

**EPIDEMIOLOGIA DA SIGATOKA AMARELA,  
QUANTIFICAÇÃO DE FENÓIS EM VARIEDADES DE  
BANANEIRAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE  
ISOLADOS DE *Mycosphaerella musicola* UTILIZANDO  
MICROSSATÉLITES**

**HERMINIO SOUZA ROCHA**

**2008**

**HERMINIO SOUZA ROCHA**

**EPIDEMIOLOGIA DA SIGATOKA AMARELA, QUANTIFICAÇÃO DE  
FENÓIS EM VARIEDADES DE BANANEIRAS E ANÁLISE  
FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE *Mycosphaerella musicola*  
UTILIZANDO MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras  
como parte das exigências do Curso de Doutorado em  
Agronomia, área de concentração em Fitopatologia, para  
a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

**Ficha Cartográfica Preparada Pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Rocha, Herminio Souza.

Epidemiologia da Sigatoka amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microssatélites / Herminio Souza Rocha. – Lavras : UFLA, 2008.

125 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Edson Ampélio Pozza

Bibliografia.

1. Bananeira. 2. Iniciadores. 3. Monociclo. 4. Doença. 5. Parâmetros Monocíclicos. 6. Hifas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD- 634.7729443

**HERMINIO SOUZA ROCHA**

**EPIDEMIOLOGIA DA SIGATOKA AMARELA, QUANTIFICAÇÃO DE  
FENÓIS EM VARIEDADES DE BANANEIRAS E ANÁLISE  
FILOGENÉTICA DE ISOLADOS DE *Mycosphaerella musicola*  
UTILIZANDO MICROSSATÉLITES**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Curso de  
Doutorado em Agronomia, área de concentração  
em Fitopatologia, para obtenção do título de  
“Doutor”.

APROVADA em 17 de dezembro de 2008

|                                      |                |
|--------------------------------------|----------------|
| Dr. Zilton José Maciel Cordeiro      | Embrapa/CNPMPF |
| Profª Dra. Antônia dos Reis Figueira | UFLA           |
| Prof. Dr. Eduardo Alves              | UFLA           |
| Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza     | UFLA           |
| Prof. Dr. Moacir Pasqual             | UFLA           |

Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais, Herminio e Neyde, que sempre me apoiaram,  
e me encorajaram a seguir em frente e lutar pelo sucesso,

À minha esposa Jane, pelo amor, incentivo e companheirismo e  
aos meus queridos filhos Fernanda e Pedro, que são  
os amores de minha vida,

**DEDICO**

Aos meus queridos Paulo, Diva, Gustavo e Alípio,  
Ao Sr. Arnaldo Roldão Filho e sua esposa Sra. Georgina  
À minha querida irmã Virgínia,  
Aos amigos

**OFEREÇO**

## **BIOGRAFIA**

Herminio Souza Rocha, filho de Herminio Maia Rocha e Neyde Maria de Souza Rocha, nasceu em 07 de abril de 1967, na cidade de Itabuna – BA.

Graduou-se em Engenharia Agrônômica, pela Escola Superior de Agricultura de Lavras – ESAL, no ano de 1994.

Trabalhou na empresa CAMPO – CPA, durante o período de 1994 - 2005.

Em 1997, cursou durante seis meses, a especialização em biotecnologia, com ênfase na micropropagação de espécies lenhosas, no National Institute of Agrobiological Resources – NIAR, em Tsukuba, Japão.

Durante o período de 2003 a 2005, realizou o curso de mestrado em Agronomia/Fitotecnia, na Universidade Federal de Lavras – MG.

Em fevereiro de 2005, ingressou no curso de Doutorado em Agronomia/Fitopatologia, na Universidade Federal de Lavras – MG.

Atualmente é Gerente de Produção da empresa SBW do Brasil Agrifloricultura LTDA., em Holambra – SP.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por todo auxílio, pela constante presença e incentivo em todos os momentos difíceis.

A Nossa Senhora pela ajuda e acompanhamento de meus passos.

Ao meu São Judas Tadeu, que sempre me atendeu em minhas preces, e sempre me auxiliou, nos momentos de dificuldade.

Ao meu orientador e grande amigo Prof. Dr. Edson Ampélio Pozza, pela valiosa contribuição e segurança que sempre me transmitiu nos momentos e incertezas.

Ao meu grande amigo e mestre Dr. Zilton José Maciel Cordeiro, a quem eu sempre admirei pelo grande conhecimento, ensinamentos, sinceridade, ética e acessibilidade em todos os momentos.

À Profa. Dra. Antônia dos Reis Figueira pela inestimável colaboração, empenho e dedicação para que este trabalho pudesse ser concretizado

Ao amigo de todas as horas, Cleilson Uchoa, pela incondicional amizade, auxílio em todas as avaliações e companheiro de estudos.

Ao Carlos Rezende por todo auxílio, empenho e dedicação nas avaliações e experimentos sob condições controladas.

À Valquíria Camargos, por toda dedicação e enorme esforço no auxílio aos trabalhos com marcadores de Microssatélite.

Ao amigo Ângelo Barbosa Sussel, pelas sugestões e atenção e disposição em me auxiliar em todas as avaliações e interpretações de resultados.

Aos grandes amigos, Sr. Arnaldo Roldão Filho e Sra. Georgina pela exemplar acolhida em sua propriedade, durante todas as avaliações, tendo possibilitado a realização deste trabalho em Coronel Pacheco – MG.

Ao Dr. Gilberto, pela atenção em nos auxiliar na montagem e programação da estação climatológica computadorizada.

Aos amigos Ruth, Eliane, Vladimir, Bruno e Douglas, por terem estado sempre à disposição para auxiliar no que fosse preciso.

À Silvia, Ellen, Daniel, Pedro, Alex, Frederico e todos os demais colegas do Departamento.

Ao amigo Paulo Octávio, pelos incentivos e auxílio sempre.

Ao Prof. Dr. Eduardo Alves e a Heloisa, pelos ensinamentos e oportunidade de utilizar as instalações do Lab. de Microscopia Eletrônica do DFP/UFLA.

Ao Prof. Dr. Paulo Estevão de Souza por toda colaboração e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Mário Lúcio, pela atenção, ensinamentos e total disponibilidade para auxiliar nos trabalhos bioquímicos e nas inoculações sob ambiente protegido.

Ao Prof. Dr. Ricardo Magela pelo incentivo de sempre e valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Moacir Pasqual, pela oportunidade de poder trabalhar no Laboratório de Cultura de Tecidos, sob sua coordenação, pelo exemplo de profissionalismo e pela constante simplicidade e espírito de equipe.

À Cida, por tamanho auxílio nas análises estatísticas, confecção de projetos, e por todas as palavras de incentivo sempre.

Aos caríssimos amigos Claret e Vantuil, funcionários do Laboratório de Cultura de Tecidos, pela assistência, amizade e presteza.

Ao amigo Dr. Miguel Angel Dita Rodrigues, pela atenção, companheirismo e por todas as palavras de incentivo.

Ao grande amigo Dr. Sebastião de Oliveira e Silva, que sempre me incentivou e me proporcionou os maiores progressos profissionais na minha carreira.

Ao Dr. Lair, pelo apoio, incentivo e valiosas sugestões.



À Universidade Federal de Lavras, pelo suporte técnico e pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Clínica Fitopatológica do DFP/UFLA, pela disponibilidade de todos os recursos para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão de bolsa de estudos durante o curso.

À maravilhosa cidade de Lavras pela calorosa acolhida e pela excelente qualidade de vida que proporcionou a mim e meus familiares.

Aos meus queridos Paulo, Diva, Gustavo e Alípio pela incondicional amizade, amor, companheirismo, incentivo, e principalmente pelos belos exemplos de vida e simplicidade que sempre serão. Serei eternamente grato por tudo o que fizeram por nós.

Ao meu grande amigo Jônio Marques, que sempre me incentivou e me apoiou nos momentos de incertezas.

Ao meu compadre e irmão Rodrigo Santana, pela incondicional amizade e apoio em todos os momentos de minha vida.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em minha vida acadêmica, e acreditaram na realização deste trabalho. À minha irmã Virgínia pelas palavras de incentivo sempre.

À minha querida esposa e meus filhos do coração, pela companhia, compreensão e motivação em todos os instantes.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADO POR TUDO!**

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| RESUMO.....  | i   |
| ABSTRACT.....  | iii |
| CAPÍTULO 1.....  | 1   |
| REFERENCIAL TEÓRICO.....   | 1   |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL.....   | 2   |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO.....   | 5   |
| 2.1 Histórico da Sigatoka amarela da bananeira.....  | 5   |
| 2.2 Biologia e Sintomatologia.....   | 6   |
| 2.3 Epidemiologia.....   | 8   |
| 2.4 Parâmetros monocíclicos.....   | 10  |
| 2.5 A produção de conídios e ascósporos, e sua relação com fatores climáticos.....         | 12  |
| 2.6 Variabilidade genética em <i>Mycosphaerella musicola</i> .....                         | 14  |
| 2.7 Dinâmica da infecção.....  | 17  |
| 2.8 - Dispersão dos esporos de <i>Mycosphaerella musicola</i> pelo vento.....              | 19  |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 23  |
| CAPÍTULO 2.....  | 30  |
| ANÁLISE DA DINÂMICA TEMPORAL DA SIGATOKA AMARELA E AEROBIOLOGIA DE ESPOROS.....            | 30  |
| 1 RESUMO.....  | 31  |
| 2 ABSTRACT.....  | 32  |
| 3 INTRODUÇÃO.....  | 32  |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 35  |
| 4.1 Variáveis utilizadas na avaliação do progresso da doença.....                          | 36  |
| 4.2 Registro das variáveis ambientais.....   | 39  |
| 4.3 Monitoramento da concentração de esporos da Sigatoka amarela na área experimental..... | 40  |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 42  |

|   |    |
|---|----|
| 5.1- Associação dos picos de severidade às concentrações de esporos e variáveis climáticas. ....              | 42 |
| 5.2- Tempo de Desenvolvimento da Enfermidade (TDE). ....  | 49 |
| 5.3- Correlação entre as variáveis climáticas e os índices de infecção .....                                  | 52 |
| 5.4- Curvas de Progresso da doença .....  | 54 |
| 5.5- Monitoramento da concentração de conídios e ascósporos de <i>Mycospaherella musicola</i> .....           | 59 |
| 6. CONCLUSÕES.....  | 66 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 67 |
| CAPÍTULO 3.....   | 69 |
| AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MONOCÍCLICOS DA SIGATOKA AMARELA, LIGNINA E FENOIS TOTAIS, EM MUDAS DE BANANEIRA..... | 69 |
| 1 RESUMO.....   | 70 |
| 2 ABSTRACT.....   | 71 |
| 3 INTRODUÇÃO.....   | 72 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS.....   | 75 |
| 4.1 Obtenção do patógeno isolado .....  | 75 |
| 4.2 Indução da esporulação para obter o inóculo.....  | 76 |
| 4.3 Teste de patogenicidade.....  | 76 |
| 4.4 Inoculações em plantas mantidas em câmaras úmidas .....   | 77 |
| 4.5 Variáveis respostas avaliadas.....  | 78 |
| 4.5.1 Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS):.....   | 78 |
| 4.5.2 Área abaixo da curva de progresso do número de lesões (AACPNL): .....                                   | 79 |
| 4.5.3 Período de incubação (PI): .....  | 81 |
| 4.5.4 Período de latência (PL): .....   | 81 |
| 4.5.5 Período de desenvolvimento da doença (PDD):.....  | 81 |
| 4.5.6 Preparo de extratos foliares para avaliação de lignina solúvel e fenóis solúveis totais: .....          | 82 |
| 4.5.7 Determinação de lignina solúvel .....   | 82 |
| 4.5.8 Determinação de fenóis solúveis totais.....   | 83 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 84 |
| 5.1- Área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD)...84                                  |    |

|  |      |
|--|------|
| 5.2- Área abaixo da curva de progresso do número de lesões (AACPNL).....   | 87   |
| 5-3 Período de incubação (PI). .....   | 89   |
| 5.4 Período de Latência .....  | 91   |
| 5.5 Período de Desenvolvimento da Doença .....   | 93   |
| 5.6 Dinâmica da concentração de Fenóis totais e Lignina .....  | 94   |
| 6 CONCLUSÕES.....  | 99   |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 100  |
| CAPÍTULO 4.....  | 103  |
| ANÁLISE FILOGENÉTICA POR MARCADORES MICROSATÉLLITES DE<br>ISOLADOS DE <i>Mycosphaerella musicola</i> ORIGINÁRIOS DAS DIVERSAS<br>REGIÕES PRODUTORAS DE BANANA NO BRASIL..... | 103  |
| 1 RESUMO.....  | 104  |
| 2 ABSTRACT.....  | 105  |
| 3.<br>INTRODUÇÃO.....  | 1056 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 109  |
| 4.1. Coleta de isolados .....  | 109  |
| 4.2. Extração de DNA.....  | 111  |
| 4.3 Iniciadores (Primers) de Microssatélite .....  | 112  |
| 4.4 Análise dos dados .....  | 112  |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....   | 114  |
| 6. CONCLUSÕES.....   | 122  |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 123  |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....  | 125  |

## RESUMO

ROCHA, Hermínio Souza. **Epidemiologia da sigatoka amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microssatélites.** 2008. 124 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Sendo *Mycosphaerella musicola*, agente causal da Sigatoka amarela, um fungo de reprodução sexuada e de natureza heterotática, e considerando a diversidade climática nas regiões produtoras de banana no Brasil, é de se esperar uma ampla variabilidade genética dos isolados brasileiros, com virulências e agressividades distintas. Para uma melhor caracterização da Sigatoka amarela (*Mycosphaerella musicola*) no Brasil, é necessário que alguns aspectos sejam elucidados, principalmente aqueles relacionados à análise epidemiológica e da variabilidade genética dos isolados brasileiros. Assim, procederam-se estudos de análise temporal e da epidemia da Sigatoka amarela em bananal localizado em Coronel Pacheco- MG, com a variedade ‘Saquarema’ (AAA), tendo sido avaliadas as correlações das variáveis climáticas com as variações no progresso da doença e com as flutuações de esporos da doença no ar. Foram identificados dois picos de máxima severidade da doença ao longo do ano, tendo o primeiro ocorrido durante a estação chuvosa, e associado principalmente à elevada concentração de conídios no ar e o segundo ocorreu no auge da estação seca do ano, sendo provocado principalmente pela alta concentração de ascósporos. O melhor ajuste do modelo da curva de progresso da doença foi verificado para o modelo monomolecular. As variáveis climáticas mais associadas ao progresso da doença foram a pluviosidade, Umidade Relativa e o molhamento foliar. Na estação chuvosa o progresso da doença acompanha o desenvolvimento vegetativo do hospedeiro, sendo verificados os menores períodos para o desenvolvimento de novas lesões. Na estação seca, as lesões intensificam a severidade da doença em função do menor desenvolvimento vegetativo do hospedeiro. Para melhor caracterização do isolado de Coronel Pacheco – MG, procederam-se avaliações de parâmetros monocíclicos da Sigatoka amarela, e a dinâmica das concentrações de lignina e fenóis totais em mudas de bananeira (‘Pacovan’; ‘Grande Naine’; ‘Caipira’ e ‘Prata Zulu’) inoculadas artificialmente em ambiente controlado. Os menores períodos de incubação e de desenvolvimento da doença foram obtidos na temperatura de 24° C, não tendo se comportado diferentemente dos relatos na literatura. Para as variedades de bananeira testadas, os níveis constitutivos de fenóis totais não se alteram como resposta à infecção por *Mycosphaerella musicola*. ‘Caipira’ e ‘Prata Zulu’ apresentam maior lignificação da parede celular após cinco dias da inoculação, o que denota ser este, um dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência. A análise

filogenética foi realizada com um conjunto de 10 diferentes marcadores Microssatélites em 11 isolados de *Mycosphaerella musicola* originários das diversas regiões produtoras de banana no Brasil. Dois grandes grupos foram formados no dendrograma, sendo um composto principalmente pelos isolados das Regiões sul, Sudeste e Centro-Oeste, no qual situou-se o isolado de Coronel Pacheco – MG e o outro composto principalmente pelos isolados da Região Nordeste do Brasil. Observou-se o potencial do par de primers Mm SSR 34 para a diferenciação entre a Sigatoka amarela e Sigatoka negra, os quais poderiam vir a tornarem-se marcadores moleculares para utilização em laudos fitossanitários.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Edson Ampélio Pozza – UFLA (Orientador), Zilton José Maciel Cordeiro – Embrapa CNPMF (Co-Orientador).

## ABSTRACT

ROCHA, Herminio Souza. **Epidemiology of yellow Sigatoka, phenols quantification in banana varieties and phylogenetic analysis of *Mycosphaerella musicola* isolates using microsatellites.** 2008. 124 p. Thesis (Doctor Degree in Plant Pathology) – Lavras Federal University, Lavras.

Due to the hetherothalic nature and sexual reproduction of the fungus *Mycosphaerella musicola*, the causal agent of yellow Sigatoka, and considering the climatic diversity of the Brazilian banana producing regions, a wide genetic variability is expected among the Brazilian isolates with distinct virulence and aggressiveness. For a better characterization of yellow Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*) in Brazil, it is necessary that some aspects may be elucidated, mainly those related to the epidemiological analysis and to the genetic variability of the Brazilian isolates. Hence, studies concerning the temporal analysis and epidemiology of yellow Sigatoka were performed in a banana plantation localized in Coronel Pacheco- in the State of Minas Gerais, with the ‘Saquarema’ (AAA) variety, having been evaluated the correlations between climatic variables with the alterations in the disease progress and also with the fluctuations of the fungus spores in the air. Two peaks of maximum severity of the disease were identified along the year, with the first occurring during the rainy season, and mainly associated to the high conidia concentration in the air, and the second having occurred in the middle of the draught season, being mainly produced by the high ascospore concentration. The best adjustment of the disease progress curve was verified for the monomolecular model. The climatic variables mostly associated to the disease progress were rain, relative humidity and leaf wetness. During the rainy season the disease progress followed the host vegetative development, having been observed the shortest lesion development periods for the new lesions. During the draught season, the lesions intensified the disease severity due to a lower vegetative development of the host. For a better characterization of the Coronel Pacheco – MG isolate, evaluations concerning the monocycle of yellow-Sigatoka were carried out, as well as the dynamics of lignin and the concentration of total phenolics in banana plantlets (‘Pacovan’; ‘Grande Naine’; ‘Caipira’ and ‘Prata Zulu’) artificially inoculated under controlled environment. The shortest incubation periods and disease development periods were obtained under 24° C, with no distinct behavior than the ones already related in literature. For the banana varieties tested, the constitutive total phenolic levels were not altered as a response to the infection by *Mycosphaerella musicola*. ‘Caipira’ e ‘Prata Zulu’ presented the highest lignification of the cell wall after five days of inoculation, which denotes this biochemical mechanism, as being involved in resistance. The phylogenetic analysis was done with a group of 10 different microsatellite markers in 11

*Mycosphaerella musicola* isolates from a diversity of Brazilian banana producing regions along Brazil. Two major groups were generated in the dendrogram, with one being composed mostly by isolates from the South, South-East and Centre-West Regions, in which was localized the isolate from Coronel Pacheco – MG and the other mainly composed by the isolates from the North-East region of Brazil. One specific pair of primers Mm SSR 34 demonstrated high potential to differentiate both black and yellow Sigatokas, which may become powerful molecular marker to be used in phytosanitary official reports.<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Guidance Committee: Edson Ampélio Pozza – UFLA (Supervisor), Zilton José Maciel Cordeiro – Embrapa CNPMF (Co-Supervisor).



## **CAPÍTULO 1**

### **REFERENCIAL TEÓRICO**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A bananicultura é uma atividade agrícola de elevada importância sócio econômica, servindo como fonte de alimento básico para as populações pobres em diversos países, mas é também consumida diariamente em todas as camadas sociais da população brasileira. A banana ocupa o segundo lugar em volume de frutas produzidas no Brasil, que é o segundo maior produtor do mundo, com uma produção de 6,7 milhões de toneladas, numa área cultivada de aproximadamente 527 mil ha, sendo superado apenas pela Índia. (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2008).

Por causa da natureza devastadora da Sigatoka negra, trabalhos mais recentes têm sido focados principalmente em *Mycosphaerella fijiensis*. Apesar do proeminente papel de *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella musicola* ainda se constitui como o grande patógeno em altitudes maiores e também em áreas onde cultivares suscetíveis à Sigatoka amarela vêm sendo cultivadas. No Brasil, apesar da ocorrência da Sigatoka negra ter sido verificada desde 1998, observa-se que a sua disseminação para novas áreas não vem ocorrendo de forma contínua, como era de se esperar. Muito provavelmente isso se deve às condições climáticas desfavoráveis ao progresso desta doença, que é a mais danosa para a bananicultura em todo o mundo. Em contrapartida, a Sigatoka amarela, que é endêmica em todas as regiões produtoras, continua a causar danos que chegam a comprometer em média 50% da produção, se constituindo em um dos principais problemas fitossanitários onde se observam variáveis climáticas diferentes daquelas regiões afetadas pela Sigatoka negra.

Os primeiros relatos oficiais da Sigatoka negra no Brasil datam de 1998, na fronteira do Estado do Amazonas com a Colômbia. Daí em diante, diversos outros relatos foram registrados nos Estados das Regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Em 2004, Minas Gerais teve o primeiro registro da Sigatoka

negra nas regiões sul e Zona da Mata, incluindo-se o Município de Coronel Pacheco. Entretanto, após realizadas inúmeras coletas, isolamentos e análises por PCR para identificação da espécie, não se comprovou a presença da doença nos bananais de Coronel Pacheco, mas somente a Sigatoka amarela, apresentando uma agressividade similar à que se observa para a Sigatoka negra.

Inúmeros relatos na literatura apontam uma relação direta entre a formação, distribuição e germinação tanto de conídios quanto de ascósporos com a ocorrência de períodos de elevada umidade relativa, seja esta variável associada à períodos chuvosos e/ou à ocorrência de fortes orvalhos, resultando em eventos epidêmicos de Sigatoka amarela.

A outra variável climática tão importante quanto a umidade relativa, para a promoção de epidemias da Sigatoka amarela é a temperatura. Via de regra, a doença alcança o seu pico de máxima atividade durante os períodos de ocorrências de temperaturas baixas e máxima umidade relativa Wardlaw (1961).

Neste contexto, a avaliação do progresso da Sigatoka amarela, correlacionada com as variáveis climáticas e acompanhada por estudos de variabilidade genética de diferentes isolados, constitui-se em importantes linhas de pesquisa, visto que a característica heterotática de *Mycosphaerella musicola*, promove a variabilidade natural do patógeno, conferindo ao mesmo maior adaptabilidade às condições ambientais adversas.

Desta forma, este trabalho, desenvolvido em uma lavoura localizada no Município de Coronel Pacheco, MG, com elevadas taxas de severidade da doença, e também sob condições controladas em câmaras de crescimento e em laboratório teve como objetivos avaliar:

- O progresso da doença ao longo do ano, correlacionado com as variáveis climáticas, de forma a se testar o ajuste de modelos empíricos;
- A variação na concentração de esporos de *Mycosphaerella musicola* ao longo do ano;

- A determinação de parâmetros monocíclicos em plantas artificialmente inoculadas com o isolado de *Mycosphaerella musicola* de Coronel Pacheco, MG, e

- A variabilidade genética em diferentes isolados de *Mycosphaerella musicola* do Brasil por meio de marcadores de microssatélite.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Histórico da Sigatoka amarela da bananeira

A Sigatoka amarela, também denominada mal-de-Sigatoka e doença da mancha das folhas em bananeiras, causada por *Mycosphaerella musicola* Leach (Stat. Conid. *Cercospora musae* Zimm.) foi observada pela primeira vez próximo a Biotenzorg, em Java por Zimmermann em 1902. O relato seguinte da ocorrência da doença veio do distrito de Sigatoka na ilha de Viti Levu, em Fiji, no ano de 1912 (Philpott & Knowles, 1913). Foi naquele distrito em que se observou pela primeira vez, a doença na sua forma de epidemia, resultando no nome popular ‘Doença de Sigatoka’ ou simplesmente ‘Sigatoka’, tendo persistido até então (Knowles, 1916). Subseqüentemente, a doença foi identificada na Ásia, África, Américas Central e do Sul e Caribe, tendo rapidamente se tornado uma das mais importantes doenças para a cultura da bananeira (Meredith, 1970).

A primeira descrição sucinta do fungo associado com a Sigatoka foi feita por Zimmermann (1902), como uma nova espécie de *C. musae* Zimm. Durante quase quarenta anos após a sua descoberta, o fungo foi conhecido na sua forma imperfeita ou assexuada (conidial). Somente na década de 1930 Leach (1941), trabalhando na Jamaica, descobriu a forma perfeita (Teleomorfo) de *C. musae*, um fungo da classe dos Ascomicetes, para o qual a denominação de *Mycosphaerella musicola* foi atribuída.

O desenvolvimento da epidemia em Fiji foi atribuído ao cultivo continuado de variedades suscetíveis, às condições de cultivo e variáveis ambientais favoráveis ao patógeno. Precisamente não se sabe como ou quando a Sigatoka foi introduzida na região do Caribe, ou se a sua disseminação ocorreu a partir de um ou vários focos de infecção, porém durante o período de dois a três anos desde a primeira ocorrência em Trinidad, já havia aparecido com

intensidades epidêmicas em muitas das ilhas e áreas territoriais das Américas Central e Sul, tendo assumido uma importância econômica de primeira classe, devido aos efeitos destrutivos verificados em plátanos (Wardlaw, 1961; 1939).

Stover (1972) relata que a ocorrência no Caribe e na América Central, se observou em 1933, tendo sido constatada no México, Guiana e restante da América Central, em 1937. No Equador foi relatada durante a década de 1950. O primeiro registro na África ocorreu em 1938, em Uganda, e a doença não foi percebida em sua distribuição generalizada até a década de 1950 (Simmonds, 1966).

No Brasil, a Sigatoka amarela foi constatada, pela primeira vez, no Estado do Amazonas, em 1944, (Kimati & Galli, 1980), estendendo-se posteriormente por todos os estados brasileiros. *M. musicola* encontra-se disseminado em todas as regiões produtoras de banana do Brasil e do mundo, provocando consideráveis prejuízos na produção de frutos (Fourè, 1994).

A mudança de posição quanto ao grau de importância, entre a Sigatoka – amarela e a Sigatoka negra, está em curso, mas no caso brasileiro, na prática, isso ainda não ocorreu. A Sigatoka amarela continua sendo de grande importância nas regiões de bananicultura mais competitivas como é o caso do Nordeste, Sudeste e Sul. Entre os Estados da Região Sudeste a exceção é São Paulo, onde a Sigatoka negra já prevalece sobre a amarela, já ocorrendo aumento no número de aplicações de defensivos, mas nos demais Estados onde a doença foi constatada o avanço tem sido relativamente lento (Cordeiro, 2007).

## **2.2 Biologia e Sintomatologia**

O mal-de-Sigatoka é causado por *Mycosphaerella musicola*, Leach, que é a forma perfeita ou sexuada do fungo, enquanto *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton corresponde à forma imperfeita ou assexuada. Três tipos de frutificações são produzidas nas manchas foliares ou manchas de Sigatoka em

bananeiras: esporodóquios, espermogônio e peritécios (Stover, 1964). O processo sexuado no gênero *Mycosphaerella* envolve a formação de espermogônios, que produzem gametas masculinos, as espermásias e o órgão sexual feminino, uma hifa espiralada, que é formada no interior de jovens ascocarpos, denominadas de tricogines (Wardlaw, 1961). Simmonds (1933) observou que espermogônios eram encontrados mais frequentemente por volta do final do ano em folhas manchadas e secas, ainda aderidas aos pseudocaulis. Em escala macroscópica, os espermogônios, de alguma forma, assemelham-se às pontuações negras formadas pelas frutificações conidiais, porém com um formato mais bem delimitado de pontuação. Estas estruturas podem ser formadas em ambas as superfícies foliares, porém com maior predominância na abaxial. Sob microscópio de luz, os espermogônios, são pequenas frutificações negras em formato de frascos, imersas, que surgem no interior de uma base estromática de velhas frutificações conidiais ou independentemente. As espermásias, que são formadas em longas cadeias são bastante minúsculas, oblongas e hialinas, com formato semelhante às bactérias, e podem ser visualizadas sendo expelidas a partir de um ostíolo ou poro no ápice dos espermogônios (Simmonds, 1933). Estão envolvidos, portanto, dois tipos de esporos no aparecimento da doença. O esporo sexuado que é o ascósporo, e o assexuado, que é o conídio (Cordeiro, 1997).

Conídios são produzidos mais ou menos continuamente em climas úmidos, sendo transmitidos pela lavagem da superfície foliar provocada pelas chuvas ou orvalho, explicando assim, as infecções severas algumas vezes observadas nos perfilhos situados sob as plantas mais adultas e infectadas. Os ascósporos porém, produzidos nas mesmas lesões onde foram liberados os conídios anteriormente, surgem mais tardiamente, sendo ejetados forçadamente a partir dos peritécios por ocasião de climas úmidos, ou mesmo em climas secos porém com ocorrências de orvalhos pesados (Simmonds, 1966).

