



**MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO
DELEGACIA FEDERAL DE AGRICULTURA NO AMAZONAS
COMISSÃO DE DEFESA SANITÁRIA VEGETAL/CDSV/AM**

RELATÓRIO:

**SOBREVIVÊNCIA DE CONÍDIOS DE (*Mycosphaerella fijiensis*)
Moleret ADERIDOS A DIFERENTES MATERIAIS E PRODUTOS
EFICIENTES NA SUA ERRADICAÇÃO**

**MANAUS - AM
2000**

2 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Amazônia Ocidental e no Laboratório de Patologia de Madeira da Coordenação de Pesquisas em Produtos Florestais do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Manaus, AM.

• 2.1 - Isolamento e esporulação do patógeno

Foram feitos isolamentos diretos, transferindo-se os conídios presentes das lesões de folhas doentes, com o auxílio de estilete de ponta fina, para placas de Petri contendo meio de BDA. Em seguida, as placas de Petri foram mantidas em incubadoras a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até à formação de colônias. Para induzir a esporulação, testou-se o fungo em sete meios de cultura e quatro regimes de luz.

Os meios de cultura foram: FBA, BCA, V8 ágar, V8-CaCO₃ ágar, BDA, ACA e Micophil.

- FBA = Folha de bananeira + ágar
- Composição: 300 g de folha de bananeira triturada, 20 g de dextrose e 20 g de ágar para 1000 ml de água destilada.
- BCA = Batata + cenoura + ágar
- Composição: 20 g de batata, 20 g de cenoura e 20 g de ágar para 1000 ml de água destilada.
- V8 + ágar
- Composição: 100 ml de V8, 20 g de ágar e 900 ml de água destilada.
- V8 + CaCO₃ + ágar.
- Composição: 100 ml de V8, 2 g de CaCO₃, 20 g de ágar e 900ml de água destilada.
- BDA = Batata + dextrose + ágar
- Composição: 200 g de batata, 20 g de dextrose e 20 g de ágar para 1000 ml de água destilada.
- ACA = Água de coco + ágar
- Composição: 1000 ml de água de coco e 20 g de ágar
- Micophil
- Composição: 10 g de farinha de soja, 10 g de dextrose e 20 g de ágar para 1000 ml de água destilada.

Os regimes de luz foram: escuro contínuo, fotoperíodo de 12 h, sequencial (dez primeiros dias no escuro e cinco dias subsequentes sob luz contínua) e luz contínua. Os tratamentos foram distribuídos em delineamento de blocos casualizados com cinco repetições, considerando-se cada erlenmeyer de 125 ml uma repetição e os regimes de luz, os blocos.

Em cada erlenmeyer, contendo 20 ml do seu respectivo meio, foram adicionados 0,5 ml de uma suspensão contendo 5×10^4 conídios/ml. Em seguida, os erlenmeyers foram submetidos aos quatro regimes de luz e mantidos em incubadora a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante 15 dias. Após o período de incubação, quantificou-se a produção de conídios. Em cada erlenmeyer, adicionaram-se 3 ml de água destilada e, com o auxílio de um pincel, os conídios foram removidos. Realizaram-se quatro contagens por erlenmeyer em câmara de NEUBAEUR, sob microscópio ótico.

- **2.2 - Idade da cultura para obtenção de maior quantidade de conídios viáveis**

Após definir o meio de cultura e o regime de luz para esporulação do fungo, estudaram-se a época de maior esporulação da cultura e a de maior índice de germinação dos conídios. Nesse ensaio, o regime sequencial foi de oito dias no escuro e, posteriormente, luz contínua.

A quantificação foi realizada a partir do décimo dia de idade da cultura, a intervalos de dois dias, até à estabilização de produção de esporos, seguindo a metodologia do item anterior, utilizando água destilada estéril. Para cada intervalo, quantificaram-se a produção e a germinação de conídios de três erlenmeyers.

A germinação foi avaliada na mesma suspensão utilizada para quantificar a produção de conídios. Após a contagem, a suspensão foi transferida para um tubo de ensaio, mantido em temperatura ambiente por 24 horas. Quantificaram-se 100 conídios, aleatoriamente, sendo computados em cada erlenmeyer, os germinados.

- **2.3 - Sobrevivência dos conídios de *M. fijiensis* em diferentes materiais**

A sobrevivência dos conídios do patógeno foi avaliada em folhas de bananeira, cascas de bananas verdes até ao amadurecimento, pedaços de madeira, papelão, plástico, tecido, ferro (carcaça de veículos) e pneu.

