. M., & Arny, D. C. (1985). Interactions of potassium with plant disease. In Munson, R. D., (Ed.) *Potassium in agriculture* (pp. 467–488). Amer Soc Agron., Madison USA.

Huber, D. M., & Haneklaus, S. (2007). *Managing nutrition to control plant disease*. Landbauforschung Volkenrode, 57(4), 313.

Huber, D. M., & Jones, J. B. (2013). The role of magnesium in plant disease. *Plant and Soil*. doi:10.1007/s11104-012-1476-0

Kablan, L., Lagauche, A., Delvaux, B., & Legrève, A. (2012). Silicon reduces black Sigatoka development in banana. *Plant Disease*. doi:10.1094/PDIS-04-11-0274

Larcher, W. (2004). *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RiMa Artes e textos.

Lima, L. M. D., Pozza E. A., Torres, H. N., Pozza, A. A., Salgado, M., & Pfenning, L. H. (2010). Relationship between nitrogen/potassium with Phoma

spot and nutrition of coffee seedlings cultivated in nutrient solution. *Tropical Plant Pathology*. doi:10.1590/S1982-56762010000400003

Malavolta, E., Vitti, G. C., & Oliveira, S. A. (1997). *Avaliação do Estado Nutricional das Plantas: Princípios e Aplicações*. Piracicaba, Potafos.

Marschner, H. (2012). *Mineral nutrition of higher plants*. San Diego, 3rd edn. Academic.

Martinez, H. E. P., Carvalho, J. G., & Souza, R. B. (1999). Diagnose foliar. In Ribeiro, A. C., Guimarães, P. T. G., Alvarez, V. V. H. *Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais*. 5ª aproximação. (pp.143–168). Viçosa: CFSEMG.

Nam, M. H., Jeong, S. K., Lee, Y. S., Choi, J. M., & Kim, H. G. (2006). Effects of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium nutrition on strawberry anthracnose. *Plant Pathology*. doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01322.x

Neves, O. S. C., Carvalho, J. G., Martins, F. A. D., Pádua, T. R. P., & Pinho, P. J. (2005). Use of SPAD-502 in the evaluation of chlorophyll contents and nutritional status of herbaceous cotton to nitrogen, sulphur, iron and manganese. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. doi:10.1590/S0100-204X2005000500014

Patel, P. (2009). Chemical control of sigatoka leaf spot (*Mycosphaerella musicola*) of banana. *International Journal of Plant Protection* 2:98–100.

Pinheiro, J. B., Pozza, E. A., Pozza, A. A. A., Moreira, A. S., & Alves, M. C. (2011). Effect of potassium and calcium supplied via nutrient solution on the severity of Asian soybean rust. *Revista Ceres*. doi:10.1590/S0034-737X2011000100007

Pozza, A. A. A., Martinez, H. E. P., Caixeta, S. L., Cardoso, A. A., Zambolim, L., & Pozza, E. A. (2001). Influence of the mineral nutrition on intensity of brown-eye spot in young coffee plants. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. doi:10.1590/S0100-204X2001000100007

Pozza, E. A., & Pozza, A. A. A. (2012). Relação entre nutrição e as doenças de plantas: implicações práticas. In *simpósio avanços na otimização do uso de defensivos agrícolas no manejo fitossanitário*. Lavras. Anais...UFLA, 1 CD-ROM.

Rocha, HS, Pozza, E. A., Uchôa, C. D. N., Cordeiro, Z. J. M., Souza, P. E., Sussel, Â. A. B., & Rezende C. A. (2012). Temporal progress of yellow Sigatoka and aerobiology of *Mycosphaerella musicola* Spores. *Journal of Phytopathology*. doi: 10.1111/j.1439-0434.2012.01897.x

Romero, R. A. (1995). *Dynamics of fungicide resistant populations of Mycosphaerella fijiensis and epidemiology of Black Sigatoka of bananas*. Ph.D. dissertation, North Carolina State, Raleigh.

Schurt, D. A., Lopes, U. P., Duarte, H. S., & Rodrigues, F. Á. (2014). Effect of magnesium on the development of sheath blight in rice. *Journal of Phytopathology* doi:10.1111/jph.12240

Shaner, G., & Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildew resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67(8), 1051–1056.

Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). *An analysis of variance test for normality (complete samples)*. Biometrika.

Sharma, S., Duveiller, E., Basnet, R., Karki, C. B., & Sharma, R. C. (2005). Effect of potash fertilization on *Helminthosporium* leaf blight severity in wheat, and associated increases in grain yield and kernel weight. *Field Crops Research*. doi:10.1016/j.fcr.2004.09.016

Sigma Plot. (2006) *Scientific graphing software*. Version 10.0. San Rafael: Hearne Scientific Software.

Silva, J. T. A., Silva, I. P., Moura Neto A., & Costa, É. L. (2008). Potassium, magnesium and limestone application in banana tree seedlings ‘Prata Anã’ (AAB). *Revista Brasileira de Fruticultura*. doi:10.1590/S0100-29452008000300037

Stover, R. H. (1971). *A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot (Mycosphaerella musicola)*. Trinidad and Tobago, Tropical Agriculture.

Sugimoto, T., Aino, M., Sugimoto, M., & Watanabe, K. (2005). Reduction of *Phytophthora* stem rot disease on soybeans by the application of  $\text{CaCl}_2$  and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . *Journal Phytopathology*. doi:10.1111/j.1439-0434.2005.01016.x

Taiz, L., & Zeiger, E. (2013). *Fisiologia vegetal*, Porto Alegre Artmed.

Uchôa, C. N., Pozza, E. A., Pozza, A. A. A., & Moraes, S. W. (2011). Geostatistical modeling of black-sigatoka and relation to soil fertility. *Bioscience Journal*, 27(3), 357–362.

Whitham, F. H., Blaydes, D. F., & Devlin, R. M. (1971). *Experiments in plant physiology*. New York, D. Van Nostrand Company.

Yang, Y., Shah, J., & Klessig, D. F. (1997). Signal perception and transduction in plant defence responses. *Genes Development*, 11(13), 1621–1639.

Zanão Júnior, L. A., Coelho, P. H. M., Fontes, R. L. F., Ávila, V. T., & Kawamura, I. K. (2009). Severity of spot blotch in wheat cultivated with different forms of nitrogen and manganese doses. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. doi:10.1590/S0100-06832009000500013

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Pseudocercospora musae* penetrou por meio dos estômatos situados na superfície abaxial das folhas. No campo, esse processo pode ocorrer com maior frequência, na folha zero, em decorrência da sua maior exposição. Sendo assim, a aplicação de agrotóxicos, visando ao controle da doença, deverá ser diferenciada com maior quantidade para essa folha.

*P. musae* colonizou, inicialmente, o parênquima esponjoso e, posteriormente, o paliádico. Entretanto, a inoculação foi realizada apenas na superfície abaxial, assim, um futuro estudo deverá ser realizado inoculando a superfície adaxial.

A adubação adequada e equilibrada, juntamente com aplicação de silício, pode minimizar alterações nutricionais, em bananeiras e reduzir o número de pulverizações com fungicidas para o controle da Sigatoka Amarela. Entretanto, estudos complementares, em condições de campo, fazem-se necessários.