No que se refere aos sinais do patógeno, Brun citado por Stover (1972), classificou o desenvolvimento das lesões em cinco estágios: I- Pintas amareladas com menos de 1mm de comprimento aparecem na superfície foliar; II- As pintas evoluem para estrias de coloração amarelada, medindo aproximadamente 3-4mm por 1mm de largura; III- As estrias tornam-se mais largas e compridas, com margens não bem definidas que se misturam com a coloração normal das folhas e ao final tornam-se marrom claro; IV- Manchas com contorno bem definido, centro marrom e halo amarelado ao redor da lesão. Neste estágio inicia-se a produção de esporodóquios e pode haver conídios presentes nas lesões; V- As manchas completamente desenvolvidas, apresentam o centro com coloração cinza e bordas escuras a preta. Em alguns casos, existe a formação de halo clorótico entre a lesão e o tecido normal da folha.

As lesões do mal-de-Sigatoka apresentam-se em formatos distintos, de acordo com a idade da planta hospedeira infectada. McGahan & Fulton (1965) observaram que em folhas de plantas jovens, as lesões possuem formato elíptico e são maiores e mais largas do que nas plantas adultas, onde as lesões apresentam-se em formato linear .

Apesar dos severos danos ao limbo foliar, Leach (1946) afirma que a doença não afeta o desenvolvimento vegetativo em absoluto. Entretanto, Simmonds (1966) reporta a redução no tamanho dos cachos e dos frutos, presumivelmente pela redução da área fotossinteticamente ativa.

### **2.3 Epidemiologia**

Experimentos em epidemiologia avaliam primordialmente o monociclo pela caracterização de seus componentes. Dentre os componentes de maior importância pode-se citar o período de incubação e o período de latência, ou seja, o período de tempo compreendido entre a inoculação e o aparecimento dos



sintomas e o período de tempo compreendido entre a inoculação e a produção de esporos, respectivamente (Parlevliet, 1979).

De acordo com Gäumann (1951), as condições necessárias para que uma epidemia possa ocorrer são: acúmulo de indivíduos suscetíveis e presença de hospedeiros alternativos, um patógeno com elevada capacidade infectiva, capacidade de multiplicação e dispersão de seus propágulos, sem restrições para seu desenvolvimento e condições meteorológicas ótimas para o desenvolvimento do patógeno.

Kranz (1974) afirma que epidemiologia é o estudo de populações de patógenos em populações de hospedeiros resultando em doença, sob a influência do ambiente e interferência humana. Epidemia, neste caso, é utilizada como sinônimo de progresso da doença, que pode, mas não necessariamente corrobora com a clássica definição de epidemia, ou seja, o acréscimo e decréscimo de doença dentro de um limitado período (Gäumann, 1951).

Epidemiologia correlaciona populações de patógenos com as das plantas hospedeiras, ocorrendo simultaneamente em um ambiente em desenvolvimento, ou seja, o clássico triângulo de doença. Como resultado, a epidemiologia também trata da genética de populações, da resistência dos hospedeiros e do potencial evolucionário da população de patógenos de produzir raças mais virulentas às variedades de hospedeiros e resistentes a pesticidas. Epidemiologia deve, entretanto, levar em consideração outros fatores bióticos e abióticos, tais como um ambiente fortemente influenciado pela atividade humana, já que está diretamente relacionada ao manejo de doenças (Agrios, 2004).

Por razões nem sempre compreendidas, em diferentes países, o tempo necessário para que uma nova infecção pela Sigatoka amarela alcançasse intensidades epidêmicas variou consideravelmente. No Caribe, por exemplo, este processo foi bem rápido. Por outro lado, em Camarões, a doença permaneceu sob observação por muitos anos, antes que as pulverizações se

tornassem necessárias, porém após o início desta prática de manejo, a doença persistiu até atingir o estágio de epidemia (Wardlaw, 1961).

No Equador, Tollenaar (1955), relata que no prazo de dois anos, a doença tornou-se tão intensa, em uma plantação, que a produção comercial não pode mais ser preservada. A disseminação da doença para novas localidades, ao longo de estradas, por exemplo, ocorre aparentemente pela dispersão de ascósporos, ao passo que a sua intensificação dentro de uma localidade, deve-se predominantemente à intensa produção de conídios. Novas infecções são mínimas ou até mesmo não ocorrem durante as estações secas, proporcionando um aspecto de sanidade ao final destes períodos, com folhas novas desenvolvendo-se completamente livres de lesões. Entretanto, sempre existem as folhas velhas já necrosadas que apresentam-se altamente afetadas pelas lesões, as quais produzem ascósporos em abundância logo no início da estação chuvosa. Este período é notadamente marcado pela intensificação da doença dentro das áreas infectadas, e também por novas infecções de plantios mais recentes, situados a alguma distância das áreas mais velhas.

#### **2.4 Parâmetros monocíclicos**

O tempo entre a infecção e o surgimento dos sintomas varia de acordo com as condições ambientais e a suscetibilidade da planta (Meredith & Lawrence, 1969). Em banana estima-se que o tempo para ocorrer a infecção das folhas seja coincidente com a emergência de novas folhas a partir do ápice do pseudocaule (Stover, 1980). Em condições ideais na Costa Rica, num hospedeiro suscetível, o período de incubação pode ser de apenas 13–14 dias, enquanto sob condições de clima desfavorável, a duração do período de incubação pode estender-se por até 35 dias (Marin et al., 2003).

Marin et al. (2003) definem período latente, como o tempo necessário para o fungo iniciar a produção de lesões com pseudotécios maduros e

ascósporos, principais fontes de inóculo em *Mycosphaerella fijiensis*. O período de latência também varia com as condições climáticas, suscetibilidade do hospedeiro e com a intensidade da infecção.

Por exemplo, o tempo entre a emissão de uma nova folha até o aparecimento do sintoma de lesão madura sob as mesmas condições naturais, para a cultivar Curraré, banana para cozinhar do subgrupo plátanos, foi de 44 dias comparado com 34 dias para a cultivar Valery, do subgrupo Cavendish (Gauhl, 1994).

Vicente (1983) observou que a concentração de inóculo (conídios e ascósporos) exerce influência sobre o período de incubação do mal-de-Sigatoka. Altas concentrações de suspensão de conídios de *M. musicola* reduziram em até 50% o período de incubação da doença, quando comparado com as concentrações de inóculo mais baixas. Observações semelhantes foram feitas por Stover (1972).

Variedades de bananeiras suscetíveis a *M. musicola* e *M. fijiensis* apresentam menor período de incubação e maior número de manchas e esporulação nas folhas do que outras variedades resistentes. Com o aumento do nível de resistência, aumenta-se também o tempo de transição entre os estádios de evolução da doença. Em algumas variedades resistentes, a evolução dos sintomas é interrompida nos primeiros estádios (Stover, 1972; Meredith, 1970; Fouré, 1985; Fouré et al., 1990).

As variáveis normalmente utilizadas para avaliação da susceptibilidade de variedades de bananeira à *M. fijiensis* são o período de incubação, evolução dos sintomas, intensidade da esporulação sexuada e assexuada, germinação de esporos e eficiência de penetração (Fouré et al., 1990; Mourichon et al., 1987).

## **2.5 A produção de conídios e ascósporos, e sua relação com fatores climáticos**

A influência do clima e outros fatores sobre a produção dessas frutificações foi estudada, com detalhes, pela primeira vez, na Jamaica, por Leach (1946). Ele verificou que espermatogônias eram mais abundantes na face abaxial das folhas e em lesões apresentando peritécios. Peritécios foram observados em abundância em áreas altamente infestadas, nas lesões que não apresentavam uma margem bem definida. A produção de ascósporos era sazonal, declinando acentuadamente durante épocas do ano em que se verificava um clima frio e seco.

Na República dos Camarões, Price (1960) observou que os danos por *Sigatoka* foram maiores no início e no final das estações chuvosas, e ele atribuiu o fenômeno ao aumento na produção de ascósporos, em função da alternância entre períodos de molhamento intenso e de seca, nos tecidos foliares infectados.

Em Honduras, Fulton (1962), utilizando armadilhas de captura de esporos, encontrou poucos ascósporos durante os meses secos (março-abril). A principal descarga de ascósporos ocorreu entre os meses de junho-agosto e junho-outubro, em dois anos consecutivos, sendo dependente da ocorrência de chuvas. Os períodos em que ocorreram os picos de descarga de ascósporos foram entre 6:00 h (PM) e 3:00h (AM).

Stahel (1937) observou que conídios nunca são formados sobre os esporodóquios, em condições de alta umidade relativa por si só, mas somente se houver um filme de água livre, resultante de uma fina e constante chuva ou pela deposição de orvalho. Calpouzos (1955) observou que as esporulações só ocorriam sob umidade relativa por volta de 98% ou mais, e também se houvesse a presença de orvalho. Os conídios são primariamente formados na superfície adaxial de folhas não pulverizadas, e só ocorrem durante a noite (Wardlaw, 1961). Calpouzos (1955), afirma que a disseminação dos conídios somente

ocorre pela ação da chuva ou pelo orvalho, e que o vento não é efetivo na remoção de esporos de *C. musae* da superfície de uma mancha na folha.

Nas pontuações primárias, de coloração marrom, ocorre a formação abundante de conídios em pequenos acérvulos (conidióforos) na face abaxial das folhas. Entretanto, esses acérvulos (conidióforos) permanecem pequenos e subsequentemente desaparecem com o colapso do tecido. Posteriormente, os acérvulos (conidióforos) são encontrados em maior número e em tamanho maior, em lesões mais velhas com os centros de coloração cinza, na superfície adaxial. Sob condições adequadas de umidade, estas lesões podem produzir conídios continuamente durante 30 dias. Observações ao microscópio, permitem verificar que esses acérvulos (conidióforos), são distribuídos em linhas como pequenas pontuações negras, paralelas às nervuras secundárias. Os acérvulos (conidióforos) são formados nas câmaras subestomáticas e consistem de compactos conidióforos que crescem através dos poros para a superfície. Sob um filme de água, eles formam os conídios alongados, que são prontamente liberados. O melhor horário para coleta de conídios a partir das lesões foliares é bem cedo pela manhã, quando as folhas ainda estão cobertas por um filme d água (Wardlaw, 1961).

Os ascósporos são formados no interior dos ascos, os quais encontram-se contidos nos peritécios imersos no tecido foliar. Leach, (1941) afirma que a produção de ascósporos por lesão foliar seja consideravelmente inferior à de conídios. Por outro lado, as descargas de ascósporos podem ocorrer sob condições de alta umidade relativa, sem a necessidade de um filme d água sobre a lesão. Ascósporos podem assim, sofrer dispersão a partir das folhas baixas que não sofreram a ação do orvalho, enquanto os conídios não serão formados nestas. Ascósporos são corpos de frutificação dispersos pelo vento, enquanto a dispersão dos conídios é condicionada a presença d água. Em uma plantação em que ocorra uma alta proporção de folhas necrosadas, os ascósporos podem

alcançar as folhas vela em quantidades tão grandes quanto a de conídios. Ascósporos tendem a ser produzidos abundantemente com a proximidade do final da estação chuvosa e as folhas que apresentam necrose e são submetidas às alternâncias entre períodos de molhamento e seca, podem produzir até 17 descargas de ascósporos (Leach 1941, 1946).

## **2.6 Variabilidade genética em *Mycosphaerella musicola***

O conhecimento da estrutura genética e da evolução, nas populações de patógenos caracteriza-se como um importante auxílio no manejo e melhoramento genético para resistência às doenças de plantas. O principal objetivo nesses estudos é o fornecimento de informações sobre o grau e distribuição da variabilidade. Patógenos de plantas podem evoluir para quebrar a resistência total ou para erodir a resistência parcial. A evolução das populações de patógenos depende de mutações, recombinações, alterações nas frequências alélicas, do fluxo gênico e da pressão de seleção exercida pelo hospedeiro. Outro objetivo no estudo das populações de patógenos é avaliar a importância relativa de fatores de evolução sobre a variabilidade do patógeno. Tais informações podem permitir a modelagem e o teste dos efeitos de diferentes estratégias de manejo sobre a evolução dos patógenos (Carlier, 2003).

As informações sobre a diversidade genética e estrutura populacional de um dado patógeno são pré-requisitos para a definição de medidas de controle mais adequadas. Entretanto, poucos esforços têm sido dedicados aos estudos da genética da população de *M. musicola*. Tentativas de transferir marcadores moleculares de *M. fijiensis* para *M. musicola* não foram bem sucedidas. (Molina et al., 2001). Carlier et al., (1994) observaram fracos sinais após a hibridização de sondas de RFLP originárias de uma biblioteca genômica de *M. fijiensis*, com o DNA de *M. musicola*, e nenhum dos 11 pares de primers de microssatélite desenvolvidos por Neu et al. (1999) foram transferíveis para *M. musicola*.

Carlier et al. (1994), reportaram a caracterização e clonagem de 26 marcadores de microssatélite específicos para *M. musicola*.

Moreira et al. (2003), realizaram a caracterização genética de 24 isolados de *Mycosphaerella musicola* de diferentes regiões geográficas no Brasil, pela técnica de RAPD, tendo sido observada uma grande variabilidade genética entre os isolados, a qual teria sido atribuída ao grande número de variedades suscetíveis, à condição climática, à ocorrência de reprodução sexuada e também à natureza heterotática do fungo. Observa-se ainda o fato de a Sigatoka amarela estar presente no Brasil desde 1944. De acordo com Carlier et al., (2003), a natureza heterotática, tanto de *M. fijiensis* quanto de *M. musicola*, promovem as trocas de material genético, desempenhando um importante papel na geração da variabilidade genética dentro das populações dos fungos.

Em estudo avaliando a diversidade genética global entre populações de *Mycosphaerella musicola*, originárias da Indonésia, África, América Latina, Caribe e Austrália, Hayden et al., (2003), afirmam que a estrutura genética de populações de *M. musicola* é desconhecida, e verificaram uma maior variabilidade genética dos isolados provenientes da Indonésia quando comparados às demais localidades, tendo sido verificado também uma maior proximidade entre os isolados da África, América Latina e Caribe. Se as populações de *M. musicola* na África e América do Sul foram fundadas a partir de indivíduos da Austrália, como foi hipotetizado por Stover, então, se esperaria que estas populações apresentassem um maior número de alelos em comum. Efeitos fundadores\* podem ser observados nas populações como responsáveis por um menor número de alelos por loci, frequência de alelos modificada e uma reduzida diversidade dos genes, quando comparados à população original (Milgroom et al., 1992). De acordo com Nei et al., (1975), o grau de redução da

---

\* Efeito Fundador: refere-se à perda de variabilidade genética quando uma nova colônia é estabelecida por um pequeno número de indivíduos a partir de uma população maior.

diversidade genética de uma população fundada é dependente do número de indivíduos fundadores e da subsequente taxa de crescimento da população.

Marcadores moleculares tornaram-se importantes ferramentas para as investigações sobre a composição genética de populações de fungos (Groppe & Boller, 1997; Bucheli et al., 2001). Marcadores de RFLP foram desenvolvidos para o genoma de *M. fijiensis*, e foram utilizados para caracterizar as populações deste patógeno em escala global e regional (Carlier et al., 1994, 1996; Muller et al., 1997). Mais recentemente, marcadores de SSR foram estabelecidos para *M. fijiensis* (Neu et al., 1999) e para *M. musicola* (Molina et al., 2001), os quais, juntamente com métodos de perfis de DNA baseados em PCR, se constituem em um novo método para comparar a diversidade genética tanto de *M. fijiensis* quanto de *M. musicola* (Molina et al., 2002).

Considerando-se que existem algumas regiões do genoma que apresentam mais polimorfismo do que seqüências de cópia única, marcadores moleculares para essas regiões foram desenvolvidas. Um marcador potencial com qualquer seqüência de DNA é capaz de detectar polimorfismo, e em geral, quanto mais polimórfico, mais informações ele contém, tornando mais fácil detectar diferenças entre indivíduos. DNA não codificante é, sobre este ponto de vista, mais interessante do que DNA codificante, pois acumula mais mutações e não está sujeito à pressão seletiva. DNA não codificante é representado principalmente por DNA repetitivo, denominado microssatélite, minisatélite ou DNA satélite, dependendo do comprimento da seqüência (Testolin et al., 1996).

Microssatélites, também denominados de repetições de seqüência única (SSR), possuem seqüências curtas com 2 a 5 pares de bases, enquanto os minisatélites são repetições em tandem mais longas (STR), contendo aproximadamente 20 pares de bases. Habitualmente, estes dois tipos de marcadores são denominados de VNTRs (repetições em tandem em número variável (Dowling et al., 1996). As regiões flanqueadoras de loci de



Microsatélites são normalmente idênticas, de forma que primers podem ser facilmente desenvolvidos para ampliações por PCR para seleção por polimorfismo, em géis de agarose ou acrylamida, dependendo dos diferentes tamanhos dos alelos. Os loci de Microsatélites são ideais para análises da biologia e genética de populações, pois apresentam alelos codominantes e são amplificados por iniciadores específicos, o que os torna robustos, de fácil registro e prontamente disponíveis entre grupos de pesquisadores. Adicionalmente, eles tendem a ser mais polimórficos do que outros marcadores amplificáveis (Selkoe & Toonen, 2006).

Molina & Kahl (2002), afirmam que dentre as 25 diferentes técnicas moleculares, das quais muitas foram testadas com o gênero *Mycosphaerella*, os marcadores baseados em Microsatélites provaram ter o maior potencial. Estes marcadores elite, tais como, Sequence Tagged Microsatellite Sites (STMS), Simple Sequence Repeats (SSRs) ou Simple Sequence Length Polymorfisms (SSLP), têm sido frequentemente utilizados e continuarão a ser utilizados para a diagnose de isolados, para se estimar a diversidade genética em coleções, para a análise da estrutura de populações inteiras e suas interações, e também os efeitos das alterações impostas à essas populações por alterações no ambiente, tais como, novas variedades de hospedeiros, novos fungicidas e novas condições climáticas.

## **2.7 Dinâmica da infecção**

Infecções ocorrem através dos estômatos das folhas jovens, sendo a superfície abaxial muito mais importante do que a adaxial. Na Jamaica, infecções significativas ocorrem somente nas três folhas mais jovens, já em Queensland, na Austrália, as folhas quatro e cinco são igualmente infectadas (Simmonds, 1966, 1939). Leach, (1946) afirma que na Jamaica, as folhas mais

velhas são resistentes à infecção, como resultado da presença de antagonistas epifíticos e de materiais residuais pegajosos após a evaporação do orvalho.

Calpouzos (1955) registrou relevantes observações micológicas, tais como: (i) O crescimento das hifas ocorre em uma faixa de pH entre 3,0 e 8,0, sendo o ótimo verificado em pH 6,0; (ii) o crescimento de hifas pode ocorrer entre 11 a 30 °C, enquanto a germinação pode ser verificada em temperaturas até 35 °C; (iii) a formação de conídios ocorreu entre 11 a 30 °C; (iv) a germinação dos conídios é bastante lenta, sendo necessárias 24 h até que um tubo germinativo contendo pelo menos três células seja formado; (v) conídios germinados podem suportar as condições de clima quente e seco durante o dia, sobre a superfície foliar. Todas as evidências demonstram então que conídios geminados são principalmente ativos durante a noite.

Stahel (1937) observou que nos primeiros quatro a seis dias do crescimento do tubo germinativo dos conídios, o desenvolvimento é lento, e que após a penetração pelo estômato, uma estrutura conhecida como estomatopodium é formada sobre o poro. A colonização ocorre nos aerênquimas com a ramificação das hifas ocorrendo nos parênquimas paliçádicos, que tornam-se amarelados gradativamente. O fungo não efetua penetração no sistema vascular, e por isso os sinais iniciais são verificados entre duas nervuras secundárias paralelas.

Decorridos 22 a 24 dias após a inoculação, já são vistas listras de coloração marrom-clara, medindo aproximadamente 8 - 10mm de comprimento, com aparência de ferrugem. Nesta fase, as hifas saem do próprio estômato infectado e espalham-se sobre a superfície foliar em uma distância de 2 - 3mm, principalmente na face abaxial. Aparentemente, o micélio apresenta um efeito tóxico, que pode ser visto na forma da exudação de pequenas gotículas, sob as quais ocorre necrose após algumas horas de sua formação. Após uma semana do surgimento das lesões de coloração marrom, ocorre o colapso do tecido,

apresentando lesões com aspecto de camurça cinza claro, que contém acérvulos (esporodóquios) em desenvolvimento na superfície adaxial, produzindo conídios (Stahel, 1937).

## **2.8 - Dispersão dos esporos de *Mycosphaerella musicola* pelo vento**

A concentração ou a quantidade de esporos dispersos no ar são importantes componentes para o progresso de epidemias de doenças de plantas em um período próximo ou subsequente. Contudo, o sucesso dessa quantificação depende do conhecimento do patossistema, tipo de propágulos e dos métodos utilizados na quantificação (Campbell & Madden, 1990).

Com o propósito de descrever e quantificar epidemias, muitos autores têm conduzido trabalhos para monitorar esporos fúngicos em vários patossistemas. A quantidade de inóculo presente na lavoura é, muitas vezes, estimado pelo número de esporos coletados por esses aparelhos ou outros mais simples (Campbell & Madden, 1990; Hausbeck & Pennypacker, 1991; Panisson et al., 2002; Reis & Mário, 2003).

Nelson & Tung (1973) descreveram a relação entre a esporulação e a epidemia, afirmando que nenhuma parte do ciclo de muitas doenças, exerce maior influência no crescimento da epidemia do que a produção de inóculo para subsequente infecção. Menores quantidades de inóculo produzidas, em períodos freqüentes, retardam tanto a quantidade quanto a taxa de progresso da doença. As infecções e colonizações freqüentemente ocorrem sob regimes climáticos que dificultam a esporulação.

A concentração de inóculo, por si só, é bastante capaz de acelerar e estabelecer o processo epidêmico, mesmo a despeito de condições climáticas adversas. Shaner et al., (1972), atribuíram o severo ataque de *Helminthosporium*

*maydis* em milho, no estado de Indiana, nos Estados Unidos, em 1970, quando as condições climáticas desfavoráveis prevaleceram à uma maior introdução de esporos do que em 1971, quando as condições climáticas foram bem mais favoráveis. Epidemias de *Diplocarpon roase* em rosas na Inglaterra iniciam-se quando ocorrem chuvas freqüentes, porém, após a concentração de inóculos ter alcançado um nível crítico, a epidemia continua a progredir, mesmo tendo as chuvas ocorrido com menor freqüência (Saunders, 1966). A associação entre a concentração de inóculo e as epidemias têm sido demonstradas em diferentes culturas e regiões geográficas, tais como *Botrytis squamosa* em cebola nos Estados Unidos (Ellerbrock & Lorbeer, 1977), *Cercospora herpotrichoides* e trigo nos Estados Unidos (Rowe & Powelson, 1973), *Pyricularia oryzae* em arroz no Japão (Kato, 1974), *Colletotrichum coffeanum* em cafeeiro no Kenya (Nutman & Roberts, 1969) e *Mycosphaerella musicola* em bananas, ocorrida em Honduras (Stover, 1970).

Rotem et al., (1978) afirmam que qualquer esforço para relacionar epidemias à esporulação, deve estar ligado à evolução na produção de inóculo. Uma análise dos fatores macro e micro-meteorológicos que são capazes de afetar o desenvolvimento de epidemias por meio de sua influência na esporulação foram descritos e podem ser resumidos da seguinte forma: baixas temperaturas preservam o potencial de esporulação dos patógenos, os quais esporulam vigorosamente com a elevação das temperaturas; em regiões quentes as temperaturas verificadas durante os períodos noturnos situam-se na maioria das vezes, na faixa ótima para esporulação, porém o calor durante o dia, muitas das vezes, encurta o período de esporulação; em locais de climas quentes, durante o dia; as intensidades luminosas no campo, não são fracas o suficiente para limitar a esporulação em parasitas obrigatórios pelo decréscimo na atividade fotossintética do hospedeiro, e também para limitar a esporulação em parasitas facultativos pela falta de indução, porém estas intensidades são

geralmente fortes o suficiente para inibir a produção de esporos em conidióforos pré-existent; uma combinação entre baixas temperaturas em altitudes elevadas, promove a esporulação durante o dia e também o desenvolvimento de epidemias, mesmo a despeito das curtas noites de verão; os efeitos das chuvas como fonte de umidade, sobre a esporulação, depende significativamente, se esta ocorreu durante a noite ou de dia, e se as temperaturas diurnas foram baixas o suficiente para reprimir o efeito inibitório da luminosidade; o efeito do orvalho, que geralmente coincide com o período noturno, irá facilitar a esporulação, muito mais em climas quentes do que em climas frios e mais durante estações do ano em que prevalecem temperaturas mais elevadas durante a noite; irrigações na sobre copa, se aplicadas durante o dia, por um período limitado de horas, irão ter menor efeito sobre a esporulação do que a chuva ou o orvalho.

Considerando a dispersão de conídios Meredith (1970), observou que poucos conídios são dispersos pelo vento, embora a liberação possa ocorrer devido ao choque mecânico entre as folhas que encostam-se umas nas outras. Similarmente, Leach (1946) sugeriu que a ação mecânica da água sobre os conidióforos, pode causar a liberação de esporos. Aparentemente, a dispersão de conídios parece ocorrer primeiramente na água, devido à ação das chuvas ou também em função do escorrimento do orvalho (Leach, 1946; Meredith, 1962; Stover, 1970; Stover & Simmonds 1987), porém existem diversos relatos na literatura afirmando a presença de conídios no ar. Relatos recentes, afirmam que conídios de *M. fijiensis* são dispersos pelo vento, enquanto que os de *M. musicola* não o são (Stover & Simmonds, 1987).

Apesar de relatos sobre a dispersão de ascósporos de outras espécies de *Mycosphaerella*, como *M. cryptica*, por meio de gotas d'água dispersas pelo vento, após uma chuva (Cheah & Hartill, 1987), não existem evidências sobre este mesmo mecanismo, ocorrendo com os ascósporos de *M. fijiensis* ou de *M.*

*musicola*. Meredith et al., (1973) reportaram que ascósporos de *M. fijiensis* dispersos por uma distância de aproximadamente 1km, estiveram associados às novas infecções no campo, porém a dispersão pelo vento à dezenas de quilômetros, já foi postulada, porém não foi provada (Burt, 1994).

Burt (1997) afirma que o vento não tem sido descrito como efetivo na dispersão de ascósporos, no entanto, presume-se que este fator poderia provocar choques mecânicos capazes de resultar na liberação dos conídios. A chuva é bem mais efetiva na liberação dos ascósporos do que o orvalho por si só, e as maiores taxas de liberação dos esporos sexuados tem ocorrido após chuvas que sucederam períodos de seca (Leach, 1941, 1946; Fulton, 1962; Meredith & Lawrence, 1970; Meredith et al., 1973; Stover, 1970).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. How Plants Defend Themselves Against Pathogens. In: \_\_\_\_\_  
**Plant Pathology**. 6th ed. Elsevier Academic, 2004. Chap. 6, p. 207 – 248.

BUCHELI, E.; GAUTCHI, B.; SHYKOFF, J.A. Differences in population structure of the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* on two closely related host species, *Silene latifolia* and *S. dioica*. **Molecular Ecology**, Palo Alto, v. 10, p. 285-294, 2001

BURT, P.J.A. Windborne dispersal of Sigatoka leaf spot pathogens. **Grana**, v. 33, p.108-111, 1994.

BURT, P.J.A.; RUTTER, J.; GONZALES, H. Short distance wind dispersal of the fungal pathogen causing Sigatoka diseases in banana and plantain. **Plant Pathology**, San José, v. 46, p. 451-458, 1997.

CALPOUZOS, L. **Studies on the Sigatoka disease of bananas and its fungus pathogen**. Habana: Atkins Gnd. Research Laboratories, 1955. p. 70.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990. 532p.

CARLIER, J.; MOURICHON, D.; GONZALES, -de-LEON, D.; LEBRUN, M.H. DNA restriction fragment length polymorphism in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, p. 751-756, 1994.

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

CHEAH, L.H.; HARTILL, W.F.T. Ascospore release in *Mycosphaerella cryptica* (Cooke) Hansford. **European Journal of Forest Pathology**, v.17, p. 129-141, 1987.

CORDEIRO, Z.J.M. Doenças. In: ALVES E. J. (Org.). **A Cultura da Banana Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa, SPI/Cruz das Almas: Embrapa/CNPMF, 1997. Cap. 13, p. 353-408.

CORDEIRO, Z.J.M. Panorama Nacional das Principais Doenças da Bananeira. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA. (Org.). **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Lavras: UFLA; Brasília: SBF, 2007. p. 165-184.

DOWLING, T.E.; MORITZ, C.; PALMER, J.D.; RIESEBERG, L.H. Nucleic Acids III: analysis of fragments and restriction sites In: HILS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.). **Molecular systematics**. 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. Chap. 8, p. 249-320.

ELLERBROCK, L.A., LORBEER, J.W. Sources of primary inoculum of *Botrytis squamosa*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 363-372, 1977.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Produção de banana**. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 27 nov. 2008.

FOURÉ, E. Leaf spot disease of Banana and Plantain caused by *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis*. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL MUSA TESTING PROGRAM HELD AT FHIA, 1994, Honduras. **Proceedings...** Montpellier: INIBAP, 1994. p.37-46.

FOURÉ, E. Les Cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* MORELET au Gabon (maladie les raies noires). (SUITE III). **Fruits**, Paris, v. 40, N.(6)6, p.393-399, 1985.

FOURÉ, E.; PEFOURA, A.M.; MOURICHON, X. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *Mycosphaerella fijiensis* MORELET au Cameroun. Caractérisation de la résistance au champ de bananiers appartenant à divers groupes génétiques. **Fruits**, Paris, v. 45, n 4 , p. 339-345, 1990.

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

GÄUMANN, E. **Pflanzliche Infektionslehre**. 2nd ed. Basel: Birkhäuser, 1951. 681 p.



- GROPPE, K.; BOLLER, T. PCR assay based on a microsatellite –containing locus for detection and quantification of *Epichloe* endophytes in grass tissue. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p.1543 – 1550, 1997.
- HAYDEN, H.L., CARLIER, J. AITKEN, E.A.B. Population differentiation in te banana leaf spot pathogen *Mycosphaerella musicola*, examined at a global scale. **Plant Pathology**, v. 52, p. 713-719, 2003.
- HAUSBECK, M.K.; PENNYPACKER, S.P.. Influence of grower activity and disease incidence on concentrations of airborne conidia of *Botrytis cinera* among genarium stock plants. **Plant Disease**, v. 75, n. 8 p. 798-803, 1991.
- KATO, H. Epidemilogy of rice blast disease. **Review of Plant Protection Research**, v. 7, p. 1-20. 1974.
- KIMATI, H.; GALLI, F. Doenças da bananeira *Musa* spp. In: GALLI, F.; CARVALHO, P. de C.T. de; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; SALGADO, C. L.; KRÜGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, p. 87-101.
- KNOWLES, C.H. **Visit to upper Rewa to investigate leaf diseases of the banana**. Fiji: Pamphlet Of the Department of Agriculture, 1916. n. 24, 5 p. 1916.
- PHILPOTT, J.C.; KNOWLES, C.H. **Report on a visit to Sigatoka**. Fiji: Pamphlet Of the Department of Agriculture, 1913. n.3.
- KRANZ, J. Comparison of Epidemics. **Annual Review of Pahytopathology**, Palo Alto, v. 12, p.355-374, Sept. 1974.
- LEACH, R. Banana Leaf Spot, *Mycosphaerella musicola*, the perfect stage of *Cercospora musae* Zimm. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v. 18, 1941. p.91 – 95.
- LEACH, R., **Banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola*) on the Gros Michel vairyety in Jamaica**. Kingston: The Government Printer, 1946. 118p.
- McGAHAN, M.W.; FULTON, R.H. Leaf spot of banananas caused by *Mycosphaerella musicola*: A comparative anatomical study of juvenile and adult leaves in relation to lesion morphology. **Phytopathology**, St. Paul, v. 55. p. 1179-1182, 1964.

MEREDITH, M.A. Some components of the air-spores in Jamaican banana plantations. **Annals of Applied Biology**, London, v.50, p. 577-594, 1962

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

MEREDITH, D.S.; LAWRENCE, J.S. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v.52, p. 459-467, 1970.

MEREDITH, D.S.; LAWRENCE, S.J.; FIRMAN, I.D.. Ascospore release and dispersal in black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*). **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v 60, p 547-554, 1973.

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

MOLINA, C.; KAEMMER, D.; APONTE, S.; WEISING, K.; KAHL, G. Microsatellite markers for the fungal banana pathogen *Mycosphaerella musicola*. **Molecular Ecology Notes**, Bath, v. 1, p. 137-139, 2001.

MOLINA, C.; APONTE, S.; GUTIÉRREZ, A.; NUÑEZ, V.; KAHL, G. Development and application of molecular markers in *Mycosphaerella* populations in Colombia. In: JACOME, L.; LEPOVRE, P.; MARIN, D.; ROMERO, R.; ESCALANT, J.V. (Ed.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON MYCOSPHAERELLA LEAF SPOT DISEASES HELD IN SAN JOSÉ, 2., Costa Rica, 2002. **Proceedings...** San José: [s.n.], 2002. Session 2, p. 131-139.

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

MOURICHON, X.; CARLIER, J.; FOURÉ, E. Black leaf streak disease (black Sigatoka) Sigatoka disease (Yellow Sigatoka). **Musa Disease Fact Sheet**, Montpellier, n. 8, Oct. 1997.

- MÜLLER, R.; PASBERG-GAUHL, F.; RAMSER, J.; KAHL, G. Oligonucleotide fingerprinting detects genetic variability at different levels in Nigerian *Mycosphaerella fijiensis*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 145, p. 25-30, 1997.
- NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, Houston, v. 29, p. 1-10, 1975.
- NELSON, R.R.; TING, G. Influence of some climatic factors on sporulation y isolate of race T of *Helminthosporium maydis* on a susceptible male sterile corn hybrid. **Plant Disease Report**, Beltsville, v.57, p. 304-307, 1973.
- NUTMAN, F.J.; ROBERTS, F.M. Seasonal variations in the sporulating capacity of the fungus causing coffee berry disease. **Annals of Applied Biology**, London, v. 64, p. 85-99. 1969.
- NEU, C.; KAEMMER, D.; KAHL, G.; FISHER, D.; WEISING, K. Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, Palo Alto, v. 8, p. 523-525, 1999.
- PANISSON, E.; REIS, E.M.; BOLLER, W. Quantificação de propágulos de *Giberella zeae* no ar e infecção de anteras em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p.489-494, 2002.
- PARLEVLIET, J.E. Components of resistance that induce the rate of epidemic development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.17, p. 203-222, 1979.
- PRICE, D. **Climate and control of banana leaf spot. Clima y control de la mancha de la Roja em banano**. Turrialba: IICA/CATIE, 1960. p. 122-124. (Span, 3).
- REIS, E.M.; MÁRIO, J.L. Quantificação do inoculo de *Diplodia macrospora* e *D. maydis* em restos culturais, no ar, e sua relação com a infecção em grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p.143-147, mar./abr. 2003.
- ROTEM, J.; COHEN, Y.; BASHI, E. Host and Environmental Influences on Sporulation *in vivo*. **Annual Review of Phytopathology**, St. Paul., v. 16, p. 83-101, Sept. 1978.

ROWE, R.C.; POWELSON, R.L. Epidemiology of *Cerosporella* footrot of wheat: spore production. **Phytopathology**, St. Paul, v. 63, p. 981-984, 1973.

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

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

SIMMONDS, J.H. Influence of seasonal conditions on the development of *Cercospora* leaf spot etc. **Queensland Agricultural Journal**, Brisbane, v.52, p. 633 – 647, 1939.

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

SIMMONDS, N.W. Diseases. In: SIMMONDS, N.W. **Bananas**. 2nd ed. London: Longmans, 1966. p. 366-408.

STAHEL, G. Banana Leaf Spot (*Cercospora musae*). **Tropical Agriculture**, Surrey, v.14, p. 56-60, 1937.

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

STOVER, R.H. **Banana, Plantain and Abaca disease**. Kew, Surrey: Commonwealth Mycological Institute, England, 1972. 318 p.

STOVER, R.H.; SIMMONDS, N.W. **Bananas**. Harlow: Longman, 1987.

SHANER, G.E.; PERT, R.M.; NEWMAN, J.E.; STRIM, W.L.; LOEWER, O.L. A plant disease display model : Na evaluation of the computer simulator Epimay for suthen corn leaf blight in Indiana. **Public Purdue University Agriculture Experimental Station**. No. RB-890. 15 p. 1972.

TESTOLIN, R.; MARRAZZO, T.; CIPRIANI, G.; QUARTAR, R.; VERDE, I.; DETTORI, M.T.; PANCALDI, M.; SANSAVINI, S.; Microsatellite DNA in peac (*Prunus pérsica* L.Batsch) and its use in firgerprinting and testing the genetic origen of cultivars. **Genome**, v. 43, p. 512-520. 2000.

TOLLENAAR, D. The control of Sigatoka (Banana Leaf Spot Disease) by mist blowing with Banacobre-Snadoz. **Netherlands Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, p. 70-83. 1955.

WARDLAW, C.W., '*Cercospora*' Leaf Spot Disease of bananas. **Nature**, CXLIV; 11, 1939.

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

## **CAPÍTULO 2**

### **ANÁLISE DA DINÂMICA TEMPORAL DA SIGATOKA AMARELA E AEROBIOLOGIA DE ESPOROS**

## 1 RESUMO

ROCHA, Hermínio Souza. Análise da Dinâmica Temporal da Sigatoka amarela e Aerobiologia de Esporos na Região de Coronel Pacheco – MG. In: \_\_\_\_\_. **Epidemiologia da sigatoka amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microssatélites.** 2008. Cap. 2, p. 30-66. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

O conhecimento do progresso da doença é importante para a adoção de estratégias de controle e avaliação dos efeitos das medidas adotadas. Dessa forma, o estudo da análise temporal é bastante útil por integrar a evolução da interação entre os componentes do patossistema, expressados pelos dados acumulados de incidência e severidade e retratados pela curva de progresso da doença. Os esporos dispersos no ar, em um dado patossistema, constituem-se em importantes componentes para o progresso de epidemias de doenças de plantas em um período próximo ou subsequente. Assim, objetivou-se nesse trabalho avaliar a dinâmica temporal da Sigatoka amarela, no bananal em Coronel Pacheco – MG, simultaneamente à avaliação da aerobiologia dos esporos ao longo do ano. Durante a estação chuvosa, houve intenso progresso da doença, porém com elevadas taxas de emissão foliar simultaneamente, fazendo com que houvesse rápida inversão do pico de severidade, após os índices máximos. A curva do progresso da Sigatoka amarela apresentou dois picos de extrema severidade, sendo o primeiro ocorrido na estação chuvosa, tendo sido predominantemente causado pela elevada concentração de conídios, e o segundo foi verificado na estação mais seca do ano, tendo sido predominantemente causado pela elevada concentração de ascósporos no ar. As concentrações de ascósporos apresentaram correlação com a severidade da doença observada após 29 dias das contagens, o que denota a duração média do período de latência da doença naquela Região. Os padrões das curvas de severidade em ambos os picos, ajustaram-se ao modelo monomolecular, sendo as taxas de progresso mais intensas na estação chuvosa do que na seca. As concentrações de esporos não diferiram entre as duas alturas avaliadas. Em todas as avaliações observou-se uma concentração de ascósporos bem superior à de conídios, sendo que as maiores concentrações dos ascósporos ocorreram nas primeiras horas do dia e os picos de concentrações de conídios foram verificados após o escorrimento do orvalho aderido às folhas.

---

\* Comitê Orientador: Edson Ampélio Pozza – UFLA (Orientador), Zilton José Maciel Cordeiro I – Embrapa CNPMF (Co-Orientador).

## 2 ABSTRACT

ROCHA, Herminio Souza. Analysis of the Temporal Dynamics of Yellow Sigatoka and Aerobiology of the Spores in the Coronel Pacheco-MG Region. In: \_\_\_\_\_. **Epidemiology of yellow Sigatoka, phenols quantification in banana varieties and phylogenetic analysis of *Mycosphaerella musicola* isolates using microsatellites**. 2008. Chap. 2, p. 30-66. Thesis (Doctor Degree in Plant Pathology) – Lavras Federal University, Lavras.\*

A complete knowledge about the disease progress patterns is very important in terms of the option for the most adequate control measures and to evaluate the effects of these measures. Hence, the study of the temporal analysis is very useful as it integrates the evolution of the interactions among the pathosystem's components, expressed by the cumulated incidence and severity data, being summarized by the disease progress curve. The spores dispersed in the air, in a specific pathosystem, constitute important components for the progress of plants disease epidemics in a near or subsequent period. Hence, the aim in this research work was to evaluate the temporal dynamics of yellow Sigatoka on the banana plantation at Coronel Pacheco – MG, simultaneously to the evaluation of the aerobiology of the spores along the year. During the rainy season, there was intense disease progress, but also the rate of leaf emissions were high resulting in a rapid inversion of the severity peak, after having reached the highest rates. The disease progress curve of yellow Sigatoka presented two distinct peaks of extreme severity, with the first one occurring during the rainy season, predominantly caused by the high levels of conidia in the air, and the second being verified during the draft season, predominantly associated to the high levels of ascospores in the air. The ascospores concentrations presented a significant correlation to the severity of the disease observed after 29 days of the counting, which denotes the average duration of the latency period of the disease in that Region. The patterns of the severity curves in both peaks, adjusted to the monomolecular models, with higher progress rates during the rainy season than in the draft. There were no differences between the spores concentrations in the two heights tested. In general, the concentrations of ascospores were much higher than the conidia, with predominance of the latter form after the sweeping of the dew adhered to the leaves, and most of the ascospores were counted during the first hours of the day.

---

\* Guidance Committee: Edson Ampélio Pozza – UFLA (Supervisor), Zilton José Maciel Cordeiro – Embrapa CNPMF (Co-Supervisor).



### 3 INTRODUÇÃO

A banana constitui importante fonte básica de alimento para inúmeras famílias de baixa renda, mas é diariamente consumida por todas as camadas sociais da população brasileira. Da mesma forma como ocorre em todos os demais países produtores dessa fruta, no Brasil, as Sigatokas negra e amarela, e o Mal-do-Panamá são os principais problemas fitossanitários da cultura, com perdas que podem atingir o patamar de 100%, no caso da Sigatoka negra.

Sendo a Sigatoka amarela uma doença policíclica, ocorre a produção contínua de estruturas de reprodução, podendo gerar vários ciclos da doença durante o mesmo plantio (Pozza, 2000). Com isso, o aumento da população do patógeno, em um hospedeiro suscetível, pode definir um crescimento exponencial da área lesionada pela doença em curto intervalo, desde que haja condições favoráveis de ambiente. Assim o manejo de doenças policíclicas necessita de especial atenção devido às características de reprodução destes patógenos (Ribeiro do Vale et al., 2004).

Segundo Fry (1982), o conhecimento do progresso da doença em populações é importante para auxiliar na escolha de estratégias de controle e para avaliar o efeito das estratégias adotadas. A análise temporal integra os componentes do patossistema, expressos por dados acumulados de incidência e severidade e retratados pela curva de progresso da Doença (Vanderplank, 1963). Segundo Bergamin Filho (1995) a curva de progresso de uma doença é a melhor forma de se representar uma epidemia, visualizada na forma da proporção de doença ao longo do tempo. Nessas representações gráficas pode-se determinar a época de início da epidemia, a quantidade de inóculo inicial ( $Y_0$ ), a taxa de progresso da doença ( $r$ ), a área abaixo da curva de progresso, a quantidade máxima de doença ( $Y_{max}$ ) e a duração da epidemia. Campbell & Madden (1990) afirmam que o ambiente influencia o progresso de uma epidemia por influenciar as diversas fases do ciclo de vida do patógeno, bem como a interação com as

fases específicas do crescimento do hospedeiro. Guyot & Cuille (1958) concluíram que a severidade da Sigatoka amarela e o decréscimo dos períodos de incubação e geração estavam sempre associados às variáveis temperatura e umidade relativa.

Muitos autores correlacionam o progresso das epidemias aos tipos de esporos e suas concentrações dispersas no ar. Neste sentido, Campbell & Madden (1990), afirmaram que a concentração ou a quantidade de esporos dispersos no ar constituem-se em importantes componentes para o progresso de epidemias de doenças de plantas em um período próximo ou subsequente. Contudo o sucesso dessa quantificação depende do conhecimento do patossistema, dos tipos de propágulos e dos métodos utilizados para quantificá-los.

O Estado de Minas Gerias situa-se em quarto lugar na produção nacional de bananas, com uma área plantada de 36,7 mil hectares e produção de 540 mil toneladas (Agrolink, 2008). Considerando que a Sigatoka amarela ainda é a principal limitação de ordem fitossanitária para a produção de bananas no Estado, objetivou-se com o presente trabalho: i) caracterizar a dinâmica temporal da Sigatoka amarela na Região de Coronel Pacheco – MG, ii) verificar a relação entre a concentração de esporos e a severidade da doença e iii) determinar a flutuação de ascósporos e conídios no ar ao longo do dia.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido durante o período de novembro de 2006 à dezembro de 2007, no Sítio do Cruzeiro, na localidade denominada de Ribeirão de Santo Antônio, município de Coronel Pacheco – MG, em propriedade particular pertencente ao Sr. Arnaldo Roldão Filho, cujas coordenadas geográficas são: 21° 34' 26'' de Latitude sul e 43° 19' 45'' de longitude oeste a uma altitude de 750 m acima do nível do mar. No local, encontra-se plantado um bananal com área total de 2,79ha, em latossolo vermelho escuro, com a variedade 'Saquarema', pertencente ao subgrupo Cavendish (AAA), em espaçamento 4 x 3 m em fileiras simples. A escolha do local se deu em função da elevada severidade dos sintomas de Sigatoka (FIGURA 1), e também pelo fato de não haver qualquer medida de controle da doença, permitindo assim, que pudesse ser estudado o progresso da epidemia em condições naturais.

Para avaliar o progresso da doença, foram marcadas 25 plantas aleatoriamente, tendo sido registradas as severidades em todas as folhas de cada planta, seguindo a metodologia proposta por Stover (1971) e modificada por Gauhl (1994). As avaliações foram efetuadas a cada 15 dias, juntamente com a coleta de dados climatológicos e densidades de esporos no ar. Todas as plantas marcadas foram submetidas à análises de PCR, no Instituto Biológico de São Paulo, para identificação da Sigatoka amarela. Além disso, foram feitas análises microscópicas de conídios e conidióforos, tendo sido observados conidióforos em esporodóquio, característicos de *Mycosphaerella musicola*.

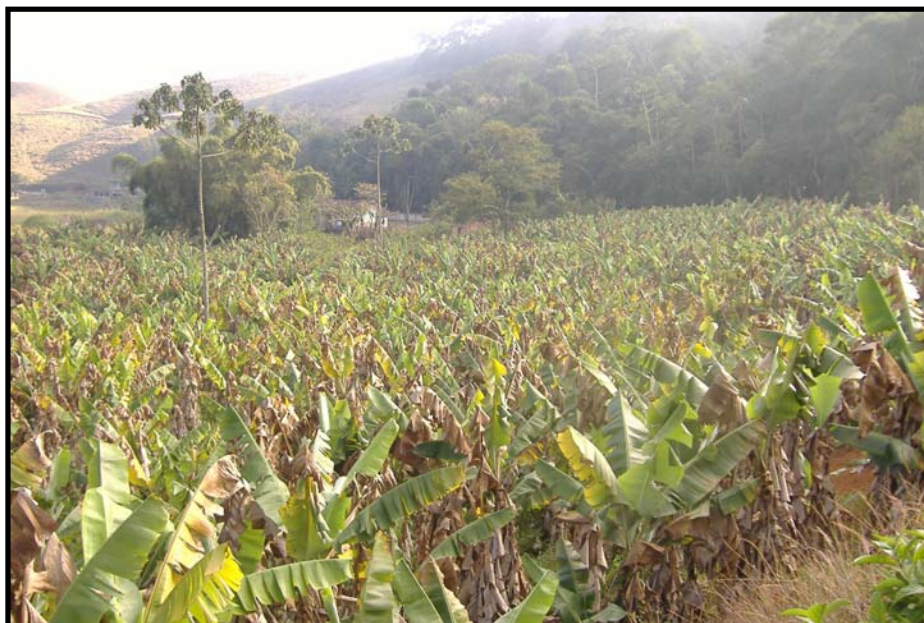


FIGURA 1: Área experimental escolhida para a condução do experimento, em Coronel Pacheco, MG, no Sítio do Cruzeiro, com alta severidade da Sigatoka amarela. UFLA, Lavras – MG. 2008.

#### 4.1 Variáveis utilizadas na avaliação do progresso da doença

- **Severidade da doença:** Corresponde à extensão de área foliar infectada pelo patógeno. Para esta quantificação foi utilizada a escala de Stover (1971) modificada por Gauhl (1994) (FIGURA 2). Após realizadas as anotações, procederam-se os cálculos dos índices de infecção com as notas de cada planta pela fórmula:

$$\text{Índice de infecção} = [\sum nb / (N-1)T] * 100$$

Onde:

n = número de folhas em cada nível da escala de Stover modificada por Gauhl.

b = grau da escala.

N = número de graus empregados na escala (7).

T = número total de folhas avaliadas.

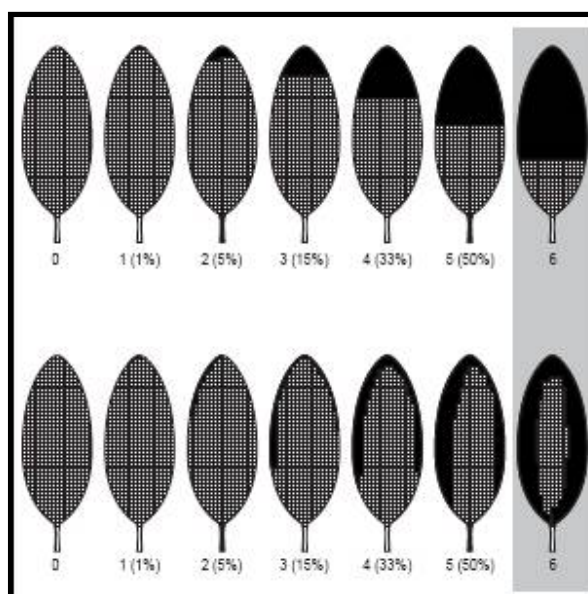


FIGURA 2: Escala de severidade para Sigatoka proposta por Stover (1971) modificada por Gauhl (1994). UFLA, Lavras, MG. 2008.

- **Tempo de desenvolvimento da enfermidade (TDE):** é o tempo em dias entre o estágio B da folha vela (FIGURA 3) e a verificação de dez ou mais lesões necrosadas e maduras nesta folha (Fouré, 1982). As plantas em cuja folha B se fazia presente, recebiam uma marcação com uma fita plástica, na qual se registrava a data em que foi encontrada. Estas folhas foram então avaliadas quinzenalmente até que se registrasse a ocorrência de 10 ou mais lesões maduras (FIGURA 4).

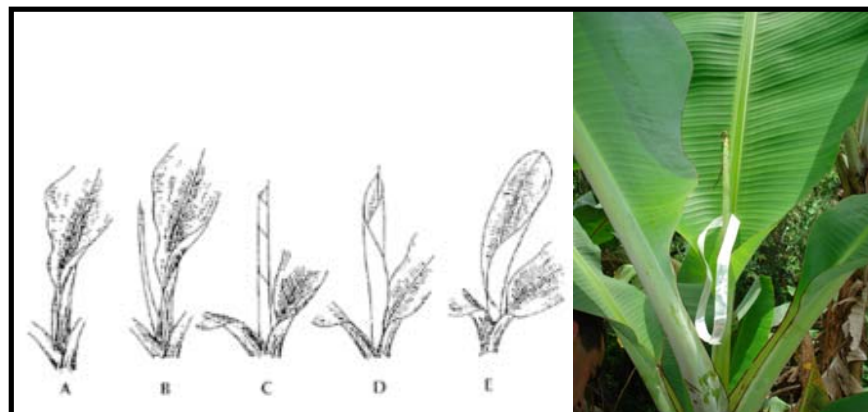


FIGURA 3: Identificação da folha B (Burn, 1963). Registro da data com fita circular. UFLA, Lavras, MG. 2008.

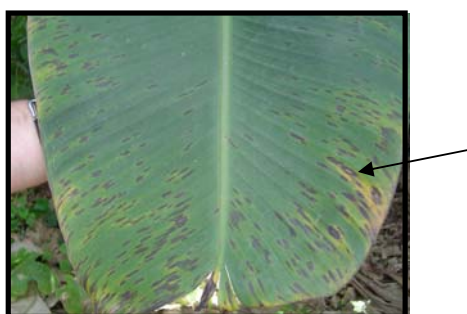


FIGURA 4: Identificação de lesão em estágio 6. UFLA, Lavras, MG. 2008.

- **Folha mais Jovem manchada (FMJM):** Corresponde à primeira folha totalmente aberta que apresenta dez ou mais lesões necrosadas com centro seco.
- **Taxa de Emissão Foliar Diária (TEF/D):** É o valor dado pela diferença entre a quantidade de folhas presentes nas plantas com nota até 6, em uma dada avaliação, e o valor equivalente da mesma planta na avaliação subsequente.

- **Curvas de progresso da doença:** As curvas de progresso foram plotadas utilizando-se os valores de índice de infecção em relação ao tempo. Os dados de índice de infecção foram analisados por meio de análise de regressão linear simples, para verificação de melhor ajuste em quatro modelos empíricos, o Exponencial, Logístico, Monomolecular e de Gompertz. Para a escolha do melhor modelo consideraram-se o coeficiente de determinação ajustado da análise de regressão ( $R^{*2}$ ), o valor do quadrado médio dos desvios (obtido na análise de variância) e o gráfico de resíduos padronizados ( $Y_{obs}-Y_{esp.}$ ) em função da variável independente (Campbell & Madden, 1990). As taxas de progresso da doença ( $r$ ) das curvas de índice de infecção foram estimadas pelo parâmetro  $b$  da equação de regressão, obtidas a partir do modelo que melhor ajustou-se aos dados.

Devido ao baixo ajuste para a curva completa de severidade da doença, optou-se pela estratégia da divisão da curva completa em dois diferentes períodos delimitados pelos picos (FIGURA 11), conforme metodologia descrita por Laranjeira et al. (2003). O primeiro período (A) compreendeu 62 dias durante o verão de 2006-2007, o segundo segmento da curva (B) submetida ao ajuste compreendeu um período de 105 dias, tendo ocorrido durante os últimos dias do verão e toda a estação do outono.

#### **4.2 Registro das variáveis ambientais**

Antes de se iniciar a coleta dos dados de progresso da doença, foi instalada no local, uma estação climatológica computadorizada (Datalogger-CR510 Campbell Scientific Inc.). Os dados coletados pela estação foram: molhamento foliar (h/dia); precipitação (mm/dia); umidade relativa do ar (%); temperatura mínima, média e máxima (°C), velocidade do vento (m/s) e direção predominante do vento. A estação foi instalada em torre metálica, localizada no centro da área com os sensores posicionados na altura de 1,5 m acima do nível

do solo. Foram ainda coletados dados de temperatura e umidade relativa, por meio de um aparelho termohigrógrafo, localizado em abrigo coberto, próximo à estação climatológica.

Todas as variáveis ambientais foram testadas para avaliar a significância da correlação de Pearson com os índices de infecção, por meio do programa estatístico SAS.

#### **4.3 Monitoramento da concentração de esporos da Sigatoka amarela na área experimental**

O monitoramento da concentração de conídios e ascósporos de *Mycosphaerella musicola* dispersos no ar, na área do bananal, foi realizado durante o período de março-dezembro/2007. Para esta finalidade, utilizou-se o coletor 'Rotorod Sampler' modelo 20, dotado de duas hastes coletoras de acrílico transparente, com dimensões de 1,52 x 1,52 x 22mm, instaladas verticalmente em relação ao eixo de rotação circular. As hastes foram untadas com vaselina líquida para retenção dos esporos do fungo. Para se obter a medida da concentração de esporos (C), foi utilizada a fórmula  $C = P/V$ , sendo P a quantidade de esporos mensurada e V o volume de ar amostrado.

Na condição do experimento, o equipamento foi ligado durante 15 minutos a cada hora, tendo sido amostrado o volume de 0,00632 m<sup>3</sup> de ar.

Foram utilizados dois coletores, sendo um posicionado a 1,5 m e o outro a 3,0 m do nível do solo (FIGURA 5). Todas as coletas ao longo do ano, foram realizadas em um único local, tendo sido posicionado o coletor aleatoriamente no centro do bananal, sendo portanto representativo de toda a área. As coletas foram realizadas nas mesmas datas das avaliações de severidade da doença, a cada 15 dias, durante 12 horas do dia, iniciando-se às 6h00 e finalizando às 18h00. Este período de coleta foi escolhido em função das afirmações de Wardlaw (1961), quando o autor esclarece que os conídios só são formados na



ocorrência de um filme de água livre sobre as folhas, sendo o período da manhã o mais favorável para a coleta dos mesmos, pois as folhas ainda estão molhadas pelo orvalho. As contagens foram realizadas em laboratório, em fotônico, com a objetiva de aumento de 40 x.



**FIGURA 5: Torre montada, com coletores de esporos 'Rotorod Sampler'<sup>(R)</sup> instalada no centro do bananal. UFLA, Lavras, MG. 2008.**

Foram testadas as correlações entre as concentrações de esporos nos diferentes horários do dia, nas duas alturas de coleta com os índices de infecção em vários períodos, por meio do teste de correlação de Pearson, no programa estatístico SAS.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- Associação dos picos de severidade às concentrações de esporos e variáveis climáticas.

A curva da severidade da Sigatoka amarela ao longo do ano apresentou dois picos distintos (FIGURA 6), sendo o primeiro verificado na primeira semana de janeiro de 2007, ou seja, em pleno verão, com um índice de infecção médio de 46%, e o segundo em junho de 2007, no auge da estação seca do ano.

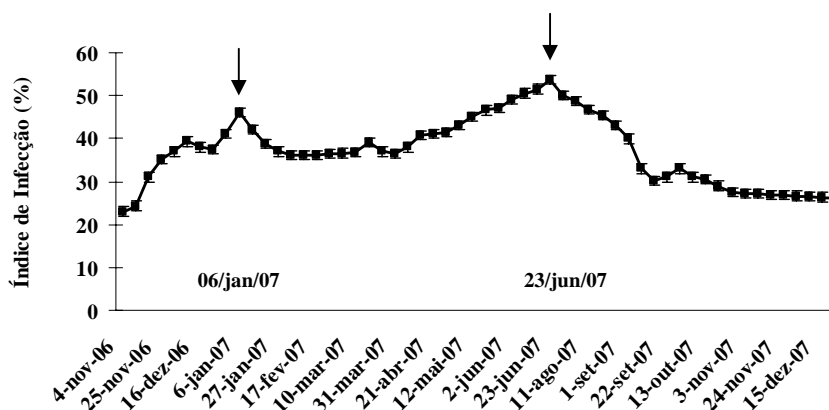


FIGURA 6: Curva do progresso da severidade de Sigatoka amarela medida pelo índice de doença, em Coronel Pacheco - MG. UFLA, Lavras – MG, 2008.

Segundo Wardlaw (1961), a maior incidência de pequenas lesões listradas, visíveis a olho nu, na segunda, terceira ou quarta folha, depende da variedade de bananeira e das condições ambientais. Durante o período de 04/Nov/06-15/dez/07, as variáveis climáticas, temperatura média, pluviosidade e umidade relativa foram principalmente favoráveis para o desenvolvimento do patógeno, tendo resultado em dois picos distintos de severidade, sendo o primeiro observado no verão de 2006 (23,69° C de Temperatura média; 82,64%

de Umidade Relativa média; 41,11 mm de Pluviosidade Média e Índice de Infecção de 46,09%) e o segundo em plena estação seca, entre julho e agosto de 2007 (18,49°C de Temperatura média; 76,29% de Umidade Relativa média; 0,00mm de Pluviosidade média e Índice de Infecção de 53,66%).

Observou-se assim, que apesar do progresso da doença ter sido mais rápido na época das chuvas, ocorreu uma compensação das perdas com a contínua emissão foliar das plantas tendo levado a uma inversão da taxa de progresso, justificada pela maior duração dos períodos de incubação e latência do que as taxas de emissão foliar.

Por outro lado, na época mais seca, as taxas de emissão foliar foram inferiores, possibilitando que os índices de infecção tivessem sido superiores, em razão do livre progresso das lesões, sem o pleno desenvolvimento vegetativo do hospedeiro.

Observa-se ainda que a variedade Saquarema é pertencente ao subgrupo Cavendish (AAA), a qual apresenta o mais elevado grau de suscetibilidade à Sigatoka, dentre todas as variedades tradicionalmente plantadas no Brasil (Gasparotto, 2006). Por outro lado, Simmonds (1966), discrimina as condições climáticas mais condutivas para a produção de conídios e ascósporos. O autor esclarece que conídios são produzidos continuamente ao longo das estações chuvosas do ano, sendo disseminados através de um filme de água livre, que pode ser resultante tanto da água da chuva quanto do orvalho, escorrendo nas folhas.

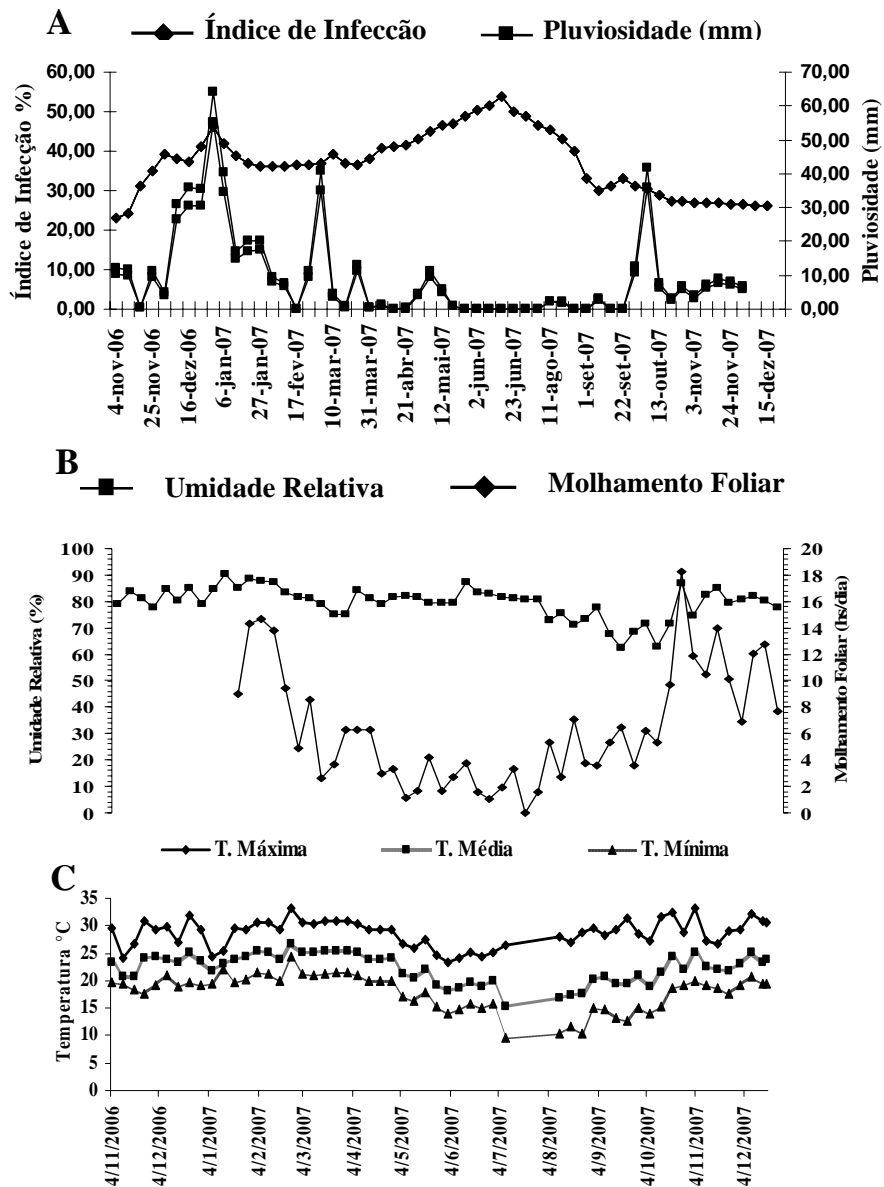


FIGURA 7: Curva de progresso da severidade de Sigatoka amarela expressa em índice de infecção e comparada com pluviosidade (A); umidade relativa média e molhamento foliar (B) e (C) temperaturas máxima, média e mínima. UFLA, Lavras – MG, 2008.

Considerando a arquitetura da planta, observou-se que este escoamento tende a concentrar a maior parte da suspensão de conídios no centro da mesma, por onde são lançadas as novas folhas, produzindo os típicos padrões de infecção em linhas, que são atribuídos às infecções por conídios. Ascósporos, por sua vez, apesar de serem produzidos nas mesmas lesões que anteriormente liberaram conídios, aparecem mais tardiamente e são forçados para fora dos peritécios durante os climas úmidos, ou mesmo em climas secos, porém associado às ocorrências de fortes orvalhos. De acordo com Meredith, (1970), a germinação dos conídios, ocorre sempre associada à presença de água livre sobre as folhas, com duração aproximada de 6 horas após a deposição, desde que a temperatura seja favorável, sendo o ótimo em torno de 25°C. Após a deposição pode ocorrer uma fase epifítica, com duração de 4-6 dias, durante a qual o crescimento do tubo germinativo é paralisado durante as horas mais quentes do dia e com menor umidade relativa, retornando ao desenvolvimento sob condições mais favoráveis, que normalmente ocorrem durante a noite (Meredith, 1970; Stover, 1972; Zadocs & Schein, 1979).

Verificou-se correlação positiva significativa entre as variáveis pluviosidade (PP) e molhamento foliar (MOLH) e os índices de infecção, entre 04/nov/06 – 10/mar/07 (TABELA 1), que são justamente as variáveis responsáveis pela água livre nas folhas.

Dessa forma, compreende-se que o primeiro pico de índice de infecção observado, no início do verão, foi predominantemente resultante da infecção por conídios, visto que no início do ano, a ocorrência de fortes chuvas foi suficiente para proporcionar um filme de água livre por longos períodos, sob temperatura ideal para o desenvolvimento do patógeno.

**TABELA 1: Correlação entre as variáveis climáticas (Pluviosidade – PP e Molhamento Foliar - Molh Temperatura Máxima - Tmax, Temperatura média - Tmed, Temperatura Mínima - Tmin, Umidade Relativa Média - UR,) e o Índice de Infecção - IF no período de 04/nov/2006 – 1-/mar/2007. UFLA, Lavras – MG, 2008.**

|    | Variáveis Climáticas |         |         |         |        |        |
|----|----------------------|---------|---------|---------|--------|--------|
|    | PP                   | Molh    | Tmax    | Tmed    | Tmin   | UR     |
| IF | 53,47*               | 78,92** | -0,0635 | -0,0164 | 0,4276 | 0,2202 |

\*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade

Em contrapartida, o segundo pico, de maior intensidade (53,66% de índice de infecção médio), ocorreu na primeira semana do inverno, quando foram verificados os menores índices de pluviosidade. Estes resultados contrapõem as afirmativas de Wardlaw (1961), pois o autor afirma que como *M. musicola* é um patógeno específico do gênero *Musa*, espera-se que sua ecologia esteja de acordo com a do hospedeiro.

Neste caso, observa-se que o período de seca, foi prejudicial para o hospedeiro (FIGURA 8), visto que, é nesta época em que se verificam as menores taxas de emissão foliar diárias, tendo conseqüentemente refletido na redução média da posição da folha mais jovem manchada (FMJM).

Entretanto, com a paralisação da emissão foliar, houve o progresso das infecções ocorridas durante os períodos de maior favorabilidade da doença, que expressaram-se na forma dos maiores índices de infecção mais tardiamente do que o verificado no primeiro pico. A falta de crescimento do hospedeiro parece ser a principal explicação para o comportamento da curva de progresso da doença.

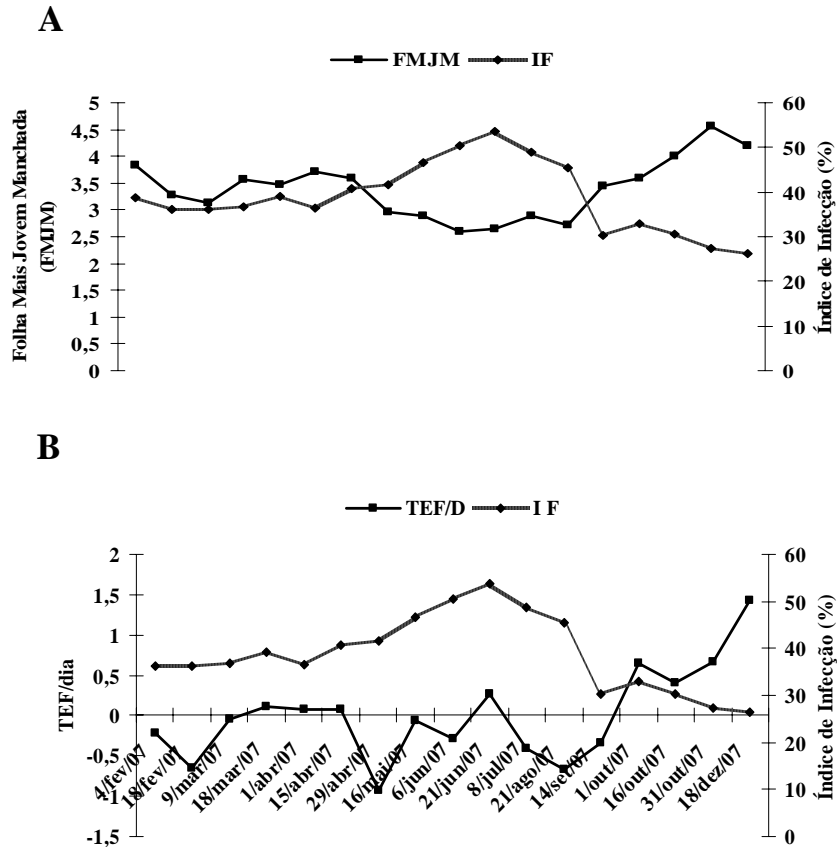


FIGURA 8: Curva de progresso da severidade da Sigatoka amarela transformada em índice de infecção - IF e folha mais jovem manchada - FMJM (A) e taxa de emissão foliar diária - TEF/dia e índice de infecção - IF (B). UFLA, Lavras - MG, 2008.

Diversos autores suportam estes resultados. Dickson (1929) considerou *Cercospora musae* um parasita não muito forte, e concluiu, 'Para que as plantas fossem severamente afetadas, as condições de desenvolvimento vegetativo deveriam ser pobres e resultar em debilidade generalizada do hospedeiro. Clima frio e úmido são situações desfavoráveis, solos mal drenados, e fracas

*práticas culturais provém um conjunto de circunstâncias favoráveis ao fungo, permitindo ao mesmo assumir proporções epidêmicas?*

Tanto em Queensland, na Austrália, quanto em Fiji, os fatores climatológicos mais associados à ocorrência de Sigatoka amarela são a umidade relativa e a temperatura, sendo que, via de regra, a doença atinge seu ponto de máxima atividade durante os períodos de temperaturas mínimas, e máxima umidade relativa (Wardlaw, 1961). O autor relata ainda que em locais onde os picos de infecção coincidem com uma reduzida taxa de emissão foliar, a planta torna-se severamente afetada, a exemplo do que ocorre na Região costeira de Santa Marta na Colômbia, que caracteriza-se pelo seu clima árido, porém com constantes ocorrências de orvalho pesado. Corroborando com estas afirmações, em Coronel Pacheco, verifica-se pela FIGURA 8, que as menores taxas de emissão foliar ocorreram simultaneamente aos maiores picos de índice de infecção. Coincidentemente, no Suriname também ocorrem dois picos de máxima severidade da Sigatoka amarela durante o ano, sendo o primeiro verificado em fevereiro e o segundo em julho, os quais, segundo Stahel, (1937) devem ser atribuídos ao acúmulo das infecções nas quatro a cinco semanas prévias.

Na Austrália, contrariamente ao normal observado, um período de intensas chuvas, ocorrido entre Janeiro e fevereiro, antecipou o início da epidemia, porém o autor afirma que esta condição pode ter relação com o fato das fortes chuvas resultarem em maior número de plantas apresentando podridão radicular, o que teria favorecido as infecções pelo acentuado decréscimo do vigor vegetativo das plantas e também devido à reduzida atividade de crescimento durante os meses de inverno (Warlaw, 1961).

Simmonds (1966), também relatou que na Jamaica durante o verão quente e úmido, as infecções por conídios atingem seu limiar máximo, seguidas



no outono e inverno, pela produção dos ascósporos. No inverno, observaram-se altas infecções por ascósporos, as quais são reconhecidas pela sintomatologia típica denominada de ‘tip spotting’, verificadas nas extremidades das folhas. A produção de folhas é baixa e o ataque atinge o seu pico máximo. Ao final do inverno, com as baixas temperaturas acumuladas, ocorre uma significativa redução na produção de esporos, o suficiente para reduzir as novas infecções possibilitando às plantas um crescimento sem a doença. Durante a primavera quente e seca, as condições são desfavoráveis para a esporulação e infecção, e no início da estação quente e úmida, as plantas apresentam os menores índices da doença de todo o ano. Nesta ocasião, porém, as condições para as infecções por conídios tornam-se as mais favoráveis e novamente o ciclo reinicia-se.

## **5.2- Tempo de Desenvolvimento da Enfermidade (TDE)**

Outro dado, observado no campo, e igualmente respaldado pelas afirmativas de Simmonds, refere-se ao tempo de desenvolvimento da enfermidade (TDE), medido pelo intervalo em dias entre a ocorrência da folha em estágio B e a verificação de dez ou mais lesões necrosadas e maduras nesta folha. Na FIGURA 9, observa-se uma significativa elevação do TDE na época mais seca do ano, coincidindo também com a elevação no índice de infecção. As duas variáveis apresentaram uma correlação positiva e estaticamente significativa de 67,09% ao nível de 5% de probabilidade.

Dessa forma verifica-se que o aumento na severidade observada na época seca do ano tem sua origem bem anterior, visto que é nesta época que se verificam os maiores TDE (FIGURA 9), ou seja, as menores taxas de desenvolvimento das lesões, com valores superiores a 100 dias quando se observou a maior severidade da doença em todo o ano.

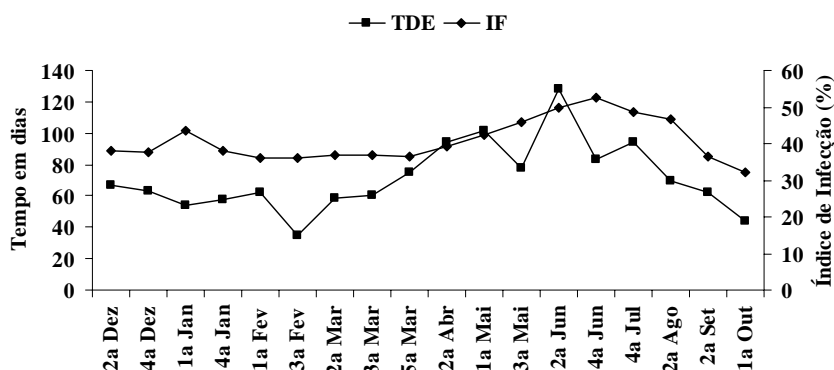


FIGURA 9: Curva de progresso da severidade da Sigatoka amarela transformada em índice de Infecção (IF) e o tempo de desenvolvimento da enfermidade (TDE) ao longo do ano em Coronel Pacheco - MG. UFLA, Lavras – MG, 2008.

Assim, apesar do bananal ter apresentado o maior acúmulo da doença nesta época seca, era justamente neste período em que a doença se desenvolveu com a menor rapidez. Apesar de lento o progresso da doença, na época mais seca, a severidade foi cumulativa, e sem a emissão de novas folhas, os índices de infecção foram os maiores.

A produção de ascósporos ocorre nas mesmas lesões em que foram produzidos os conídios, porém mais tardiamente, sendo liberados mediante a ocorrência de elevações na umidade relativa do ar (Simmonds, 1966). Essa elevação na umidade relativa ocorre, por exemplo, em consequência dos orvalhos. Considerando a baixa pluviosidade verificada durante o segundo pico da doença, é possível associar a elevação na concentração dos esporos sexuados durante o período de 15/abril/2007 a 15/julho/2007 ao segundo pico de severidade, cuja concentração máxima foi observada 60 dias antes do máximo de severidade da doença (FIGURA 10). Stahel (1937) afirma que para haver

evidência da formação das primeiras lesões visíveis a olho nu, são necessários pelo menos 28 dias após a inoculação, podendo este período ser ainda maior.

Observou-se ainda que apesar de reduzida pluviosidade, ainda houve umidade relativa do ar suficiente para promover a produção de conídios durante o mesmo período, porém em concentração bem inferior. Entretanto, os padrões de sintomatologia observados durante a época seca foram típicos de ascósporos (Tip spotting), reforçando ainda mais a suposta associação.

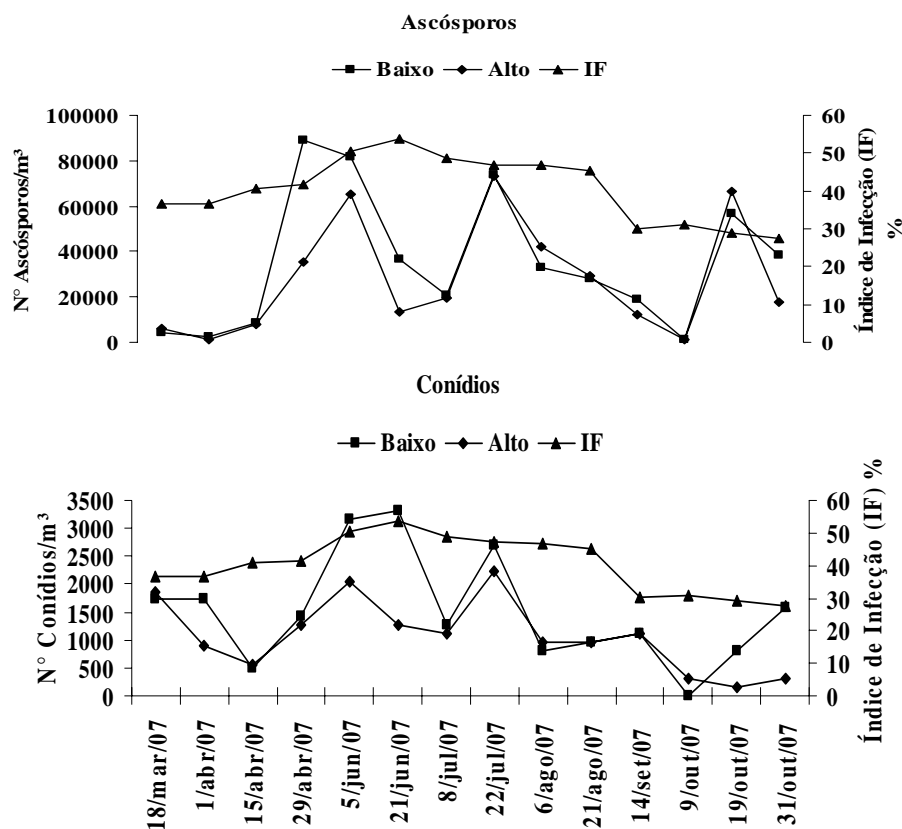


FIGURA 10: Curva de progresso da severidade da Sigatoka amarela transformada em índice de infecção (IF) e concentração de ascósporos e conídios coletados a 1,5m (Baixo) e 3,0m (Alto) dos solo, em Coronel Pacheco – MG. UFLA, Lavras – MG, 2008.



**FIGURA 11: Sintomas típicos de infecção por ascósporos (Tip spotting). UFLA, Lavras, MG. 2008.**

### **5.3- Correlação entre as variáveis climáticas e os índices de infecção**

O clima foi determinante para a oscilação na produção dos conídios e ascósporos, os quais por sua vez, resultaram nos picos de severidade da doença. Neste sentido, Calpouzos et al. (1962, 1964), em Porto Rico, relataram que a chuva é bastante importante na previsão da doença chegando a recomendar, pulverizações, sempre que fosse registrada, nas três semanas precedentes, uma precipitação igual ou superior a 76 mm. Igualmente, Mass (1976), verificou uma correlação elevada entre a frequência de chuviscos e o aparecimento de manchas na fase de estrias em cerca de três semanas.

Leach (1941), relata que a produção de ascósporos por lesão foliar é consideravelmente menor do que a de conídios. Contudo, a descarga de ascósporos pode ocorrer devido à elevação da umidade relativa, não sendo dependente de um filme de água livre sobre a lesão foliar. Ascósporos podem ser liberados mesmo a partir das folhas mais baixas da planta, que não são

atingidas pelo orvalho, ao passo que conídios não são. O autor menciona ainda que a faixa de temperatura ideal para a ocorrência desta liberação situa-se entre 21,1 e 28,91 °C, porém não fornece detalhes acerca da duração do período de incubação ou latência.

Pelo que se observa na TABELA 2, as condições climáticas em Coronel Pacheco – MG, apresentam correlação positiva significativa para a variável umidade relativa, em relação ao índice de infecção, após 30 dias até 90 dias da ocorrência destas variáveis climáticas. No entanto, para todas as demais variáveis, excetuando-se o molhamento foliar, as correlações só foram significativas, para o período de 60 e 90 dias após as ocorrências climáticas, o que está dentro do prazo relatado por Meredith (1970), quando afirma que as infecções normalmente ocorrem nas primeiras três folhas novas, aparecendo os primeiros sintomas (estrias) entre 11 e 106 dias após a germinação.

As correlações negativas no início da epidemia foram provavelmente devido aos eventos climáticos somente resultarem em severidade efetiva após 30 dias da ocorrência dos mesmos, sendo plenamente observados entre 60 e 90 dias.

Apesar do vento ser o principal agente de disseminação dos ascósporos, após a liberação a partir dos peritécios, neste trabalho não houve significância da intensidade e do direcionamento, em relação aos índices de infecção e as concentrações de ascósporos observados. Provavelmente, devido às baixas ocorrências de ventos fortes na área experimental.

**TABELA 2: Correlação entre as variáveis climáticas (Temperatura Máxima - Tmax, Temperatura média - Tmed, Temperatura Mínima - Tmin, Umidade Relativa Média - UR, Precipitação - PP e Molhamento Foliar - Molh) e o Índice de Infecção - IF em seis períodos distintos. UFLA, Lavras – MG, 2008.**

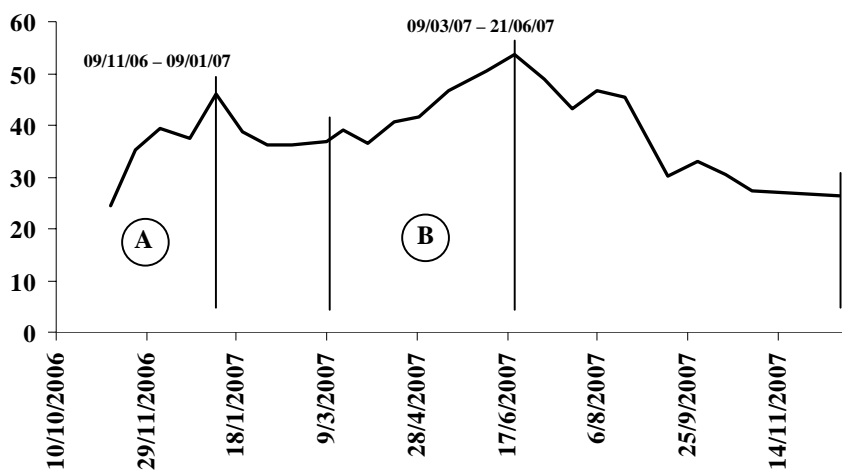
|                             | Tmax                      | Tmed    | Tmin    | UR     | PP     | Molh    |
|-----------------------------|---------------------------|---------|---------|--------|--------|---------|
| <b>Período Aval. dos IF</b> | <b>09/01/07 em diante</b> |         |         |        |        |         |
| Mesmo dia                   | -0,47**                   | -0,36** | -0,52** | 0,21   | -0,07  | -0,65** |
| 15 dias após                | -0,47**                   | -0,20   | -0,37** | -0,32* | -0,05  | -0,65** |
| 30 dias após                | -0,36**                   | 0,05    | -0,13   | 0,43** | 0,02   | -0,57** |
| 45 dias após                | -0,19                     | 0,26    | 0,08    | 0,45** | 0,09   | -0,42** |
| 60 dias após                | 0,03                      | 0,58**  | 0,43**  | 0,48** | 0,28*  | -0,11   |
| 90 dias após                | 0,47**                    | 0,86**  | 0,70**  | 0,35*  | 0,47** | 0,28    |

\*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade

Apesar da importância da concentração dos esporos sobre o progresso da Sigatoka amarela, Burt et al. (1997) observaram a igual importância de se avaliar os efeitos da radiação UV sobre a sobrevivência destes propágulos, o que pode restringir o sucesso de disseminação do patógeno à longas distâncias.

#### **5.4- Curvas de Progresso da doença**

As curvas de progresso foram plotadas com os dados de índice de infecção, representando a severidade, em relação ao tempo. Não foram adotadas medidas de manejo da doença na área, permitindo que tanto a expressão dos sintomas quanto a disseminação dos esporos na planta e entre plantas pudesse ocorrer sem qualquer intervenção.



**FIGURA 12: Curva de progresso da severidade da Sigatoka amarela em bananal localizado em Coronel Pacheco – MG, transformada em índice de infecção, constando as delimitações dos períodos utilizados para o ajuste de modelos. UFLA, Lavras – MG, 2008.**

Os melhores ajustes para os períodos de crescimento da epidemia, tanto no verão quanto no outono, foram verificados para o modelo monomolecular (TABELA 2). Estes ajustes basearam-se em função dos menores resíduos e nos maiores coeficientes de determinação ( $R^2$ ).

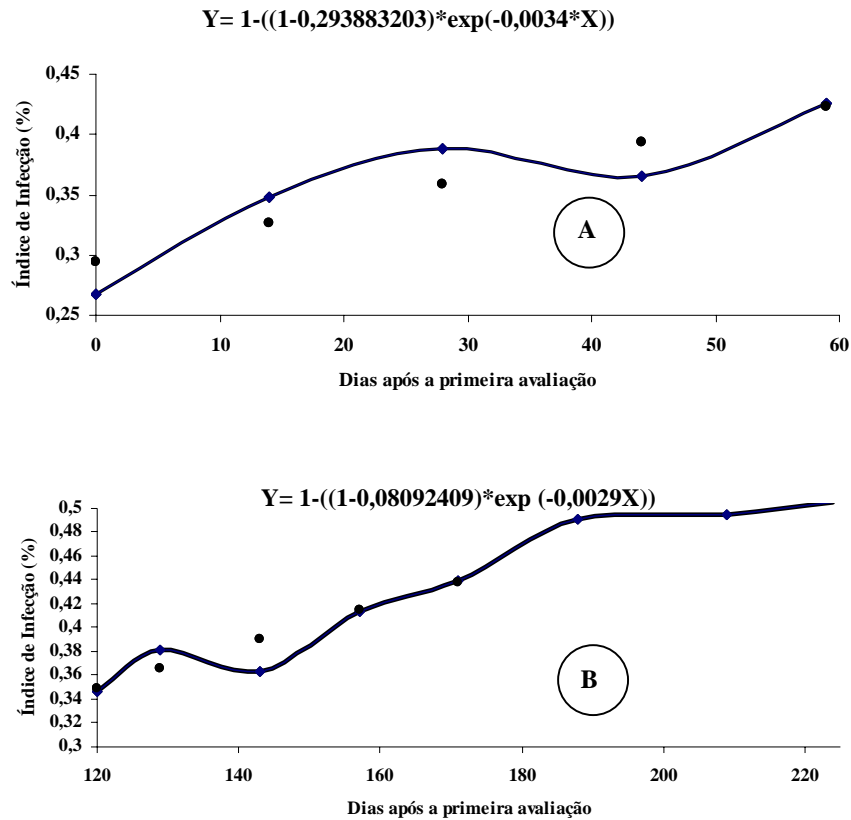
Apesar de ambas as porções da curva, terem ajustado igualmente para o mesmo modelo Monomolecular, quando se comparam as duas, nota-se uma maior taxa diária de progresso da doença ocorrendo no verão ( $dy/dt = 0,2806$ ) do que no outono ( $dy/dt = 0,1859$ ), o que está relacionado às condições climáticas favoráveis, principalmente no que se refere ao grande volume de chuvas, que possibilitaram uma maior produção e disseminação de conídios continuamente ao longo dos três primeiros meses do ano.

TABELA 3. Comparação de modelos lineares para descrever as taxas estimadas de progresso da severidade ( $r$ ) severidade inicial e severidade final da Sigatoka amarela da bananeira em dois períodos distintos. UFLA, Lavras –MG, 2008.

| Modelos  | $R$    | $Y_0$  | $y_f$   | $R^2$         | $QMR$         |
|--|--------|--------|---------|---------------|---------------|
| <b>Período: 09/nov/2006 – 09/Jan/2007 (A)</b>  |        |        |         |               |               |
| <b>Logístico</b>                               | 0,0100 | 0,2934 | 0,4281  | 0,7753        | 0,0626        |
| <b>Monomolecular</b>                           | 0,0034 | 0,2938 | 0,42357 | <b>0,8005</b> | <b>0,0065</b> |
| <b>Gompertz</b>                                | 0,0061 | 0,2936 | 0,4260  | 0,7859        | 0,0223        |
| <b>Exponencial</b>                             | 0,0065 | 0,2933 | 0,4315  | 0,7614        | 0,0291        |
| <b>Período : 09/mar/2007 – 21/jun/2007 (C)</b> |        |        |         |               |               |
| <b>Logístico</b>                               | 0,0067 | 0,1962 | 0,5219  | 0,9255        | 0,0354        |
| <b>Monomolecular</b>                           | 0,0029 | 0,0809 | 0,5172  | <b>0,9335</b> | <b>0,0058</b> |
| <b>Gompertz</b>                                | 0,0045 | 0,1656 | 0,5197  | 0,9299        | 0,0152        |
| <b>Exponencial</b>                             | 0,0038 | 0,2243 | 0,5270  | 0,9133        | 13,255        |

Os ajustes individuais do melhor modelo para cada período encontram-se descritos na FIGURA 13.





**FIGURA 13: Curvas de progresso da Sigatoka amarela em Coronel Pacheco - MG, para os diferentes períodos ao longo do ano (A – estação chuvosa, e B – estação da seca), com as equações dos melhores modelos ajustados. Índice de infecção estimado (linha contínua), índice de infecção real (pontos). UFLA, Lavras – MG, 2008.**

Em ambos os picos de severidade, após a doença ter atingido o índice máximo, não ocorreu a estabilização das lesões. Isso, certamente se deve ao fato da fórmula de índice de infecção levar em consideração a avaliação em todas as folhas da planta, inclusive as mais novas (folhas 0, 1, 2 e 3), que raramente expressam os sintomas. Nestes casos, as quedas de severidade após os picos, ocorreram devido ao hospedeiro desenvolver-se mais rapidamente do que o

patógeno, ou seja, as taxas de emissão foliar foram mais acentuadas do que o progresso da doença. Essa relação inversa foi constatada pela correlação negativa estatisticamente significativa (-0,4225\*) entre a TEF/D (Taxa de emissão foliar diária) e o IF (índice de infecção). Já em julho, o progresso da doença, prevaleceu sobre o desenvolvimento vegetativo do hospedeiro, tendo resultado no pico com maior índice de infecção

Verificou-se assim, que apesar da doença apresentar uma taxa de progresso maior durante os meses mais chuvosos do ano, o hospedeiro apresenta também uma velocidade de desenvolvimento vegetativo intensa, evidenciada com o lançamento de novas folhas em curtos intervalos de tempo, menores até do que os períodos de incubação da Sigatoka amarela. Neste sentido, observa-se que a estratégia de desfolha parcial (cirurgias) das áreas foliares lesionadas é bastante positiva uma vez que reduz a concentração de propágulos do patógeno, impedindo que a característica policíclica tenha continuidade. Na estação seca do ano, entretanto, as taxas de progresso foram bem menores, porém as emissões foliares também reduziram-se consideravelmente, culminando com um segundo pico de maior intensidade. Conforme verificado nas coletas de esporos, o segundo pico de intensidade da doença teve como principal responsável as elevadas concentrações de ascósporos, os quais são disseminados pelo vento a distâncias bem maiores. Nestes casos, existe uma tendência de estabilização do progresso da doença em patamares mais elevados, caso haja a paralisação da emissão foliar. Esta tendência pode ser evitada com a destruição e retirada dos restos culturais do bananal, possibilitando que novas folhas sejam lançadas, com menores índices da doença.

### **5.5 - Monitoramento da concentração de conídios e ascósporos de *Mycospaherella musicola***

As coletas dos esporos de *M. musicola* foram realizadas entre o período de março de 2007 a outubro do mesmo ano. Nas avaliações iniciais, em março, as concentrações de conídios foram relativamente altas, em torno de 1800/m<sup>3</sup>, tendo sido associada às chuvas de verão. A partir de meados de abril, quando teve início o período de seca, elevaram-se consideravelmente as concentrações de ascósporos, sendo esta tendência seguida posteriormente pela elevação na concentração de conídios também. No mês de junho houve uma significativa queda na concentração de ambos os esporos, o que pode ser explicado pela desfolha realizada em todo o bananal pelo produtor, com o objetivo de reduzir o inóculo. Entretanto, logo ao final do mês de julho, no início da estação seca, as concentrações novamente tornaram a subir, evidenciando que apesar da falta de chuvas, as freqüentes ocorrências de pesados orvalhos foram suficientes dar continuidade a liberação dos esporos, com predominância para os ascósporos. Entre os meses de agosto a outubro, foram verificadas as mais baixas taxas de umidade relativa do ar durante todo o ano tendo acarretado um decréscimo tanto na concentração de esporos quanto dos índices de infecção. Ao final de outubro, com a ocorrência das primeiras chuvas da primavera, as concentrações de conídios e ascósporos voltaram a crescer (FIGURA 14).

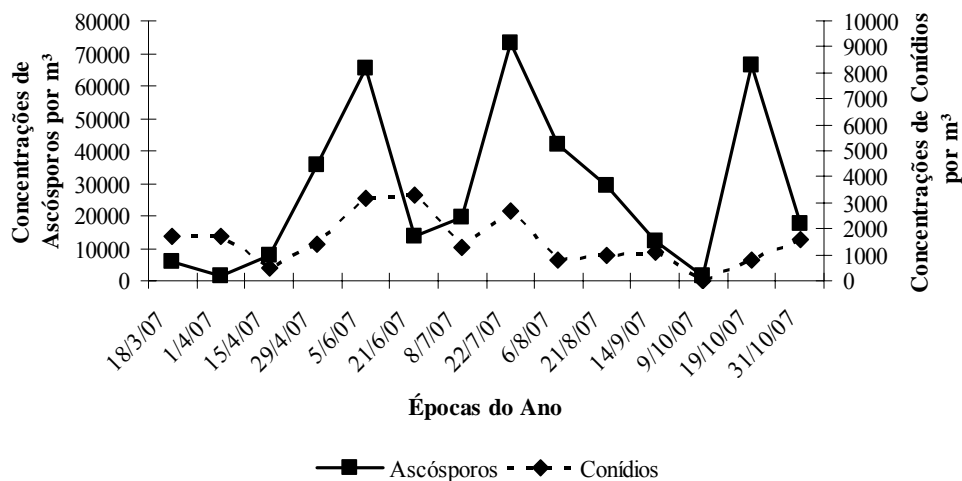


FIGURA 14: **Variações nas concentrações de ascósporos e conídios da Sigatoka – amarela em Coronel Pacheco – MG. UFLA, Lavras – MG, 2008.**

Em todas as avaliações, verificou-se concentração de ascósporos superior à de conídios, contrapondo o que afirmam os relatos na literatura de que as produções de conídios são bem superiores às de ascósporos Burt et al. (1997). No entanto, para que haja a disseminação dos conídios, é necessário a ocorrência de um filme d'água livre sobre as folhas, sendo dispersos pelos respingos e gotejamentos, já os ascósporos necessitam apenas de uma atmosfera com elevada umidade relativa, sendo dispersos pelo vento (Stover & Simmonds, 1987). Como as armadilhas para a captura dos esporos estavam localizadas entre as plantas e não sob as mesmas, observou-se que foi maior a eficiência para quantificar os ascósporos.

Apesar das concentrações de conídios terem sido observadas em picos similares às dos ascósporos deve-se considerar o fato que na época fria do ano, muito provavelmente estes propágulos pouco tenham encontrado as condições ideais para a ocorrência de germinação e penetração.

Em todas as avaliações não houve diferença significativa entre as concentrações dos esporos nas duas alturas avaliadas, tendo sido comprovada pelas altas correlações (TABELA 4). Estas mesmas tendências foram observadas por Burt et al. (1997), ao avaliarem as concentrações de conídios e ascósporos de *Sigatoka* na Costa Rica em três diferentes alturas (3,0; 2,0, e 1,5m).

**TABELA 4: Correlação entre as concentrações totais ao longo do dia de ascósporos e conídios de *M. musicola* nas duas diferentes alturas (1,5m e 3,0m). UFLA, Lavras – MG, 2008.**

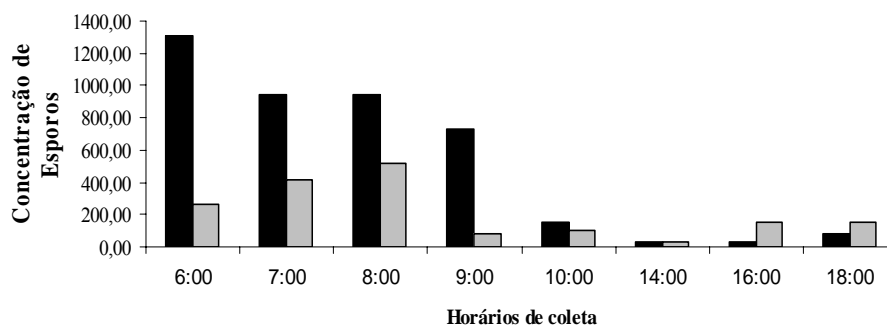
|             | Asc. Baixo  | Asc. Alto  |
|-------------|-------------|------------|
| Asc. Baixo  | -           | 0,8520**   |
| Asc. Alto   | 0,8520**    | -          |
|             | Coni. Baixo | Coni. Alto |
| Coni. Baixo | -           | 0,7242**   |
| Coni. Alto  | 0,5701*     | -          |

\*\* significativo a 1% de probabilidade; \* significativo a 5% de probabilidade.

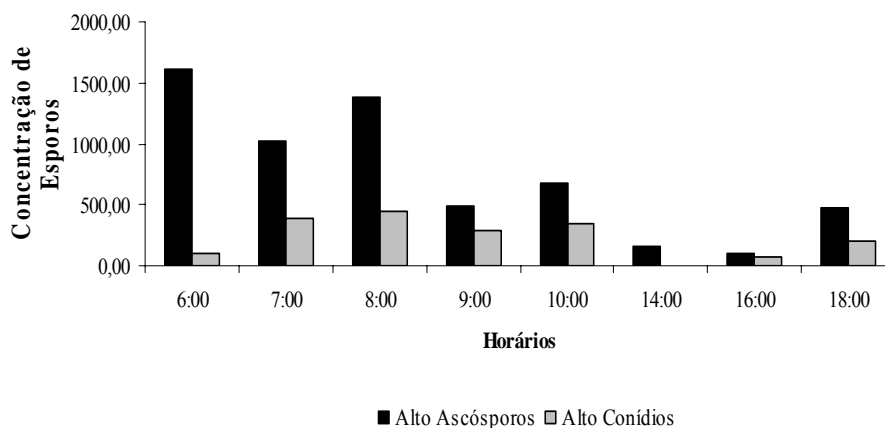
Tanto na estação chuvosa quanto na época mais seca do ano, as maiores concentrações de esporos ocorreram durante as primeiras horas do dia.

Entre 14:00 e 16:00hs observou-se considerável diminuição de conídios e ascósporos, o que se deve principalmente à baixa umidade relativa associada às mais altas temperaturas durante todo o dia.

**Concentração de Ascósporos e Conídios coletados a 1,5 m de altura  
(mar/07)**

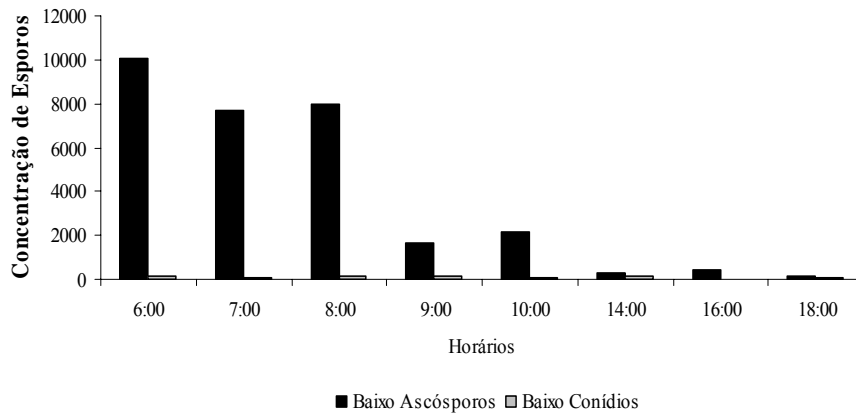


**Concentração de Ascósporos e Conídios Coletados à 3,0 m de Altura  
(Mar/07)**

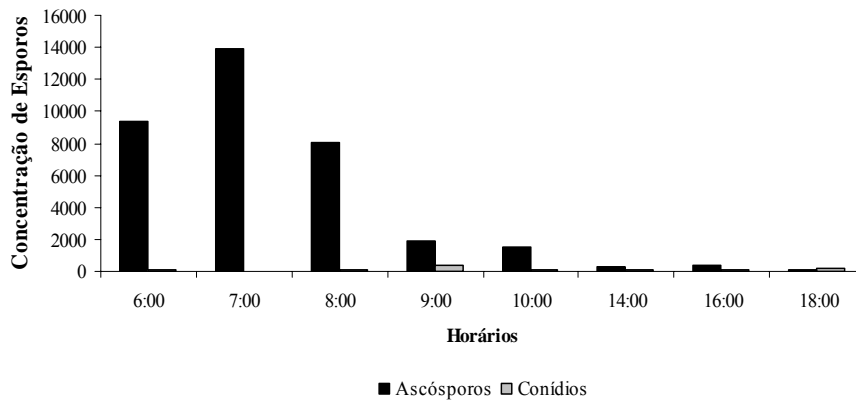


**FIGURA 15: Oscilações nas concentrações de Ascósporos e Conídios da Sigatoka amarela ao longo do dia coletados nas posições Baixa (1,5m) e Alta (3,0 m) em Coronel Pacheco - MG, durante a época das chuvas. UFLA, Lavras – MG, 2008.**

**Concentração de Ascósporos e Conídios Coletados a 1,5m de Altura  
(Ago/07)**



**Concentração de Ascósporos e Conídios Coletados à 3,0 m de Altura  
(Ago/07)**



**FIGURA 16: Oscilações nas concentrações de Ascósporos e Conídios da Sigatoka amarela ao longo do dia coletados nas posições Baixa (1,5m) e Alta (3,0 m) em Coronel Pacheco - MG, durante a época mais seca do ano. UFLA, Lavras – MG, 2008.**

Comparando as concentrações dos ascósporos nas duas épocas, observa-se uma redução de aproximadamente 16% na seca em relação ao período chuvoso, com exceção para as contagens da parte mais alta às 7:00 hs, a qual apresentou um valor não diferente do obtido durante a estação chuvosa. Esses dados seguem a mesma tendência descrita por Leach, e citada por Wardlaw (1961), admitindo a descarga de ascósporos com as elevações da umidade relativa do ar, sem a necessidade de um filme d'água sobre as folhas.

Com relação às concentrações de conídios, observou-se que as maiores quantidades não são observadas logo ao amanhecer, mas a partir das 7:00hs, atingindo o ápice às 8:00hs. Segundo Wardlaw (1961), os acérvulos (conidióforos) devem estar cobertos com um filme d'água durante várias horas até que os conídios possam ser transportados pelos respingos. De fato, o que se observou nas primeiras horas de coleta, foi uma retenção da água do orvalho nas superfícies adaxial e abaxial das folhas, e com os primeiros raios do sol, havia a falsa impressão da ocorrência de uma chuva, tamanho era o gotejamento da água despreendida dos limbos foliares. Já na estação seca, quando não se observava sequer a formação de orvalho nas folhas as contagens de conídios foram quase desprezíveis em relação às dos ascósporos. Essas respostas demonstram que a umidade relativa média de 73% ocorrida durante o mês de agosto foi suficiente para provocar a liberação dos ascósporos.

Na análise da distribuição da concentração de conídios e ascósporos nos diferentes horários do dia, somente os ascósporos apresentaram correlações significativas positivas com o índice de infecção, após vinte e nove dias da avaliação (TABELA 5), o que é justificado pela duração média do período de incubação da doença. Stahel (1937), descreveu um período mínimo de 28 dias para o aparecimento das primeiras lesões visíveis a olho nu, a partir da inoculação, tendo afirmado ainda que este período pode ser consideravelmente maior.



TABELA 5: Correlação entre as concentrações de ascósporos de *Mycosphaerella musicola* coletadas ao longo do dia nas duas alturas (1,5m e 3,0m) e os Índices de Infecção após diferentes períodos. UFLA, Lavras – MG, 2008.

| Horário de Coleta | Posição de Coleta | Correlações com os Índices de Infecção |              |              |              |              |
|-------------------|-------------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                   |                   | Mesmo dia                              | 15 dias após | 29 dias após | 43 dias após | 80 dias após |
| 6:00hs            | 1,5 m             | 0,09                                   | 0,41         | 0,48         | 0,27         | 0,21         |
|                   | 3,0 m             | 0,20                                   | 0,49         | <b>0,58*</b> | 0,22         | 0,17         |
| 7:00hs            | 1,5 m             | 0,12                                   | 0,43         | 0,54         | 0,27         | 0,21         |
|                   | 3,0 m             | 0,22                                   | 0,46         | 0,48         | 0,08         | 0,01         |
| 8:00hs            | 1,5 m             | 0,13                                   | 0,39         | 0,52         | 0,25         | 0,15         |
|                   | 3,0 m             | 0,20                                   | 0,38         | 0,55         | 0,13         | 0,01         |
| 9:00hs            | 1,5 m             | -0,01                                  | 0,28         | 0,50         | 0,29         | 0,25         |
|                   | 3,0 m             | 0,03                                   | 0,28         | 0,48         | 0,28         | 0,21         |
| 10:00hs           | 1,5 m             | -0,31                                  | -0,41        | 0,10         | -0,51        | -0,53        |
|                   | 3,0 m             | -0,27                                  | -0,20        | 0,47         | 0,08         | 0,09         |
| 14:00hs           | 1,5 m             | -0,45                                  | -0,10        | 0,54         | 0,49         | 0,33         |
|                   | 3,0 m             | -0,29                                  | -0,17        | 0,48         | 0,30         | 0,19         |
| 16:00hs           | 1,5 m             | -0,43                                  | -0,18        | 0,47         | 0,58         | 0,47         |
|                   | 3,0 m             | -0,07                                  | 0,12         | 0,50         | 0,51         | 0,33         |
| 18:00hs           | 1,5 m             | -0,18                                  | 0,07         | <b>0,61*</b> | 0,52         | 0,49         |
|                   | 3,0 m             | -0,23                                  | 0,01         | 0,56         | 0,59         | 0,52         |

\* significativo a 5% de probabilidade.

Esses resultados demonstram a duração média do monociclo da doença e podem auxiliar no estabelecimento de um cronograma de pulverizações e de manejo para retirada das fontes de inóculo das áreas afetadas, sob essas mesmas condições climáticas.

## 6. CONCLUSÕES

- A curva de progresso da Sigatoka amarela, em Coronel Pacheco - MG apresenta dois períodos de maior severidade, sendo o primeiro verificado na estação chuvosa e o segundo na estação mais seca do ano.
- As altas severidades observadas no período chuvoso foram predominantemente causadas por infecções de conídios e no período da estação seca, predominantemente por ascósporos.
- As variáveis climáticas mais associadas ao progresso da doença foram a pluviosidade, umidade relativa e o molhamento foliar.
- Na estação chuvosa o progresso da doença acompanha o desenvolvimento vegetativo do hospedeiro, sendo verificados os menores períodos para o desenvolvimento de novas lesões.
- Na estação seca, as lesões intensificam a severidade da doença em função do menor desenvolvimento vegetativo do hospedeiro.
- O progresso da doença ajusta-se ao modelo monomolecular tanto na época das chuvas quanto na época seca.
- A representatividade da concentração dos esporos em uma dada área pode ser obtida tanto nas coletas à 1,5 m quanto à 3,0m de altura.
- É possível correlacionar a concentração de ascósporos com a severidade da doença após 29 dias das contagens.
- A liberação dos ascósporos ocorre predominantemente no início da manhã enquanto a dos conídios só se verifica após o escoamento do orvalho sobre as folhas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGAMIN FILHO, A. Curvas de progresso de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. p. 602-626.

BRUN, J. **La Cercosporiose du bananier en Guinée. Etude de la phase ascosporee de *Mycosphaerella musicola* Leach**. 1963. Thèse (Doctorat ès science) – University of Orsay, Paris.

BURT, P.J.A.; RUTTER, J.; GONZALES, H. Short –distance wind dispersal of the fungal pathogens causing Sigatoka diseases in banana and plantain. **Plant Pathology**, Oxford, v. 46 451-458, 1997.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: J. Wiley, 1990.

CALPOUZOS, L; THIES, T.; COLBERG, C.; RIVERA, C.M.; SANTIAGO, A. Relationship between climatic factors and incidence of the Sigatoka leaf-spot disease of bananas. **Plant Disease Reporter**, Beltsville, v. 46 p. 758-761. 1962.

CALPOUZOS, L; COLBERG, C.; RIOLLANO, A.; RAMOS, C.; THIES, T. The control of Sigatoka disease of bananas by oil-spray schedules based on rainfall data. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, Porto Rico, v. 48 p. 32-38. 1964.

FOURÉ, E. Les cercosporioses du bananier et leurs traitements: Etude de la sensibilité variable des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon. **Fruits**, Paris, v.37, p. 749-771, 1982..

FRY, W.E. **Principles of plant disease management**. New York: Academic, 1982.

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

GUYOT, H.; CUILLE, J. Essai de prevision d'attaques de *Cercospora* em Guadalupe. **Fruits**, Paris, v.13, n.4, p. 85-94, 1958.

LARANJEIRA, F.F.; FILHO, A.B.; AMORIM L.; BERGER, R.; GOTTWALD, T.R. Dinâmica Temporal da Clorose Variegada dos Citrus em Três Regiões do Estado de São Paulo **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.5, set./out. 2003.

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

MASS, P.W.T. Jaarverslag. **Mededelingen Landbouproefstation Profstn.**, Suriname, v. 42, p. 91-100, 1967.

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

POZZA, E.A. **Manejo de epidemias de doenças de plantas**. Lavras: UFLA, 2000.

SIMMONDS, N.W. **Bananas**. 2nd ed. London: Longman, Green & Co., 1966. 512 p.

STAHEL, G. Banana Leaf Spot ('*Cercospora musae*'). **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.14, p. 56-60, 1937.

STOVER, R. H. A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot (*Mycosphaerella musicola*). **Tropical Agriculture**, v. 48, 1971. p. 185 – 196.

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

STOVER, R. H. SIMMONDS, N.W. **Bananas**. Harlow: Longman, 1987.

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

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.

ZADOCS, J.C.; SCHEIN, R.D. **Epidemiology and plant disease manegement**. New York: Oxford University, 1979. 427p.

### **CAPÍTULO 3**

#### **AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS MONOCÍCLICOS DA SIGATOKA AMARELA, LIGNINA E FENOIS TOTAIS, EM MUDAS DE BANANEIRA.**

## 1 RESUMO

ROCHA, Hermínio Souza. Avaliação de parâmetros monocíclicos da sigatoka amarela, lignina e fenóis totais, em mudas de bananeira. In:\_\_\_\_\_. **Epidemiologia da sigatoka amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microssatélites.** 2008. Cap. 3, p. 69-102. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

Para definir as variáveis de maior importância no progresso da doença é necessário conhecer as particularidades do monociclo. Os períodos de incubação e de latência do mal-de-Sigatoka são influenciados pela temperatura, chuva e umidade relativa. Além disso, poucas são as informações sobre os níveis de fenóis e lignina durante o processo infeccioso da Sigatoka amarela, bem como os efeitos das variações climáticas e dos genótipos sobre a concentração destes metabólitos secundários. Diante disso, foram avaliados no presente trabalho os detalhes do monociclo do isolado de *M. musicola* originário de Coronel Pacheco – MG, assim como a dinâmica das concentrações de fenóis totais e lignina em diferentes genótipos de bananeira ('Grande naine'; 'Pacovan'; 'Prata Zulu' e 'Caipira') artificialmente inoculados e submetidos à diferentes temperaturas (20; 24 e 28 °C). Após as inoculações nas folhas 'zero'; 'um' e 'dois', as plantas foram transferidas para câmaras úmidas e mantidas sob umidade relativa próximo a 100% durante 4h diariamente. O comportamento do isolado de *M. musicola* originário de Coronel Pacheco – MG, quanto ao monociclo da doença não foi diferente do observado na literatura, sendo os menores períodos de incubação observados na temperatura de 24 °C. A variedade Grande naine foi a mais suscetível, apresentando a maior AACPSD (Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade da Doença) e também o menor período de latência. As concentrações de fenóis totais não se alteraram ao longo do progresso da doença. Entretanto, as variedades Caipira e Prata Zulu apresentaram os maiores teores de lignina após cinco dias da inoculação, o que denota ser este, um dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência.

---

\* Comitê Orientador: Edson Ampélio Pozza – UFLA (Orientador), Zilton José Maciel Cordeiro – Embrapa CNPMF (Co-Orientador).

## 2 ABSTRACT

ROCHA, Herminio Souza. Evaluation of Parameters in the Yellow-Sigatoka Monocycle, Total phenolics and Lignin, in Banana Plantlets. In: \_\_\_\_\_. **Epidemiology of yellow Sigatoka, phenols quantification in banana varieties and phylogenetic analysis of *Mycosphaerella musicola* isolates using microsatellites.** 2008. Chap. 3, p. 69-102. Thesis (Doctor Degree in Plant Pathology) – Lavras Federal University, Lavras..\*

To define the most important variables in the disease progress it is necessary to know the particularities of the disease monocycle. Both the incubation and latency periods of Yellow-Sigatoka are influenced by temperature, rain and relative humidity. Besides this, few are the information about the levels of total phenolics and lignin during the infectious process of Yellow-Sigatoka as well as the effects of climatic variations and the genotypes over the concentrations of these secondary metabolites. In this sense, the present work evaluated the details of the monocycle of a specific Yellow-Sigatoka isolate from the city of Coronel Pacheco in the state of Minas Gerais, Brazil, as well as the dynamics of the concentrations of total phenolics and lignin in different banana genotypes ('Grande naine'; 'Pacovan'; 'Prata Zulu' e 'Caipira') artificially inoculated and submitted to different temperatures (20; 24 and 28 °C). After having inoculated leaves 'zero'; 'one' and 'two', the plants were transferred to humid chambers and kept under 100% relative humidity daily during 4 hours. The behavior of this *M. musicola* isolate from Coronel Pacheco – MG, regarding the disease monocycle was not different than the registrations seen in literature, with the shorter incubation periods being observed under the 24 °C. Grande naine variety was the most susceptible of all tested, presenting the largest AUDSPC (Area Under Disease Severity Progress Curve) and also the smallest latency period. Total phenolic concentrations did not alter along the disease progress. Nevertheless, Caipira and Prata Zulu varieties presented the highest lignin levels after five days of inoculation, which gives an evidence of being this, one of the biochemical mechanisms involved in the resistance.

---

\* Guidance Committee: Edson Ampélio Pozza – UFLA (Supervisor), Zilton José Maciel Cordeiro – Embrapa CNPMF (Co-Supervisor).

### 3 INTRODUÇÃO

O mal-de-Sigatoka tem como agente etiológico o fungo *Mycosphaerella musicola*, Leach, que é a forma perfeita ou sexuada do fungo, enquanto *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton corresponde à forma imperfeita ou assexuada. Mourichon (1994), afirma que a diversidade genética em *M. musicola* é resultante da reprodução sexuada e mais ainda da natureza heterotática, claramente demonstrada nesta espécie por Stover (1963).

As infecções causadas pela Sigatoka amarela resultam em uma necrose generalizada das folhas reduzindo consideravelmente a área fotossintetizante e como principal conseqüências causam redução significativa da produção, além de acelerar a maturação dos frutos mesmo quando ainda aderidos aos cachos, no campo. A Sigatoka amarela é uma doença endêmica no território Nacional, comprometendo grande parte da produção Brasileira de bananas.

Para definir as variáveis de maior importância no progresso da doença é necessário conhecer as particularidades do monociclo, ou seja, seus componentes. Dentre eles, os de maior importância são o período de incubação e o período de latência, ou seja, o período de tempo compreendido entre a inoculação e o aparecimento dos sintomas e o período de tempo compreendido entre a inoculação e a produção de esporos, respectivamente (Parlevliet, 1979).

Embora as infecções causadas por *M. musicola* ocorram nas folhas 'vela', 'um', 'dois' e 'três', os sintomas só são observados geralmente a partir da terceira, quarta ou quinta folha. Inicialmente, são observados pontos apresentando leve descoloração entre as nervuras secundárias. Estas áreas despigmentadas expandem-se e tornam o formato de estria de coloração marrom-escura. Com o progresso da doença, as estrias expandem-se radialmente e assumem o formato de manchas necróticas elíptico-alongadas e se dispõem paralelas às nervuras secundárias (Gasparotto et al. 2006).



O período de incubação do mal-de-Sigatoka é influenciado pela temperatura, chuva e umidade relativa. Nas épocas mais quentes e chuvosas do ano, o período de incubação da doença parece ser mais curto quando comparado com os das épocas mais frias e secas (Meredith, 1970; Stover, 1972; Martinez, 1973; Alvarez, 1991). Guyot & Cuille (1958) correlacionaram o desenvolvimento de lesões na folha com variações na temperatura e umidade relativa, tendo sido concluído que a severidade da doença e a redução dos períodos de incubação estavam sempre associados a essas variáveis ambientais. Da mesma forma, Moreu & Lebourdelles (1963) confirmaram que a temperatura e umidade relativa eram parâmetros importantes na ocorrência da doença. Martinez (1963), no Vale do Ribeira em São Paulo, observou maior incidência do patógeno dentro da faixa de temperatura de 24 a 29 °C.

Cordeiro (1997) avaliando a variabilidade patogênica em 18 isolados pode observar uma alta variabilidade em 15 deles, tendo atribuído esta particularidade, à ocorrência de reprodução sexuada, heterotalismo, anastomose de hifas e heterocariose. O autor afirma ainda que a variável período de incubação poderá funcionar como indicador da agressividade de isolados e/ou da magnitude da resistência.

Pouco se sabe sobre os níveis de fenóis e lignina durante o processo infeccioso da Sigatoka amarela, bem como os efeitos das variações climáticas e dos genótipos sobre a concentração destes metabólitos secundários. Os compostos fenólicos servem como defesa natural contra herbívoros e patógenos, tendo sido encontrada correlação entre os teores dessa substância com a resistência da planta (Misaghi, 1980; Goodman et al., 1986).

Assim, objetivou-se com este trabalho determinar os parâmetros monocíclicos para o isolado de *M. musicola* de Coronel Pacheco, MG, em plantas de bananeira artificialmente inoculadas, e avaliar também a dinâmica dos teores de fenóis totais e lignina durante a patogênese. Desta forma, é possível se

definir as variáveis mais importantes no progresso da doença além de se ter uma noção dos mecanismos bioquímicos envolvidos durante a patogênese.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em câmaras de crescimento com temperatura controlada, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, DFP/UFLA, em Lavras, MG, no período de setembro de 2007 a novembro do mesmo ano, tendo seguido as etapas descritas abaixo:

### 4.1 Isolamento do Patógeno

Seguindo a metodologia descrita por Cordeiro (1997), foram coletados pedaços de folhas, na área experimental de Coronel Pacheco, MG, apresentando lesões características da Sigatoka amarela, em estádios IV e V, de acordo com as descrições propostas por Burn (1963), citado por Stover (1972). Os segmentos de folhas foram primeiramente lavados com água de torneira e detergente e deixados para secar em papel toalha. Em seguida, foram extraídos pequenos pedaços de formato retangular na posição limítrofe entre a área lesionada e o tecido sadio, medindo aproximadamente 50 x 25 mm, os quais foram submetidos à desinfestação superficial, já em ambiente estéril, na câmara de fluxo laminar. Os tratamentos para a desinfestação consistiram de um banho em solução de álcool 70% durante 30 segundos, seguido da transferência para uma solução de hipoclorito de sódio a 1,25% durante 3 minutos, finalizando com a tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Após a desinfestação, procedeu-se à transferência das porções retangulares para placas de Petri, contendo meio BDA, as quais foram transferidas para estufa incubadora BOD com temperatura ajustada para 25°C e fotoperíodo de 12 h. Após 48 h, as placas foram abertas sob microscópio estereoscópico para identificação dos esporodóquios, e com o auxílio de estilete de ponta fina, flambado, procedeu-se à transferência dos conídios para outra

placa de Petri contendo meio V8. Após 5 - 7 dias foi possível visualizar as colônias compactas de coloração acinzentada, crescendo no meio de cultura.

#### **4.2 Indução de esporulação**

Em câmara de fluxo laminar, procedeu-se a maceração com bastão de vidro, das colônias do isolado de *M. musicola* mantidas em BOD. Em seguida, foram diluídas em água destilada e deionizada, e espalhadas sobre a superfície de placas de Petri contendo meio V8. As placas foram seladas com filme plástico em  $\frac{3}{4}$  de seu perímetro, e transferidas novamente para BOD, com temperatura ajustada para 28 °C e fotoperíodo de 12 hs. Após 10 dias de incubação, adicionou-se 15 mL de água destilada esterilizada sobre as colônias e procedeu-se a liberação dos conídios com pincel, que era passado sobre as colônias com movimentos suaves. Após 15 minutos do pincelamento, a suspensão obtida foi filtrada e quantificada sua concentração em câmara de Newbauer. Com as devidas diluições, ajustou-se a concentração de esporos para  $4.10^4$  conídios/mL.

#### **4.3 Teste de patogenicidade**

O teste de patogenicidade foi realizado utilizando a variedade Grande Naine por sua conhecida característica de alta suscetibilidade à Sigatoka amarela. Mudas micropropagadas medindo aproximadamente 25 cm foram inoculadas por atomização tanto na superfície adaxial quanto abaxial das folhas 0, 1 e 2. Após a inoculação seguiu-se um período de 48 horas sob câmara úmida sendo posteriormente submetidas à alternância de períodos de altas e baixas umidades relativas (16 horas de alta umidade e 6 horas de baixa). Após 60 dias, pôde-se observar os sinais característicos da doença.

#### **4.4 Inoculações em plantas mantidas em câmaras úmidas**

Para as inoculações, foram utilizadas plantas micropropagadas de duas variedades resistentes à Sigatoka amarela, Caipira (AAA) e Prata Zulu (AAB), e duas variedades suscetíveis, Pacovan (AAB) e Grande Naine (AAA).

As inoculações foram realizadas com atomizador plástico, com uma suspensão de  $4.10^4$  conídios/mL até o ponto de escorrimento, nas folhas zero, um e dois, tanto nas superfícies abaxial quanto adaxial das plantas. Após inoculadas as folhas foram marcadas com fitas plásticas coloridas, para que as avaliações fossem sempre nas mesmas bases.

Em seguida, as plantas foram transferidas para o interior de câmaras úmidas, com temperatura e umidade relativa controladas (FIGURA 1). Foram utilizadas três diferentes câmaras (20°, 24° e 28° C), sendo todas vedadas nas laterais, acima e abaixo, com plástico transparente, selados com velcro, de modo a permitir a abertura diária. A finalidade neste caso foi proporcionar, com a abertura do plástico, uma rápida perda de água presente na superfície das folhas, a exemplo do que ocorre na natureza, com o orvalho depositado sobre as folhas durante a noite. O fotoperíodo foi de 12h diárias, mantido com lâmpadas fluorescentes brancas, instaladas na parte superior das câmaras, a uma altura média de 1,2m acima do nível médio das folhas das mudas. Nessas condições, a intensidade luminosa nas folhas era de 2000 – 2300 lux.



**FIGURA 1: Câmara úmida utilizada para promover condições ideais para a infecção por *Mycosphaerella musicola*, em mudas micropropagadas de bananeira. UFLA, Lavras, MG. 2008.**

A alta umidade relativa foi mantida por meio de um equipamento de nebulização ultra-sônico (**Humid air<sup>TM</sup>**), posicionado a 1,2m acima do nível.

Para a incubação, foi mantida a umidade relativa em 100%, durante as primeiras 72 hs, sendo posteriormente submetidas à alternância de 4h de alta umidade e 20h de baixa umidade, seguindo a metodologia de Goos & Tschirch (1963), descrita por Cordeiro (1997). Para que a umidade relativa se reduzisse o mais rapidamente possível, os plásticos frontais das câmaras eram removidos pela manhã e permaneciam abertos até o início do próximo turno de nebulização. O experimento foi avaliado durante 60 dias.

#### **4.5 Variáveis respostas avaliadas**

##### **4.5.1 Área abaixo da curva de progresso da severidade da Doença (AACPSD)**

O progresso da doença expresso pela severidade foi mensurado somente nas folhas inoculadas, utilizando-se a escala de Stover modificada por Gahul, demonstrada na FIGURA 3 do capítulo anterior e descrita abaixo. Utilizou-se a

porcentagem efetiva de severidade para cada grau da escala, separadamente, para as folhas 0, 1 e 2 de cada planta, aplicando a fórmula de AACPSD descrita abaixo. As avaliações foram realizadas após 60 dias das inoculações.

Nota 0 – Folha sem sintomas;

Nota 1 – Até 10 manchas na folha;

Nota 2 – Entre 1% e 5% do limbo foliar apresentando manchas;

Nota 3 – Entre 6% e 15% do limbo foliar apresentando manchas;

Nota 4 – Entre 16% e 33% do limbo foliar apresentando manchas;

Nota 5 – Entre 34% e 50% do limbo foliar apresentando manchas;

Nota 6 – Mais que 50% do limbo foliar apresentando manchas;

Traço – Folha totalmente necrosada, ainda retida junto ao pseudocaule.

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

Onde:

AACPSD = Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade da Doença;

Y<sub>i</sub> = proporção da doença na i-ésima observação;

T<sub>i</sub> = tempo em dias na i-ésima observação;

n = número total de observações.

A análise dos dados para esta variável foi realizada no esquema fatorial triplo (Temperaturas x Variedades x Folha inoculada), no delineamento em blocos casualizados, com duas repetições cada tratamento.

#### **4.5.2 Área abaixo da curva de progresso do número de lesões (AACPNL)**

Seguindo a metodologia descrita por Cordeiro (1997), utilizou-se um gabarito de plástico rígido de cor negra, com área retangular de 50 cm<sup>2</sup>, que

serviu para amostrar cada um dos quatro quadrantes do limbo foliar, nos quais se contava o número de lesões. As avaliações foram realizadas após 60 dias das inoculações. A posição dos quadrantes seguiu sempre a seguinte ordenação:

Quadrante 1: lado esquerdo inferior do limbo foliar, na superfície adaxial.

Quadrante 2: lado esquerdo superior do limbo foliar, na superfície adaxial.

Quadrante 3: lado direito inferior do limbo foliar, na superfície adaxial.

Quadrante 4: lado direito superior do limbo foliar, na superfície adaxial.

OBS: Posição inferior, refere-se à porção mais próxima à bainha foliar.

De posse das quantidades de lesões em cada quadrante, calculou-se a média das quatro leituras e, aplicou-se a fórmula da AACPNL, conforme descrita abaixo:

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

Onde:

AACPNL = Área Abaixo da Curva de Progresso do Número de Lesões;

Y<sub>i</sub> = proporção da doença na i-ésima observação;

T<sub>i</sub> = tempo em dias na i-ésima observação;

n = número total de observações.

A análise dos dados para esta variável foi realizada no esquema fatorial triplo (Temperaturas x Variedades x Folha inoculada), no delineamento em blocos casualizados, com duas repetições cada tratamento.



#### **4.5.3 Período de incubação (PI)**

Tempo decorrido, em dias, entre a inoculação e o aparecimento dos primeiros sintomas em quaisquer das folhas inoculadas.

A análise dos dados para esta variável foi realizada no esquema fatorial duplo (Temperaturas x Variedades), no delineamento em blocos casualizados, com duas repetições cada tratamento.

#### **4.5.4 Período de latência (PL)**

Tempo decorrido, em dias, entre a inoculação e o aparecimento da primeira lesão esporulada, estágio V, definido por Brun (1963), nas diferentes folhas de cada planta.

A análise dos dados para esta variável foi realizada no esquema fatorial triplo (Temperaturas x Variedades x Folha inoculada), no delineamento em blocos casualizados, com duas repetições cada tratamento.

#### **4.5.5 Período de desenvolvimento da doença (PDD)**

Tempo decorrido entre a inoculação e o aparecimento das primeiras 10 lesões esporuladas, nas diferentes folhas de cada planta.

Para a realização da análise estatística e verificação do efeito dos tratamentos foi utilizado o delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema fatorial duplo 4 x 3, sendo testadas quatro diferentes variedades em três temperaturas, com quatro repetições cada. A análise de variância e a discriminação entre os tratamentos foram realizados utilizando-se o programa estatístico SISVAR, do Departamento de Ciências Exatas da Universidade Federal de Lavras (DEX/UFLA). A análise de homogeneidade e normalidade dos dados foi realizada pelo programa SAS (The SAS System for Windows, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

#### **4.5.6 Preparo de extratos foliares para avaliação de lignina solúvel e fenóis solúveis totais**

Amostras foliares medindo 5cm<sup>2</sup> foram coletadas a partir da folha número 1, em todas as plantas (inoculadas e não inoculadas) mantidas na temperatura de 24 °C, nos diferentes tempos (5, 15 e 35 dias após inoculação), compondo assim, um esquema fatorial triplo (4 x 3 x 2) com 3 repetições cada. Os tecidos vegetais foliares foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 12 horas (liofilizador condensador L101, marca LIOBRAS). Uma alíquota de 30mg do material liofilizado foi transferida para micro tubo de 2 mL e homogeneizadas com 1,5 mL de metanol a 80% e mantidas sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz à temperatura ambiente. A solução foi centrifugada, a 12.000 g, por 5 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para novo microtubo, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para a determinação de lignina solúvel.

#### **4.5.7 Determinação de lignina solúvel**

Foi adicionado ao resíduo sólido 1,5 mL de metanol 80%, homogeneizado e centrifugado a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco, a 65 °C, por 15 horas. Posteriormente, acrescentou-se 1,5mL de solução de ácido tioglicólico:HCl 2M (1:10). Em seguida, agitaram-se suavemente os microtubos para hidratar o resíduo e estes foram colocados em banho-maria, a 100 °C, por 4 horas.

Posteriormente, os microtubos foram centrifugados, a 10.000g, por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5mL de água ultrapura e novamente centrifugados a 10.000g por 10 minutos.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 1,5 mL de NaOH 0,5M e mantido em agitador rotativo por 15 horas à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada, a 10.000g, por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em câmara fria (4°C), por 4 horas, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico.

A seguir, a mistura foi centrifugada, a 10.000g, por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspensão em 2 mL de NaOH 0,5M.

A absorvância desta solução foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina, sendo expresso em µg de lignina solúvel, por miligrama de matéria seca (adaptado de Doster & Bostock, 1988).

#### **4.5.8 Determinação de fenóis solúveis totais**

Aliquota de 150µL do extrato metanólico foi misturada a 150µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N, por 5 minutos, homogeneizada com 150µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M, por 10 minutos e diluída com 1 mL de água ultrapura à temperatura ambiente, por uma hora.

Os valores de absorvância desta reação foram determinados a 725 nm em espectrofotômetro e calculados com base na curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente µg de catecol por miligrama de matéria seca (Spanos & Wrolstad, 1990).

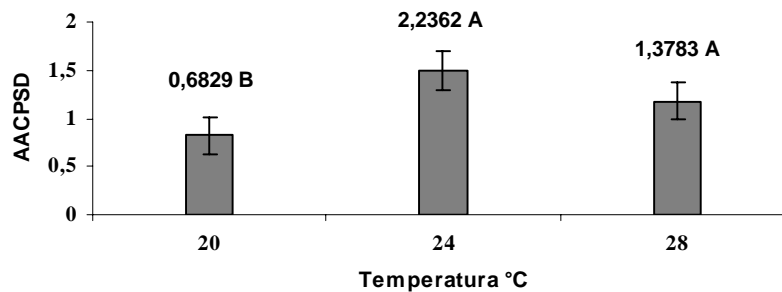
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- Área abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD)

Houve diferenças estatísticas significativas para os fatores temperatura e posição da folha isoladamente e também para a interação entre os fatores temperatura x variedade.

Quanto a temperatura, as maiores AACPSD foram verificadas a 24 °C (2,23) e 28 °C (1,37), para todas as variedades de bananeira testadas com o isolado de *Mycosphaerella musicola* proveniente de Coronel Pacheco (FIGURA 2). Segundo Stover (1980), somente em temperaturas acima de 20 °C, os esporos sobre as superfícies foliares irão penetrar os estômatos, desde que haja água livre próximo ao ponto de saturação, durante 48-72 horas. É justamente a partir da penetração das hifas fúngicas, através dos estômatos, que será desencadeado o processo de colonização do parênquima paliçádico, culminando com a necrose do tecido foliar. Por outro lado, Simmonds (1959), indicou que sob temperaturas acima de 26,67 °C ocorre inibição da esporulação e do crescimento vegetativo, e abaixo de 17,77 °C se previne infecções.

Para *Mycosphaerella fijiensis*, Jacome et al. (1991) verificaram uma resposta quadrática da temperatura sobre a germinação de conídios, com um ponto ótimo situado em 26,5 °C. Todavia, Mourichon et al.,(1997), afirmam que a Sigatoka amarela é mais adaptada às temperaturas mais frias e prevalece sobre a Sigatoka negra em altitudes acima de 1200 a 1400m, a qual situa-se muito próxima à faixa que produziu a maior AACPSD neste trabalho (FIGURA 2).



**FIGURA 2: Médias das áreas abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) de *Mycosphaerella musicola* nas diferentes temperaturas avaliadas. UFLA, Lavras - MG. 2008.**

As maiores áreas abaixo da curva de progresso da severidade da doença (AACPSD) relacionadas à posição da folha foram obtidas em inoculações realizadas nas folhas 0 e 1, com 1,83 e 1,49, respectivamente (TABELA 1). Resultados semelhantes foram reportados por Romero (1995) para *Mycosphaerella fijiensis*, tendo sido verificado que as folhas mais novas são mais suscetíveis (primeira a terceira) do que as mais velhas. Leach (1946) descreveu a importância da localização ou idade das folhas apresentando lesões, para a determinação do aumento ou decréscimo de doença entre avaliações. Segundo Stover (1980), o tempo necessário para haver a infecção coincide com a emissão foliar, podendo-se deduzir que a folha zero, recém lançada, é a mais suscetível à infecção e por conseguinte deve ser a mais afetada.

Com relação à interação entre os fatores variedade x temperatura, observou-se que a 20 °C não houve diferença entre as variáveis nas quatro variedades testadas (Grande Naine, Pacovan, Prata Zulu e Caipira). Entretanto, na temperatura de 24 °C foi verificado que a variedade Grande Naine apresentou maiores AACPSD em relação às demais, as quais não diferiram entre si.

**TABELA 1: Médias das áreas abaixo da curva de progresso da severidade da Doença (AACPSD) de *Mycosphaerella musicola* em relação às diferentes posições de folha avaliadas. UFLA, Lavras – MG. 2008.**

| <b>Folha Inoculada</b> | <b>AACPSD</b> |
|------------------------|---------------|
| 0                      | 1,8368 A      |
| 1                      | 1,4996 A      |
| 2                      | 0,8388 B      |

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 1% de probabilidade.

Já a 28 °C a variedade Grande Naine, foi que apresentou a menor AACPSD, invertendo a tendência de maior suscetibilidade dentre as variedades testadas (TABELA 2).

**TABELA 2: Médias das áreas abaixo da curva de progresso de severidade da doença (AACPSD) de *Mycosphaerella musicola* em função de três diferentes temperaturas e quatro variedades avaliadas. UFLA, Lavras - MG. 2008.**

| Variedades   | Temperaturas |          |          |
|--------------|--------------|----------|----------|
|              | 20°C         | 24°C     | 28°C     |
| Caipira      | 0,6483Ab     | 1,8466Ba | 1,6827Aa |
| Prata Zulu   | 0,6714Aa     | 1,3043Ba | 1,4277Aa |
| Pacovan      | 0,6663Ab     | 2,0070Ba | 1,7360Aa |
| Grande Naine | 0,7475Ab     | 4,2592Aa | 0,7851Bb |

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 1% de probabilidade.

Simmonds, citado por Wardlaw (1961) em Queensland, na Austrália, sugeriu que tanto o crescimento vegetativo quanto a esporulação de *M. musicola* retarda-se em temperaturas acima de 26,6 °C, e atribuiu parcialmente o decréscimo do progresso da doença durante o verão Australiano à ocorrência de temperaturas acima desta faixa.

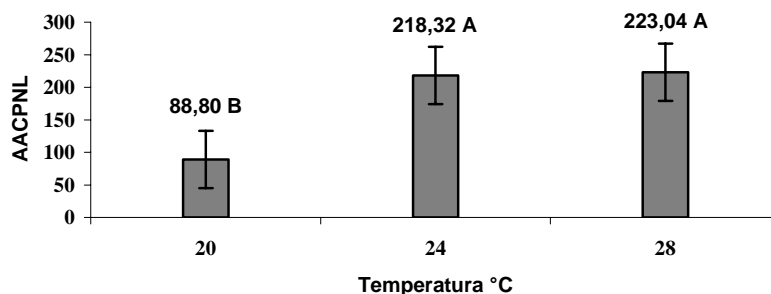
Por outro lado, se compararmos as três temperaturas dentro de cada variedade isoladamente, verifica-se que para os dois genótipos suscetíveis ('Grande Naine' e 'Pacovan'), as temperaturas resultantes em maiores AACPSD's foram 24 e 28 °C, sendo observadas as maiores médias para a variedade Grande Naine a 24 °C, corroborando com os relatos na literatura.

Estes resultados encontram respaldo na afirmação de Wardlaw (1961), quando o autor registra que o aparecimento de listras de coloração esverdeada para marrom, visíveis à olho nu, na segunda, terceira ou quarta folha, depende do genótipo, e das condições ambientais. Stover (1964) também afirma que o declínio na produção de peritécios e espermogônios está associado à uma queda na temperatura mínima diária abaixo de 21 °C, mesmo quando as chuvas foram abundantes.

## **5.2- Área abaixo da curva de progresso do número de lesões (AACPNL)**

Para esta variável os fatores temperatura (FIGURA 3) e posição da folha (TABELA 3) apresentaram significância isoladamente, com 1% de probabilidade. O fator variedade e todas as outras interações entre os fatores estudados não foram significativos.

Quanto ao fator temperatura, houve diferenças significativas, tendo sido verificados os maiores valores nas faixas de 24 °C (218,32) e 28 °C (223,04). Na temperatura de 20 °C média inferior foi observada (88,80) (FIGURA 3).



**FIGURA 3: Médias das áreas abaixo da curva de progresso do número de lesões (AACPNL) de *Mycosphaerella musicola* nas diferentes temperaturas avaliadas. UFLA, Lavras, MG - 2008.**

Esses resultados são justificados por Stover (1980), ao afirmar que o ciclo da doença tem início com a germinação de conídios e ascósporos na superfície foliar, e que este evento é dependente da umidade e temperatura; a penetração do tubo germinativo nos estômatos ocorre quando as temperaturas permanecem acima de 20 °C durante 2-3 dias e com a umidade relativa do ar próximo a 100%. Com relação à posição da folha verifica-se que as inoculações realizadas na folhas 0 resultaram nos maiores valores de AACPNL (225,07). As outras posições (1 e 2) não diferiram entre si, porém apresentaram médias inferiores (156,08 e 119,00, respectivamente), (TABELA 3). Segundo Meredith (1970) as duas folhas mais novas após a vela, raramente apresentam sintomas da doença, sendo os primeiros sintomas visíveis entre 11 e 106 dias após a germinação. Estes resultados seguiram a mesma tendência verificada para a variável AACPSD.



**TABELA 3 Médias das áreas abaixo da curva de progresso do número de lesões (AACPNL) de *Mycosphaerella musicola* em relação às diferentes posições de folhas inoculadas. UFLA, Lavras, MG - 2008.**

| Folha inoculada | AACPNL              |
|-----------------|---------------------|
| 0               | 255,07 <sup>a</sup> |
| 1               | 156,08B             |
| 2               | 119,00B             |

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 1% de probabilidade.

### **5-3 Período de incubação (PI):**

O período de incubação, apresentou significância estatística para os fatores temperatura e variedades isoladamente.

Os mais curtos períodos de incubação, que denotam uma maior agressividade do isolado, foram observados na temperatura de 24 °C (21,31 dias), sendo que nas temperaturas de 28 e 20 °C a duração foi superior e igual entre ambas (FIGURA 4).

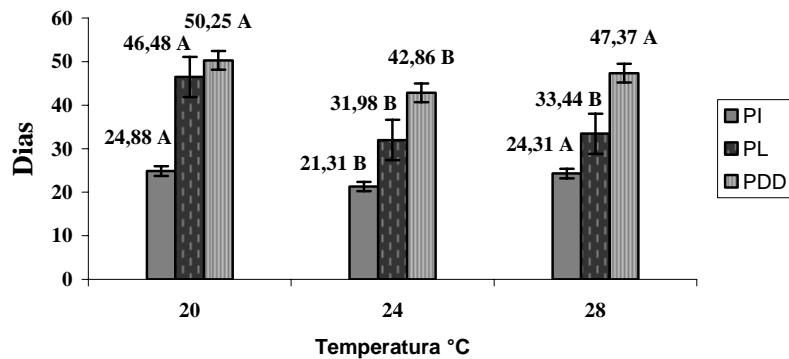


FIGURA 4: Médias dos períodos de incubação (PI), períodos de latência (PL) e períodos de desenvolvimento da doença (PDD) de *Mycosphaerella musicola* nas diferentes temperaturas avaliadas. UFLA, Lavras, MG - 2008.

Na Costa Rica, sob condições climáticas favoráveis, e com hospedeiros suscetíveis, o período de incubação pode ser tão curto quanto 13-14 dias, ao passo que sob condições climáticas desfavoráveis, a duração deste pode se estender por até 35 dias, para *Mycosphaerella fijiensis* (Marin et al., 2003).

Mouliom-Pefoura et al. (1996) comparando o progresso da Sigatoka negra e amarela em bananas e plátanos nas várias zonas ecológicas da República dos Camarões reportaram que sob elevadas altitudes, caracterizada por temperaturas mínimas em torno de 18 a 15 °C, foram verificados períodos de incubação para *Mycosphaerella musicola* inferiores em relação à *M. fijiensis* (15 a 18 dias e 22-25 dias, respectivamente). Este fato, segundo os autores pode ser atribuído à dominância da Sigatoka amarela em regiões de elevada altitude.

Para as diferentes variedades testadas, tanto ‘Grande Naine’ quanto ‘Pacovan’ apresentaram os menores períodos de incubação (20,83 e 20,66, respectivamente) (TABELA 4), devido ao fato de ambas serem genótipos suscetíveis à Sigatoka amarela (Gasparotto et al. 2006). Os dois genótipos

resistentes não diferiram estatisticamente entre si, e apresentaram os maiores valores para esta variável.

Variedades de bananeiras suscetíveis a *M. musicola* e *M. fijiensis* apresentam menor período de incubação e maior número de manchas e esporulação nas folhas do que outras variedades resistentes. Com o aumento do nível de resistência, aumenta-se também o tempo de transição entre os estádios de evolução da doença.

**TABELA 4 Médias, em dias, do período de incubação (PI) de *Mycosphaerella musicola* nas diferentes variedades de bananeira avaliadas. UFLA, Lavras - MG. 2008.**

| Variedades   | PI (Dias) |
|--------------|-----------|
| Pacovan      | 20,6666B  |
| Grande Naine | 20,8333B  |
| Prata Zulu   | 26,1666A  |
| Caipira      | 26,3333A  |

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 1% de probabilidade.

Em algumas variedades resistentes, o progresso dos sintomas é interrompido nos primeiros estádios (Stover, 1972; Meredith, 1970; Fouré, 1985; Fouré et al., 1990).

#### **5.4 Período de Latência**

O período de latência apresentou significância estatística para os fatores temperatura, variedades e posição da folha isoladamente. Os menores períodos foram observados nas temperaturas de 24 e 28 °C igualmente, e a variedade Grande Naine destacou-se em relação às demais, com o menor valor para esta variável. O período de incubação, tal qual o período de latência também varia conforme as condições climáticas, suscetibilidade do hospedeiro e as

intensidades das infecções (Marin et al., 2003). Na Costa Rica, esta variável em ‘Grande Naine’ teve duração de 25 até 70 dias, na estação chuvosa e seca, respectivamente, para *M.fijiensis*.

Contrariamente aos resultados verificados neste trabalho, Wardlaw (1961) afirma como regra, que a doença atinge sua máxima atividade durante os períodos de temperaturas mínimas e máxima umidade. Certamente estas observações se devem à influência negativa das baixas temperaturas sob o desenvolvimento vegetativo do hospedeiro, permitindo que o avanço da doença seja mais rápido do que a emissão de novas folhas.

Entretanto, Meredith (1970), observa o início da esporulação na fase conidial após os estádios 4 e 5 da escala de Brun, sendo o nível máximo verificado nas temperaturas de 25 a 28 °C.

Cordeiro (1997), trabalhando com genótipos suscetíveis, ‘Nanicão’ e ‘Prata Anã’, observou com *M. musicola*, períodos de latência variando, em média, de 26 à 42,5 dias, e registrou a elevação nesta variável para 48 à 59,5 dias, nas mesmas variedades, quando as plantas foram previamente submetidas à indução de resistência.

**TABELA 6 Médias, em dias, do período de latência de *Mycosphaerella musicola* nas diferentes variedades de bananeira avaliadas. UFLA, Lavras - MG, 2008.**

| Variedades   | PL (Dias)            |
|--------------|----------------------|
| Pacovan      | 38,1428A             |
| Grande Naine | 33,1428B             |
| Prata Zulu   | 38,3333 <sup>a</sup> |
| Caipira      | 39,0322 <sup>a</sup> |

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 1% de probabilidade.

Gauhl (1994), reporta que o tempo entre a emissão foliar até o aparecimento da primeira lesão madura de Sigatoka negra, sob condições naturais, para a variedade Curare, tipo plátano, foi de 44 dias, enquanto para a ‘Valery’, do subgrupo cavendish, foi de 34 dias.

Apesar de detectada diferença estatística, pelo teste F, para o período de latência, em relação ao fator posição da folha, as médias não foram suficientemente grandes para separar as diferentes posições das folhas inoculadas no teste de média.

**TABELA 6 Médias, em dias, do período de latência de *Mycosphaerella musicola* nas diferentes posições da folha em plantas de bananeira . UFLA, Lavras - MG. 2008.**

| Posições da Folha | PL (Dias) |
|-------------------|-----------|
| 0                 | 35,5208A  |
| 1                 | 37,9787A  |
| 2                 | 37,9761A  |

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

### **5.5 Período de Desenvolvimento da Doença**

O período de desenvolvimento da doença que representa o intervalo de tempo em dias, entre a inoculação e o aparecimento do primeiro grupo de pelo menos dez lesões no estágio V da escala de Brun (1963) só foi mensurado para as variedades suscetíveis (Pacovan e Grande Naine), visto que, no caso das variedades resistentes, muitas das folhas não chegaram a apresentar o número mínimo de dez lesões, durante o intervalo de tempo em que foram avaliadas, ou seja, 60 dias após as inoculações. A quantificação desta variável é mais precisa do que a determinação do período de incubação, pois não depende da identificação dos sintomas iniciais, os quais aparecem inicialmente em escala microscópica e são de difícil percepção a olho nu (Gauhl et al. 2000).

Para esta variável, somente os fatores variedade e temperatura foram estatisticamente significativos independentemente. Observa-se na FIGURA 4, o mais curto período de desenvolvimento da doença sob 24 °C em relação às demais, tendo como média de 42,85 dias. Dentre as variedades testadas, a Grande Naine, alcançou o PDD em apenas 44,26 dias, diferenciando-se da Pacovan que levou, em média 50 dias.

Gauhl et al. (2000) observam que o período de desenvolvimento da doença difere entre a Sigatoka negra e amarela, entre variedades e é afetado por fatores ambientais e níveis de inóculo.

Neste caso, o menor PDD deveu-se certamente à característica da maior suscetibilidade da variedade Grande Naine, o que possibilitou o rápido desenvolvimento da doença, culminado com a esporulação das lesões.

### **5.6 Dinâmica da concentração de Fenóis totais e Lignina**

Para a concentração de fenóis totais, observou-se diferença estatística significativa para a variável Dias e também para a interação entre os fatores Dias x Folha Inoculada.

A concentração de fenóis não diferiu entre os tratamentos inoculados do não inoculado, o que pode ser atribuído ao fato que na espécie *Musa* sp, a concentração destes compostos secundários (fenóis) já seja elevada em nível constitutivo, visto que a sua elevada área foliar necessita de uma constante proteção contra herbivoria. A principal função relacionada aos compostos fenólicos está associada à defesa do vegetal contra fatores externos, bióticos e abióticos, pois se trata de um mecanismo de resistência bioquímico pré-formado pela planta (Pascholati & Leite, 1994). As classes de compostos fenólicos mais importantes são: a lignina, que fortalece mecanicamente as paredes celulares; os pigmentos flavanóides, que agem como uma proteção contra a radiação ultravioleta e como atrativos para os polinizadores e dispersores de sementes; os

taninos, os flavanóides e outros compostos fenólicos, atuam na defesa contra a herbivoria e os patógenos (Salgado, 2004).

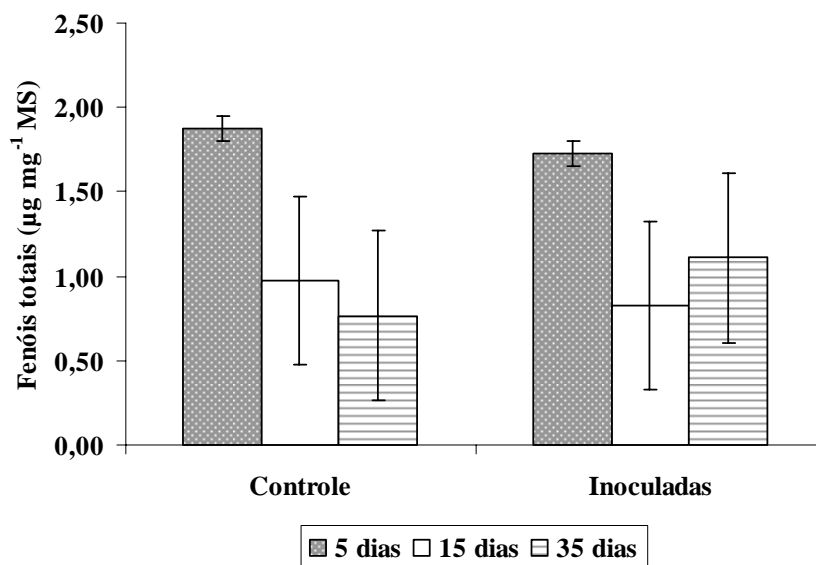


FIGURA 5: Concentração de fenóis totais ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  MS) em folhas de bananeira inoculadas ou não com *Mycosphaerella musicola* após diferentes dias de pulverização. C= controle; I= inoculadas. UFLA, Lavras-MG, 2008.

Houve diferenças estatísticas significativas para o fator Variedade e também para a interação entre os fatores Variedade x Dias x Inoculação para a concentração de Linina nas folhas ao longo do processo infeccioso

A lignina, juntamente com celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas superiores, funciona como uma barreira física à penetração fúngica (Vance et al., 1980). A lignificação pode impedir o desenvolvimento do fungo nos tecidos vegetais de várias maneiras: 1) estabelecimento de barreira mecânica ao avanço e ao crescimento do patógeno; 2) modificação da parede celular, tornando-a mais resistente ao ataque de

enzimas hidrolíticas; 3) aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelos patógenos, impedindo que nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (Cavalcanti et al., 2005).

**TABELA 7: Concentração de lignina ( $\mu\text{g mg}^{-1}$  MS) em folhas de diferentes variedades de bananeira inoculadas ou não com *Mycosphaerella musicola* após diferentes dias de pulverização. UFLA, Lavras-MG, 2008. C= controle; I= inoculadas.**

| Variedades de Bananeira | 5 Dias Após Inoculação |            | 15 Dias Após Inoculação |            | 35 Dias Após Inoculação |            |
|-------------------------|------------------------|------------|-------------------------|------------|-------------------------|------------|
|                         | I                      | C          | I                       | C          | I                       | C          |
| <b>Pacovan</b>          | 7,3819 Da              | 9,2646 Ca  | 9,4282 Ca               | 9,2521 Ba  | 9,8456 Ba               | 7,0228 Da  |
| <b>Grande naine</b>     | 9,9769 Ca              | 7,5832 Da  | 10,9895 Ba              | 9,5001 Ba  | 10,5153Ba               | 10,9921 Ca |
| <b>Caipira</b>          | 13,4646 Aa             | 10,4125 Bb | 13,0401 Aa              | 13,1947 Aa | 14,5201 Aa              | 13,3056 Aa |
| <b>Prata Zulu</b>       | 12,1076 Ba             | 12,3138 Aa | 12,8556 Aa              | 13,3474 Aa | 14,2880 Aa              | 12,0062 Ba |

As médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal não diferem entre si, pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 1% de probabilidade.

As variedades suscetíveis (Grande Naine e Pacovan) apresentaram concentrações de lignina estatisticamente iguais em folhas inoculadas ou não-inoculadas com *M. musicola*. Contudo, as concentrações de lignina nas variedades resistentes Prata Zulu e Caipira, inoculadas e não-inoculadas, foram estatisticamente superiores as concentrações das variedades suscetíveis, comprovando que a lignina é uma barreira constitutiva contra *M. musicola* nas variedades resistentes (TABELA 7).



A formação de lignina torna a parede celular das células vegetais rígidas e seu principal papel nos vegetais é a sustentação da planta. Sua resistência física e estabilidade química desempenham papel secundário, porém, importante como proteção celular contra insetos, por ser indigerível por esses organismos, além de freqüentemente também estar associada ao bloqueio do crescimento de patógenos (Taiz & Zeiger, 2004).

A influência da deposição de lignina é relatada como uma das reações desencadeadas pela planta para sua defesa contra penetração ou colonização de tecidos vegetais, sendo a lignificação da parede celular freqüentemente associada à inibição do crescimento dos patógenos (Boudet, 1998). Como, em todos os três períodos avaliados houve diferença na concentração de lignina, entre as plantas das variedades resistentes e as variedades suscetíveis, pode-se supor que a lignificação seja um dos mecanismos bioquímicos envolvidos na defesa nas variedades resistentes.

Amaral (2008), ao avaliar a influência de eliciadores biológicos e químicos sobre as atividades de fenóis totais e a deposição de lignina em folhas de mudas de cafeeiro tratadas com acibenzolar-S-metil (ASM) e folhas de café cv. Mundo Novo naturalmente infectadas por *H. vastatrix* (NEFID), observou que aos 21 dias, o teor de lignina foi cerca de 10% superior nos tratamentos com ASM e NEFID, em relação à testemunha absoluta e 15% em relação à testemunha. Resende et al. (2002), verificaram que o uso ASM em mudas de cacauzeiros contra *C. pernicioso*, ativando os mecanismos de defesa por 30 dias após a aplicação do referido produto, promovendo uma precoce lignificação dos tecidos da planta.

Botelho et al. (2005), observaram que aplicação de silício em mudas de café proporcionou maiores concentrações de lignina na folha, favorecendo a redução da intensidade de cercosporiose. Com aumento das doses, no entanto, ocorreu uma redução na translocação do silício, resultando na queda da

concentração de lignina na folha, porém ainda em quantidade suficiente para proporcionar redução na intensidade da doença.

## 6 CONCLUSÕES

O comportamento do isolado de *Mycosphaerella musicola* originário de Coronel Pacheco, MG não foi diferente dos observados na literatura.

Os menores períodos de incubação e de desenvolvimento da doença, foram obtidos na temperatura de 24° C.

A variedade Grande Naine foi a mais suscetível, tendo integrado as maiores AACPSD à 24 °C.

As variáveis AACPNL e PL, não demonstraram ser bons indicativos para discriminar a temperatura ótima para promover a doença.

Para as variedades de bananeira testadas, os níveis constitutivos de fenóis totais não se alteram como resposta à infecção por *Mycosphaerella musicola*.

As variedades Caipira e Prata Zulu apresentam maior lignificação da parede celular do que as variedades suscetíveis, o que denota ser este, um dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, J. R. G. **Epidemiologia do mal-de-sigatoka (*Mycosphaerella musicola*) da bananeira e controle químico da doença, via solo, com triadimenol**. 1991. Dissertação (Mestrado em Agronomia -Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- AMARAL, D.R. **Formulações de extratos vegetais e micronutrientes na indução de resistência em mudas de cafeeiro contra *cercospora coffeicola***. 2008. 92 p. Tese (Doutorado em Agronomia (Fitopatologia))- Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BOTELHO, D.M.S.; POZZA, E.A.; POZZA, A.A.A.; CARVALHO, J.G. de; BOTELHO, C.E.; SOUZA, P.E. Intensidade da cercosporiose em mudas de cafeeiro em função de fontes e doses de silício. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.6, p. 582-588, 2005.
- BOUDET, A.M. A new view of lignification. **Trends in Plant Science**, v.3, p.67-71, 1998.
- BURN, J. **La cercosporiose du bananier em Guinée. Étude de la phase ascosporee du *Mycosphaerella musicola* Leach**. 1963. 196p. Thèse (Docteur) - Institut Français de Recherches Fruitières Outre Mer, Paris.
- CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos Bioquímicos e Moleculares da Resistência Induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.) **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.
- CORDEIRO, Z. J. M.. **Variabilidade Patogênica de isolados de *Mycosphaerella musicola* e resistência induzida e genética em genótipos de bananeira**. 1997. 118 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- GASPAROTTO, L; PEREIRA, J.C.R.; HANADA, R.E.; MONTARROYOS, A.V.V. **Sigatoka negra da bananeira**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2006. 177p.

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

GAUHL, F.; PASBERG-GAUHL, C.; JONES, D.R. Black leaf streak: Disease cycle and epidemiology In: JONES, D.R. (Ed.). **'Diseases of Banana, Abacá and Enset'**. Wallingford: CABI, 200. p. 56-62.

GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z.; WOOD, K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease.** Columbi: Uniersity of Missouri, 1986. 443p.

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

JACOME, L.H.; SHUH, W.; STEVENSON, R.,E. Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var *Disfformis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81. p. 1480-1485, 1991.

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

MARIN, D.H.; ROMERO, R.A.; GUZMÁN, M; SUTTON, T.B. Black Sigatoka: An Increasing Therat to Banana Cultivation **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, n. 3, p. 208-222, Mar. 2003.

MARTINEZ, J.A **Epidemiologia do agente causal do Mal de Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*) Leach.) na região produtora de Banana do Estado de São Paulo e sua importância no desenvolvimento e intensidade da doença.** 1973. 47p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista - Botucatu.

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

MISAGHI, I.J. **Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions.** New York: Plenum, 1980. 205p.

MOURICHON, X. *Mycosphaerella fijiensis*: Diversity and possibilities for the early screening of germosplasm for resistance. In: CONFERENCE OF THE

INTERNATIONAL *MUSA* TESTING PROGRAM HELD AT FHIA, 1., 1994, Honduras. **Proceedings...** Montpellier: INIBAP, 1994. p.47-53.

MOURICHON, X.; CARLIER, J.; FOURÉ, E. Sigatoka Leaf Spot Diseases **Musa Disease Fact Sheet N.8**. Montpellier: INIBAP, 1997.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismo de resistência. In: LUZ, W.C. (Ed.) Revisão Anual de Patologia de Plantas, v.2 p.1-51, 1994. RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, v.51, p.621-628, 2002.

ROMERO, R.A. **Dynamics of fungicide resistant populations of *Mycosphaerella fijiensis* and epidemiology of black Sigatoka of bananas**. 1995. Dissertation (PhD) – North Carolina State University, Raleigh.

SALGADO, P. R. **Fenóis Totais no Cafeeiro em Razão das Fases de Frutificação e do Clima**. 2004. 60p. Dissertação (Mestrado em Agronomia:Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’, Piracicaba.

SIMMONDS, N.W. **Bananas**. Green London: Longman, 1959.

SPANOS, G.A.; WROLSTAD, R.E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v. 38, n.7, p.1565-1571, July 1990.

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

STOVER, R. H., Sigatoka Leaf Spot of Bananas and Plantains Plant Disease, v.. 64, n.8, p. 750-756, 1980.

STOVER, R. H. Sexuality and heterothallism in *Mycosphaerella musicola*. **Canadian Journal of Botany**, v.41, p.1531-1532, 1963.

WARDLAW, C.W., Leaf Spot. (Sigatoka Disease) In: WARDLAW, C.W. **BANANA DISEASES: including plantains and abaca**. Edingburgh: Longman, 1961. Cap. 11, p. 314-341.

## **CAPÍTULO 4**

### **ANÁLISE FILOGENÉTICA POR MARCADORES MICROSATÉLLITES DE ISOLADOS DE *Mycosphaerella musicola* ORIGINÁRIOS DAS DIVERSAS REGIÕES PRODUTORAS DE BANANA NO BRASIL.**

## 1 RESUMO

ROCHA, Hermínio Souza. Análise Filogenética por Marcadores Microsatélites de Isolados de *Mycosphaerella Musicola* Originários das Diversas Regiões Produtoras de Banana no Brasil. In:\_\_\_\_\_. **Epidemiologia da sigatoka amarela, quantificação de fenóis em variedades de bananeiras e análise filogenética de isolados de *Mycosphaerella musicola* utilizando microsatélites.** 2008. Cap. 4, p. 103-124. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

O conhecimento sobre a diversidade genética e estrutura populacional de um dado patógeno são pré-requisitos indispensáveis para a definição de medidas de controle eficazes. Considerando a natureza heterotática de *M. musicola* e a ocorrência da Sigatoka amarela no Brasil em caráter endêmico desde 1944, é de se esperar que uma ampla variabilidade genética tenha ocorrido, resultando em respostas diferenciadas dos diversos genótipos de bananeiras em relação aos isolados de *M. musicola*. Assim, um total de onze isolados de *M. musicola*, agente causal da Sigatoka amarela foram coletados em diversas regiões brasileiras (Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste), para a realização de estudos filogenéticos por meio da utilização de marcadores de Microsatélites. Todos os primers amplificaram segmentos de DNA genômicos dos onze isolados de *M. musicola* estudados, e foi possível observar clara separação dos mesmos de acordo com a região de origem. Os onze isolados coletados foram submetidos à análise de similaridade genética por meio do programa NTSYS, utilizando o coeficiente de Dice, tendo formado dois grupos maiores. Houve correlação entre a agressividade do isolado originário da Bahia e a sua variabilidade, detectada por primers SSR, gerando distanciamento dos demais isolados no dendrograma. Essa correlação não foi observada para o isolado de Coronel Pacheco – MG, que também apresentou maior agressividade no campo. Observou-se elevado potencial de um par de primers específico, para a diferenciação entre a Sigatoka amarela e a negra, os quais poderão vir a tornar-se marcadores moleculares para utilização nos laudos fitossanitários, para fins de identificação do patógeno.

---

\* Comitê Orientador: Edson Ampélio Pozza – UFLA (Orientador), Zilton José Maciel Cordeiro – Embrapa CNPMF (Co-Orientador).



## 2 ABSTRACT

ROCHA, Hermínio Souza. Phylogenetic Analysis of *Mycosphaerella musicola* isolates from various Banana Producing Regions in Brazil by Microsatellite Markers. In:\_\_\_\_\_. **Epidemiology of yellow Sigatoka, phenols quantification in banana varieties and phylogenetic analysis of *Mycosphaerella musicola* isolates using microsatellites.** 2008. Chap. 4, p. 103-124. Thesis (Doctor Degree in Plant Pathology) – Lavras Federal University, Lavras.\*

Knowledge about the genetic diversity and the population structure of a given pathogen are indispensable pre requisites for the definition of the most efficient control measures. Considering the hetherotalic nature of *M. musicola* and the endemic occurrence of Yellow Sigatoka in Brazil, since 1944, it is likely that a high genetic variability may have occurred, resulting in the differentiated responses of the various banana genotypes in relation to the existing *M. musicola* isolates. Hence, a total of eleven Yellow Sigatoka isolates were collected in various Brazilian geographical regions (South, South-East, West-Centre, and Northeast) to be used in a phylogenetic study with microsatellite markers. By means of the NTSYS program, using Dice coefficient, all the primers amplified genomic DNA fragments from all eleven isolates and it was possible to observe a clear separation of the isolates according to their geographical origin. Two major groups were formed. A correlation between the isolate aggressiveness from the state of Bahia and its variability was noticed by one pair of SSR primers, generating a certain distance from the other isolates in the dendrogram. This same correlation was not observed for the isolate from Coronel Pacheco – MG, which also presented a differentiated aggressiveness in the field. It was also observed a high potential of one specific pair of primers to be used in the differentiation between black and Yellow Sigatoka, which may become molecular markers to be used for phytossanitary reports, with the purpose of identifying the pathogen.

---

\* Guidance Committee: Edson Ampélio Pozza – UFLA (Supervisor), Zilton José Maciel Cordeiro – Embrapa CNPMF (Co-Supervisor).

### 3. INTRODUÇÃO

A doença da mancha das folhas em bananeiras, cujo agente etiológico é *Mycosphaerella musicola* Leach (Stat. Conid. *Pseudocercospora musae* Zimm.) foi observada pela primeira vez próximo a Biotenzorg, em Java, por Zimmermann, em 1902. O relato seguinte da ocorrência da doença veio do distrito de Sigatoka, na ilha de Viti Levu, em Fiji, no ano de 1912 (Philpott & Knowles, 1913). Naquele distrito observou-se, pela primeira vez, o desenvolvimento da doença na sua forma de epidemia, resultando no nome popular ‘Doença de Sigatoka’ ou simplesmente ‘Sigatoka’, que persiste até então (Knowles, 1916). Posteriormente, a doença foi identificada na Ásia, África, Américas Central e do Sul e Caribe, tendo rapidamente se tornado uma das mais importantes doenças para a cultura da bananeira (Meredith, 1970).

No Brasil, a Sigatoka amarela foi constatada, pela primeira vez, no Estado do Amazonas, em 1944, (Kimati & Galli, 1980), sendo encontrada posteriormente em todos os estados brasileiros. Em 1994, *M. musicola* foi citada como disseminada por todas as regiões produtoras de banana do Brasil e do mundo, provocando consideráveis prejuízos na produção de frutos (Fourè, 1994). Por causa da alta taxa de progresso da Sigatoka negra, trabalhos mais recentes foram focados principalmente em *M. fijiensis*. Entretanto, apesar do proeminente papel de *M. fijiensis*, *M. musicola* ainda é o patógeno prevalecente em altitudes maiores e também em áreas onde cultivares resistentes à Sigatoka negra vêm sendo cultivadas.

As informações sobre a diversidade genética e estrutura populacional de um dado patógeno é um pré-requisito para a definição de medidas de controle mais adequadas. De acordo com Carlier et al. (2003), a natureza heterotática, tanto de *M. fijiensis* quanto de *M. musicola*, permitem trocas de material

genético, desempenhando um importante papel relevante na geração da variabilidade genética dentro das populações.

Com o avanço da biologia molecular na última década, estudos envolvendo a variabilidade genética desses fungos foram facilitados, levando ao desenvolvimento de marcadores moleculares diversos, do tipo RAPD, RFLP e Microsatélites (SSR), capazes de indicar pequenas diferenças genômicas entre isolados de diferentes origens (Carlier et al., 1994, 1996; Muller et al., 1997; Neu et al., 1999; Molina et al., 2001; Molina et al., 2002; Moreira et al., 2003.)

Moreira et al. (2003), realizaram a caracterização genética de 24 isolados de *Mycosphaerella musicola* de diferentes regiões geográficas no Brasil, pela técnica de RAPD. Foi observada uma grande variabilidade genética entre os isolados, a qual teria sido atribuída ao grande número de variedades suscetíveis, à condição climática, à ocorrência de reprodução sexuada e também à natureza heterotática do fungo. Do mesmo modo, marcadores RFLP foram desenvolvidos para o genoma de *M. fijiensis* e utilizados para caracterizar as populações deste patógeno em escala global e regional na África. (Carlier et al., 1994, 1996; Muller et al., 1997). Tentativas de transferir marcadores moleculares de *M. fijiensis* para *M. musicola* não foram bem sucedidas. (Molina et al., 2001).

De um modo geral, os marcadores moleculares tornaram-se importantes ferramentas para as investigações sobre a composição genética de populações de fungos (Carlier et al., 1994; Groppe & Boller, 1997; Bucheli et al., 2001). Mas, entre as diversas técnicas disponíveis, testadas com o gênero *Mycosphaerella*, Molina & Kahl (2002), avaliaram que os marcadores baseados em Microsatélites teriam o maior potencial. Esses marcadores, também denominados de repetições de seqüência única (SSR), possuem seqüências curtas com 2 a 5 pares de bases, enquanto que os minisatélites são repetições em “tandem” mais longas (STR), contendo aproximadamente 20 pares de bases. Habitualmente, estes dois tipos de marcadores são denominados de VNTRs

(repetições em “tandem”) em número variável (Dowling et al., 1996). Os loci de Microsatélites são ideais para análises da biologia e genética de populações, pois apresentam alelos co-dominantes e são amplificados por iniciadores específicos, o que os torna robustos, de fácil registro e prontamente disponíveis entre grupos de pesquisadores. Adicionalmente, eles tendem a ser mais polimórficos do que outros marcadores amplificáveis (Selkoe & Toonen, 2006).

Carlier et al. (1994) construíram uma biblioteca genômica que permitiu a identificação de 26 marcadores do tipo microsatélite, específicos para *M. musicola*. Além desses, outros marcadores SSR foram descritos para *M. fijiensis* (Neu et al., 1999) e para *M. musicola* (Molina et al., 2001), os quais, juntamente com outros métodos de perfil de DNA, baseados em PCR, mostraram ser um método eficiente para comparar a diversidade genética tanto de *M. fijiensis* quanto de *M. musicola*. Molina & Kahl (2001) trabalhando com a diversidade genética e filogenia de *M. fijiensis* e *M. musicola*, por meio de marcadores de Microsatélites, identificaram que um número mínimo de nove marcadores é necessário para se discriminar os indivíduos em dendrogramas com agrupamentos de UPGMA.

No Brasil, Montarroyos (2005) observou elevada diversidade genética em isolados de *M. musicola*, provenientes do Estado de Pernambuco, por meio da utilização de marcadores RAPD, não tendo sido verificada correlação entre a diversidade genética observada e as origens geográficas dos isolados. Entretanto, considerando-se a importância da Sigatoka no Brasil, poucos esforços têm sido direcionados aos estudos da genética da população de *M. musicola*.

Desta forma, objetivou-se no presente trabalho avaliar a variabilidade genética de isolados brasileiros de *M. musicola*, provenientes de diferentes regiões, por meio de dez marcadores de Microsatélites.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Coleta de isolados

Um total de 11 isolados de *M. musicola* representativos das diversas regiões produtoras de banana no Brasil foram analisados e também um controle de *M. musicola* e um de *M. fijiensis*, obtidos no Instituto Biológico de São Paulo (TABELA 1). Devido à inexistência de uma coleção nacional de isolados de *M. musicola*, foram feitos contatos telefônicos com diversas secretarias estaduais e municipais de agricultura, e até com produtores, com a finalidade de obter amostras foliares com sintomas de Sigatoka amarela, a partir das quais foram feitos os isolamentos, cultivos ‘*in vitro*’ e posterior extração do DNA das culturas mantidas em meio líquido rotacionado.

Os isolados de *M. musicola* foram obtidos a partir de folhas apresentando lesões em estágio IV, de acordo com a escala de desenvolvimento de lesões de Brun (1958). A metodologia de isolamento seguida foi a mesma descrita no capítulo 3. Após terem sido isoladas, as culturas foram transferidas para meio líquido BD/IFB composto de 200g de batata, 20g de dextrose em 1000 mL de água destilada, acrescido de 200g de infuso de folhas de bananeira, tendo sido aferido o pH para 5,7 conforme metodologia descrita por Montarroyos et al., (2007). As culturas foram mantidas por 28 dias em incubadora, com rotação de 80 rpm e na ausência de luz.

**TABELA 1: Relação dos Isolados de *Mycosphaerella musicola*, coletados em 2007 nas diversas regiões produtoras de banana no Brasil. UFLA, Lavras – MG. 2008.**

| <b>Localidade</b>    | <b>Código</b> | <b>Responsável pela coleta</b> | <b>Variedade</b>          |
|----------------------|---------------|--------------------------------|---------------------------|
| Missal – PR          | MIS – PR      | Não informado                  | Prata Anã (AAB)           |
| Tuiui – SP           | SP – NC       | Flávio Medeiros                | Nanicão (AAA)             |
| Lavras – MG          | LVR – PR      | Herminio S. Rocha              | Prata comum (AAB)         |
| Porteirinha – MG     | POR-PR        | Pedro Martins Ribeiro          | Prata Anã (AAB)           |
| Coronel Pacheco – MG | CP – NC       | Herminio S. Rocha              | Saquarema (AAA)           |
| Dourados- MS         | MS-PR         | Grazielli Frotas               | Prata Anã (AAB)           |
| Vianópolis - GO      | MAC - GO      | Carlos A. Rezende              | Maçã (AAB)                |
| Gandu – BA           | TR – BA       | Herminio Souza Rocha           | Terra (AAB)               |
| Machados – PE        | PC – PE 2     | Marcos Antônio Duarte          | Pacovan (AAB)             |
| Fortaleza – CE       | CE – PA       | Não informado                  | Prata Anã (AAB)           |
| Balsas – MA          | MA-02         | Não informado                  | Pacovan (AAB)             |
| Instituto Biológico  | CTR-N         | Ricardo Harakawa               | Controle Sigatoka negra   |
| Instituto Biológico  | CTR-A         | Ricardo Harakawa               | Controle Sigatoka Amarela |

#### 4.2. Extração de DNA

A Extração de DNA seguiu a técnica de Dellaporta et al., 1983, conforme descrito a seguir.

1. Filtragem a vácuo, em gaze esterilizada, e pesagem do micélio, oriundo da colônia cultivada *in vitro*.
2. Maceração de 150 mg do micélio em nitrogênio líquido.
3. Adição de 1,5 mL de CTAB 2% (100 mM Tris-Cl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl), pré-aquecido em banho maria à 60° C.
4. Transferência do macerado para tubos Eppendof (500 µL/tubo)
5. Incubação em banho maria a 60 °C durante 30 minutos, homogeneizando manualmente a cada 10 minutos.
6. Adição de 500 µL de solução Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:1) e agitação em vortex.
7. Centrifugação a 12.000 rpm durante 10 minutos.
8. Transferência do sobrenadante ( $\pm$  400 µL) para novos tubos e precipitação do DNA com a adição de 60% do volume ( $\pm$  280 µL) de isopropanol pré-resfriado (-20 °C), seguido de agitação em vórtice.
9. Incubação por uma hora à temperatura de -20 °C.
10. Centrifugação a 12.000 rpm durante 10 minutos (4 °C), descartando-se o sobrenadante em seguida.
11. Lavagem do pellet com solução de etanol 70%.
12. Secagem em centrífuga a vácuo, durante 3 minutos.
13. Ressuspensão do pellet em 30 µL de solução tampão TE (10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0).

#### **4.3 Iniciadores (Primers) de Microsatélite**

Foram testados 10 pares de primers (TABELA 2), escolhidos de um conjunto de 26 marcadores polimórficos de Microsatélites, específicos para *M. musicola*, desenvolvidos por Molina & Kahl, (2001).

As ampliações das reações de PCR foram realizadas em volume total de 25 µL, contendo 17 µL de água ultra pura; 2,5 µL de tris-HCl pH 8.8; 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,5 µL dNTPs (10 mM); 1,25 µL de cada primer e 0,25 µL da enzima Go Taq DNA polimerase.

As reações de PCR foram feitas em termociclador Peltier-Effect Cycling PTC-100 (M.J. Research, INC.) utilizando-se o seguinte ciclo: 95 °C por 60 segundos, seguida de 30 ciclos: 95 °C a 30s, 45s na T<sub>m</sub> de cada primer (47-55 °C) e 45s a 72 °C, com a elongação final a 72 °C durante 7 minutos. Os produtos da reação de PCR foram separados em gel de agarose a 6%, com posterior análise no fotodocumentador da PHARMACIA BIOTECH (Image Master VDS).

#### **4.4 Análise dos dados**

Os resultados das ampliações dos diferentes fragmentos de Microsatélites, para cada um dos 11 isolados, foram caracterizados quanto a presença ou ausência de bandas, nos locos correspondentes aos isolados, compondo uma matriz binária, que foi submetida à análise de similaridade genética entre os isolados por meio do programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Systematics, v. 1.70; Rohlf, 1992), utilizando o coeficiente de Dice. A partir dos dados da matriz, os isolados foram agrupados pelo método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean), por meio de dendrograma específico.



**TABELA 2: Características dos marcadores de Microsatélite utilizados na análise filogenética dos 11 isolados de *Mycosphaerella musicola*. UFLA, Lavras – MG. 2008.**

| Primers    | Seqüência 5' – 3'     | Produto        |         |
|------------|-----------------------|----------------|---------|
|            |                       | Esperado (pb)* | Tm (°C) |
| Mm SSR 05A | CCTCTTACGAAGTCTGTGGT  | 252            | 55      |
| Mm SSR 05B | TATCTCGGGAGACCAGACTA  |                |         |
| Mm SSR 07A | ACGAGGTTTCAGAAGCAATA  | 262            | 55      |
| Mm SSR 07B | TCTTTCACCGAAGAAACCT   |                |         |
| Mm SSR 10A | GAGAGCATGAAAAGTGGAAA  | 171            | 55      |
| Mm SSR 10B | CGTGACACTCGTCAGTTACA  |                |         |
| Mm SSR 16A | CCATCTGCCTTGAGATAGTC  | 220            | 55      |
| Mm SSR 16B | GAATTTATTCCAGCGAAGC   |                |         |
| Mm SSR 23A | CGACCTAGTCGAGGATGATA  | 279            | 55      |
| Mm SSR 23B | CGAAGACTTCTGAAAGGTCA  |                |         |
| Mm SSR 34A | CTCGCTGCCTGATTATTCT   | 260            | 47      |
| Mm SSR 34B | AGATGCCATCGCTTCAC     |                |         |
| Mm SSR 35A | TAACAATGTCCCTGAGAAGC  | 260            | 53      |
| Mm SSR 35B | GCCTTATCTGGAAAGTATCGT |                |         |
| Mm SSR 39A | TGCGAATTCCATTGATATG   | 183            | 53      |
| Mm SSR 39B | CGTGTGCTGACGAGAGAT    |                |         |
| Mm SSR 44A | CCTCACTCTCGCTCATACA   | 136            | 53      |
| Mm SSR 44B | AGAATGGACGAAAAACACTG  |                |         |
| Mm SSR 46A | CGTGGACCTATTGTCAACTC  | 261            | 53      |
| Mm SSR 46B | TGGGTTACATTTACGAGAGAA |                |         |

\* - tamanho do alelo clonado em número de pares de bases, amplificado de acordo com a seqüência do fragmento utilizado como primer.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os primers amplificaram segmentos de DNA genômicos dos onze isolados de *M. musicola* estudados (TABELA 3) (FIGURAS 1 a 5), e também para os controles de *M. musicola* e *M. fijiensis*, com um total de 58 bandas, das quais 91,37% foram polimórficas.

TABELA 3: **Bandas amplificadas por cada primer SSR nos onze isolados de *M. musicola* testados. UFLA, Lavras – MG. 2008.**

| Identificação do Primer | Nº de bandas observadas | Nº de bandas Polimórficas |
|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Mm SSR 05               | 2                       | 2                         |
| Mm SSR 07               | 4                       | 3                         |
| Mm SSR 10               | 4                       | 3                         |
| Mm SSR 16               | 3                       | 3                         |
| Mm SSR 23               | 4                       | 4                         |
| Mm SSR 34               | 13                      | 13                        |
| Mm SSR 35               | 6                       | 5                         |
| Mm SSR 39               | 13                      | 13                        |
| Mm SSR 44               | 6                       | 5                         |
| Mm SSR 46               | 3                       | 2                         |
| <b>Totais</b>           | <b>58</b>               | <b>53</b>                 |

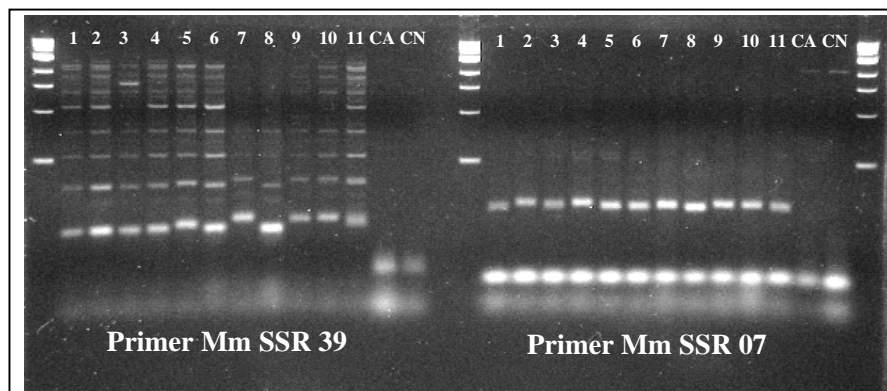


FIGURA 1: Padrão de bandas observado com os primers de Microsatélite para *Mycosphaerella musicola* (Mm SSR 39 e Mm SSR 07). Numeração correspondente aos isolados (1 - SP-NC; 2 - MIS-PR; 3 - MS - PR; 4 - LVR - PR; 5 - TR - BA; 6 - CP-NC; 7 - PC-PE2; 8 - POR-PR; 9 - MA-02; 10 - CE-PA; 11 - MAC-GO; 12 - CA - Controle Sigatoka amarela; CN - Controle Sigatoka negra. UFLA. Lavras - MG. 2008.

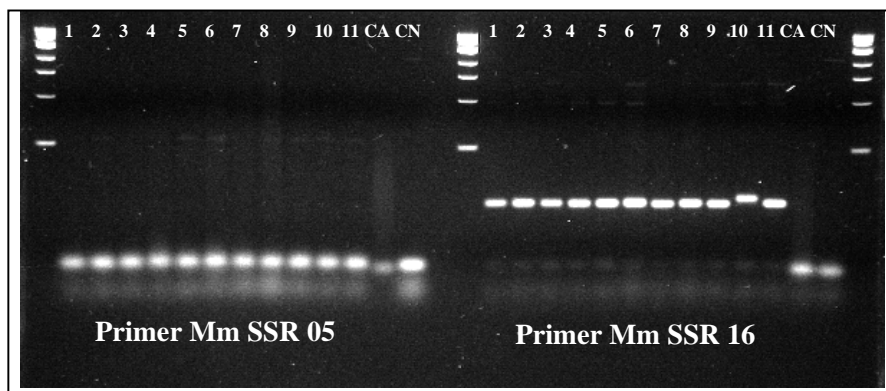


FIGURA 2: Padrão de bandas observado com os primers de Microsatélite para *Mycosphaerella musicola* (Mm SSR 05 e Mm SSR 16). Numeração correspondente aos isolados (1 - SP-NC; 2 - MIS-PR; 3 - MS - PR; 4 - LVR - PR; 5 - TR - BA; 6 - CP-NC; 7 - PC-PE2; 8 - POR-PR; 9 - MA-02; 10 - CE-PA; 11 - MAC-GO; 12 - CA - Controle Sigatoka amarela; CN - Controle Sigatoka negra. UFLA. Lavras - MG. 2008.

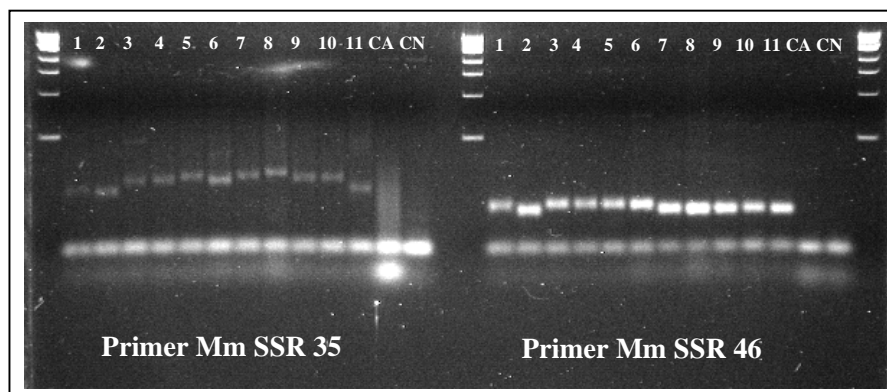


FIGURA 3: Padrão de bandas observado com os primers de Microsatélite para *Mycosphaerella musicola* (Mm SSR 35 e Mm SSR 46). Numeração correspondente aos isolados (1 - SP-NC; 2 - MIS-PR; 3 - MS - PR; 4 - LVR - PR; 5 - TR - BA; 6 - CP-NC; 7 - PC-PE2; 8 - POR-PR; 9 - MA-02; 10 - CE-PA; 11 - MAC-GO; 12 - CA - Controle Sigatoka amarela; CN - Controle Sigatoka negra. UFLA. Lavras - MG. 2008.

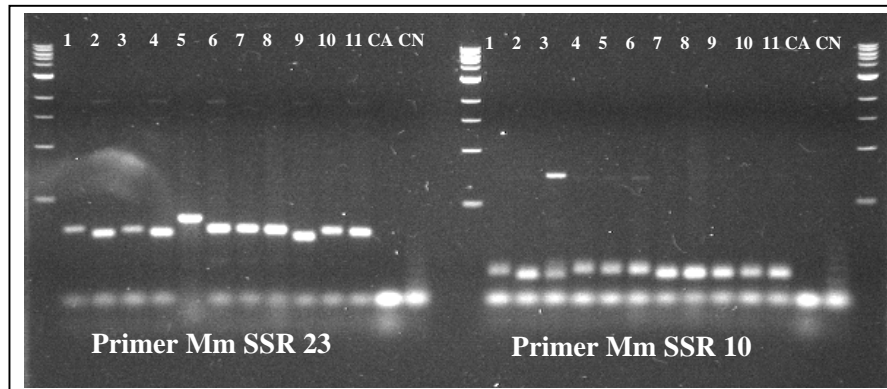
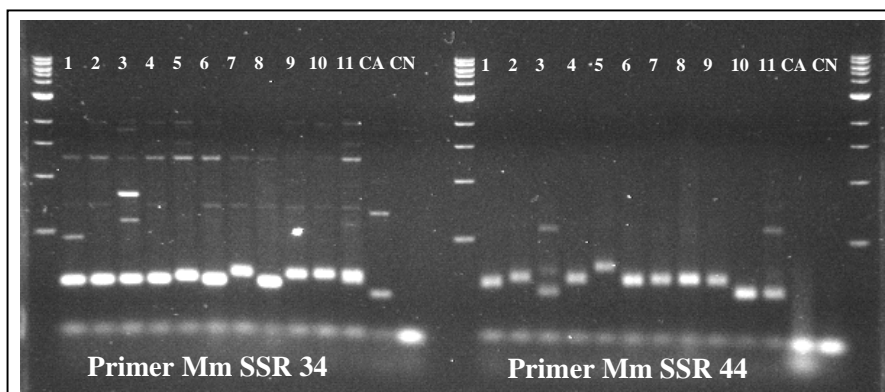


FIGURA 4: Padrão de bandas observado com os primers de Microsatélite para *Mycosphaerella musicola* (Mm SSR 23 e Mm SSR 10). Numeração correspondente aos isolados (1 - SP-NC; 2 - MIS-PR; 3 - MS - PR; 4 - LVR - PR; 5 - TR - BA; 6 - CP-NC; 7 - PC-PE2; 8 - POR-PR; 9 - MA-02; 10 - CE-PA; 11 - MAC-GO; 12 - CA - Controle Sigatoka amarela; CN - Controle Sigatoka negra. UFLA. Lavras - MG. 2008.



**FIGURA 5: Padrão de bandas observado com os primers de Microsatélite para *Mycosphaerella musicola* (Mm SSR 34 e Mm SSR 44). Numeração correspondente aos isolados (1 - SP-NC; 2 - MIS-PR; 3 - MS - PR; 4 - LVR - PR; 5 - TR - BA; 6 - CP-NC; 7 - PC-PE2; 8 - POR-PR; 9 - MA-02; 10 - CE-PA; 11 - MAC-GO; 12 - CA - Controle Sigatoka amarela; CN - Controle Sigatoka negra. UFLA. Lavras - MG. 2008.**

Os primers com menor número de bandas polimórficas foram Mm SSR-05, Mm SSR-07, Mm SSR-10, Mm SSR-16 e o Mm SSR-23, enquanto os primers Mm SSR-34 e o Mm SSR-39 foram mais polimórficos. O uso desses dez pares de primers foi eficiente para detectar a variabilidade dos isolados, confirmando os dados de Molina & Kahl (2001), que observaram ser necessário um número mínimo de nove marcadores para a construção de um dendrograma.

Quanto ao dendrograma, pode-se observar clara separação dos isolados de acordo com a região de origem (FIGURA 6). Os onze isolados coletados agruparam-se em dois grupos maiores. No primeiro grupo, localizado na porção superior do dendrograma, pode-se notar quatro diferentes subgrupos. No primeiro subgrupo, encontram-se os isolados de São Paulo (SP-NC); Paraná (MIS-PR), e das Regiões da Zona da Mata e Sul de Minas Gerais, no segundo subgrupo, encontra-se o isolado originário da Região Norte do Estado de Minas Gerais (POR-PR), cujas condições climáticas divergem consideravelmente do Sudeste brasileiro. O terceiro subgrupo compreende apenas o isolado do Mato

Grosso do Sul (MS-PR) e o quarto subgrupo apresenta o isolado de Gandú – BA (TR-BA) isoladamente, denotando certo distanciamento em relação aos demais. Igualmente ao que ocorreu em Coronel Pacheco – MG, este isolado da Bahia, é representante de uma área na qual foi levantada, pela primeira vez, a suspeita da ocorrência de Sigatoka negra no Estado, o que não foi confirmado posteriormente. Trata-se de um plantio de bananeiras da variedade Terra (AAB), que é um genótipo tido como resistente à Sigatoka amarela, e que apresentou uma alta severidade da doença, somente naquela localidade. É provável que esse isolado da Bahia tenha sido alterado geneticamente, por efeito da variabilidade natural, tornando-se virulento para as variedades do subgrupo terra. Todavia, em função da severa deficiência de potássio observada naquele bananal, acredita-se mais que este tenha sido o condicionante maior para o desenvolvimento de sintomas naquela variedade resistente.

É interessante notar que dentre os três isolados de Minas Gerais, os mais próximos geograficamente (CP-NC e LVR-PR), agruparam-se com o maior coeficiente de similaridade de todo o dendrograma. As duas localidades encontram-se distantes 340km.

O isolado de Coronel Pacheco – MG (CP-NC), foi coletado de uma lavoura em que havia sido oficialmente identificada a Sigatoka – negra. Os sintomas eram demasiadamente severos, porém as análises de PCR realizadas posteriormente, tanto a partir de folhas quanto das culturas isoladas, identificaram *Mycosphaerella musicola* nas amostras coletadas.

Essa alta variabilidade em *M. musicola* foi constatada por outros autores. Fouré & Lescot (1988) apresentaram as primeiras evidências da ocorrência de variabilidade genética entre isolados de *M. musicola* em Camarões, onde o comportamento da doença destacou-se por elevada severidade nas variedades do subgrupo prata e plátanos. No Brasil, Moreira et al. (2003) também observaram alta variabilidade natural na origem dos isolados, que supôs estar ligada às

condições climáticas, à ocorrência de reprodução sexuada e também à natureza heterotática do fungo.

No segundo grupo, encontram-se reunidos os isolados da Região Nordeste, com exceção do (MAC-GO), proveniente de Goiás. Com a constante movimentação de materiais de propagação no Brasil, não se pode descartar a possibilidade de que este isolado possa ser proveniente de outras regiões, via mudas contaminadas ou outros órgãos vegetais.

Os dois controles de Sigatoka amarela e Sigatoka negra empregados compuseram um terceiro grupo, subdividido em dois subgrupos distintos. Entretanto, apenas o par de primers MmSSR 34 permitiu uma diferenciação entre os dois, de modo que, apesar de diferentes entre si não apresentaram a variabilidade esperada, na qual o controle da Sigatoka amarela se agruparia com os demais 11 isolados estudados. Pode ser que isso seja devido ao fato de os DNAs estarem estocados há bastante tempo no congelador, o que poderia ter provocado a sua degradação parcial.

Observando esses resultados, entretanto, é interessante ressaltar o bom potencial do par de primer, MmSSR 34, para ser empregado na diferenciação entre os dois tipos de *Mycosphaerella*, a *M. musicola* e a *M. fijiensis*. Isso porque, a técnica de PCR atual, empregada em testes diagnósticos, não foi eficiente o suficiente para fornecer resultados repetitivos e confiáveis quando foi testada com esses isolados (resultados não mostrados).

Sendo assim, a variabilidade encontrada entre isolados de *M. musicola*, detectada por meio de marcadores SSR, está correlacionada com a sua origem geográfica. Similarmente, Molina et al., (2002) empregaram 42 marcadores SSR e 64 isolados provenientes de 12 localidades, na Colômbia, e notaram que eles foram separados em seis subgrupos distintos, de acordo com a sua origem. Por outro lado, isso parece não ocorrer quando emprega-se marcadores RAPD. Moreira et al. (2003) e Montarroyos (2005) não encontraram correlação entre o

agrupamento e a origem geográfica de isolados brasileiros de *M. musicola*, quando foram utilizados marcadores RAPD.



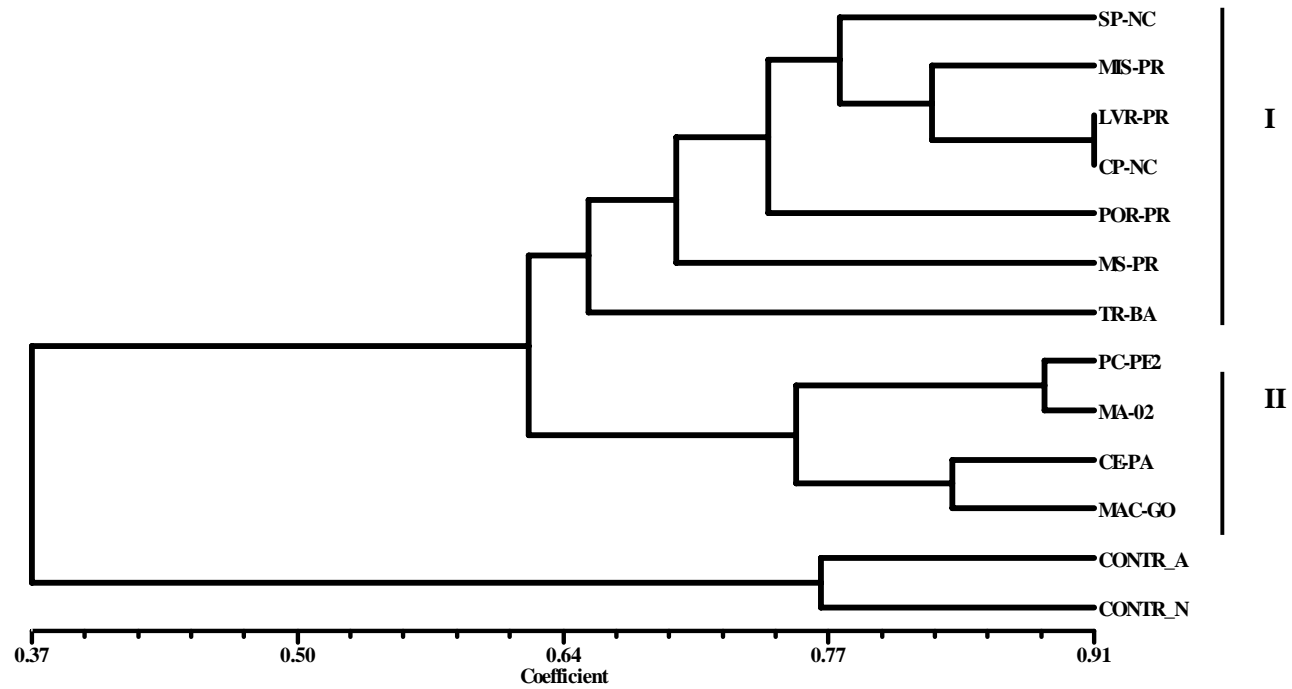


FIGURA 6: Dendrograma de similaridade ilustrando a distância genética dos 11 isolados de *Mycosphaerella musicola*, de acordo com marcadores de Microsatélites, utilizando o coeficiente de Dice pelo método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). UFLA, Lavras – MG. 2008.

## 6 CONCLUSÕES

O uso de dez conjuntos de primers SSR permitiu o estudo da variabilidade de isolados de *Mycosphaerella musicola*, possibilitando a construção de um dendrograma capaz de separá-los em dois grupos distintos.

Os isolados de *Mycosphaerella musicola* coletados no Sul e no Sudeste do Brasil agruparam-se separadamente dos isolados coletados no Norte, Nordeste e Centro Oeste.

Não se verificou distanciamento genético do isolado CP-NC que apresentou maior agressividade no campo, em relação ao isolado LVR - PR..

Existe um grande potencial do par de primers Mm SSR 34 em diferenciar *Mycosphaerella musicola* de *Mycosphaerella fijiensis*, os quais poderiam vir a tornarem-se marcadores moleculares para utilização nos laudos fitossanitários.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURN, J. Étude sur l'action des fongicides huileux dans la lutte contre la cercosporiose. **Fruits D'outre Mer**, Paris, v.13, p 3 – 14,1958. Note préliminaire.
- CARLIER, J.; MOURICHON, D.; GONZALES, -de-LEON, D.; LEBRUN, M.H. DNA restriction fragment length polymorfism in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. **Phytopathology**, Brasília, v. 84, p. 751-756, 1994.
- CARLIER, J.; LEBRUN, M.H.; ZAPATER, M.F.; DUBOIS, C.; MOURICHON, X. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. **Molecular Ecology**, n.5, p.499-410, 1996.
- DELLAPORTA, S.L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.1, n.4, p.19, 1983.
- DOWLING, T.E.; MORITZ, C.; PALMER, J.D.; RIESEBERG, L.H. Nucleic Acids III: analysis of fragments and restrictio sites In: HILS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.). **Molecular sysyematics**, 2nd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. Chap. 8, p. 249-320.
- FOURÉ, E.; LESCOT, T. Varaibilité génétique des *Mycospaherella* inféodés au genre *Musa*. Mise em évidence de la présence au Cameroun sur bananiers et plantains d'une cercosporiose (*Mycosphaerella musicola*) au comportement pathogène atypique. **Fruits**, Paris, v. 43. p. 407-515, 1988.
- KIMATI, H.; GALLI, F. Doenças da bananeira *Musa* spp. In: GALLI, F.; CARVALHO, P. de C.T. de; TOKESHI, H.; BALMER, E.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.N.; SALGADO, C. L.; KRÜGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, p. 87-101.
- KNOWLES, C.H. **Visit to upper Rewa to investigate leaf diseases of the banana**. Fiji: Phamphlet Of the Department of Agriculture, 1916. n. 24, 5 p. 1916.
- MEREDITH, M.A. **Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycospherella musicola* Leach**. Surrey: CMI, 1970. 147 p. (Phytopathological papers, II).

MOLINA, C.M.; KAHL, G. Genomics of two banana pathogens: genetic diversity, diagnostics and phylogeny of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*. In: JAIN, S. M.; SWENNEN, R. (Ed.). **Banana improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations**. Leuven: Belgium Science, 2001.

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

ROMERO, R.; ESCALANT, J.V. (Ed.). *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON MYCOSPHAERELLA LEAF SPOT DISEASES HELD, 2., 2002, San José. **Proceedings...** San José: [s.n.], 2002. Session 2, p. 131-139.

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

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

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

MÜLLER, R.; PASBERG-GAUHL, C; GAUHL, F.; RAMSER, J.; KAHL, G. Oligonucleotide fingerprinting detects genetic variability at different levels in Nigerian *Mycosphaerella fijiensis*. **Journal of Phytopathology**, v. 145, p.25-30, 1997.

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

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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Condições climáticas que disponibilizem água livre diariamente, seja na forma de chuva e/ou orvalho intenso, são passíveis de transformarem-se eventos de epidemia da Sigatoka amarela, desde que não hajam intervenções de manejo. Nesses casos, faz-se necessária a retirada parcial (cirurgias) de limbos foliares infectados e em estágio de necrose, assim como a retirada de restos foliares em decomposição no solo.

A nutrição do bananal deve ser sempre mantida em níveis adequados, de forma a possibilitar a constante emissão foliar, compensando as perdas por infecções de Sigatoka amarela.

Toda e qualquer identificação da Sigatoka deve ser realizada por meio de análise microscópica dos conídios e conidióforos, análise de PCR e sintomatologia, conjuntamente.

Outros Primers de microssatélites devem ser testados em estudos de filogenia de *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola*.

Os Primers Mm SSR identificados com elevado potencial para tornarem-se marcadores moleculares, devem ser validados, por meio de análises de PCR com o maior número de isolados de ambos os patógenos, originários de diferentes regiões geográficas no Brasil.