Os esporos foram produzidos em meio de cultura BDA, coletados em água destilada, centrifugados e, posteriormente, distribuídos sobre os materiais, em locais demarcados.

Os materiais contendo os conídios foram distribuídos em sala com condicionador de ar, em salas com temperatura ambiente e em

um galpão em condições de campo. Em cada ambiente foram colocados quatro repetições.

A avaliação foi realizada a intervalos de 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 18, 23, 30 e 60 dias. Para tanto, os esporos foram transferidos para placas de Petri contendo ágar-água 2%, mantidas em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, sob microscópio óptico, foi avaliada a capacidade germinativa.

- **2.4 - Viabilidade de *M. fijiensis* em folhas doentes destacadas**

Foram coletadas no campo folhas doentes apresentando acima de 50% de área foliar lesionada. Amostras de 20 cm x 30 cm foram distribuídas em locais semelhantes aos do item anterior. A viabilidade do fungo nas amostras foi avaliada nos intervalos de 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 18, 23, 30 e 60 dias.

As lesões foram analisadas sob microscópio estereoscópio visando observar as estruturas fúngicas. Quando constatadas as estruturas, elas foram transferidas, com estilete de ponta fina, para placas de Petri contendo meio de BDA, mantidas em incubadora à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. A formação de colônias no meio de cultura foi observada diariamente.

- **2.5 - Seleção de produtos para erradicação do patógeno**

Foram testados benomil, hipoclorito de sódio, amônia quaternária, digluconato de chlorhexidina, formaldeído e ecolife nas concentrações de 1 ppm,

5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm e 100 ppm. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições por tratamento, sendo também utilizada uma testemunha apenas com água destilada.

Uma suspensão de 10^5 conídios/ml foi transferida para esses produtos, nas suas respectivas concentrações, e mantidas em temperatura ambiente, por 30 horas. Após este período, sob microscópio óptico, 100 conídios, foram quantificados aleatoriamente, de cada parcela, sendo computados os esporos germinados.

- **2.6 - Avaliação dos produtos para erradicação dos conídios de *M. fijiensis* aderidos aos frutos.**

Os produtos benomil, ecolife e amônia quaternária foram testados nas concentrações 100 ppm e 200 ppm, e a testemunha apenas com água: Tanto à solução de cada produto quanto à

testemunha foi adicionado 0,5 ml do espalhante agral/l. Para tanto, foram selecionados, aleatoriamente, cinco cachos de banana da cultivar Prata Anã, de um plantio apresentando severo ataque de *M. fijiensis*, na área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM. Desses cachos foram retiradas, aleatoriamente, 25 bananas para cada tratamento. Em cada tratamento, 25 bananas foram imergidas no seu respectivo produto e concentração, durante cinco minutos. A seguir foram mantidas à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, as bananas foram lavadas e esfregadas, com auxílio de um pincel, e o líquido centrifugado por dois minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e acrescentados 2 ml de água destilada no precipitado, o qual foi mantido em incubadora a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 horas. Com auxílio de microscópio óptico 100 conídios foram quantificados, aleatoriamente, sendo computados os germinados em cada tratamento. O mesmo procedimento foi adotado para quantificar o número de conídios aderidos nos frutos antes do teste.

3 - RESULTADOS

- 3.1 - Isolamento e esporulação de conídios de *M. fijiensis***

O patógeno foi isolado a partir de folhas de bananeiras da cultivar Prata Anã apresentando sintomas típicos da doença, coletadas na área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental (Manaus-AM).

O isolado encontra-se depositado na Coleção de Fungos da Coordenação de Pesquisas de Produtos Florestais do INPA, repicado em tubos de ensaio contendo meio de BDA e preservado em refrigerador a baixa temperatura (5°C). O isolado foi catalogado e codificado de acordo com as normas da micoteca do laboratório (LPM474).

O melhor meio para esporulação foi o BDA, seguido de V8-CaCO₃ e ACA, submetidos ao regime de luz seqüencial (Tabela 1).

Tabela 1 - Produção média de conídios de *M. fijiensis* / erlenmeyer em diferentes meio de cultura e regimes de luz.

Regimes de luz	Meios de cultura*						
	V8 ágar	V8-CaCO ₃ ágar	BCA	ACA	BDA	FBA	MIC
Escuro	0	0	0	0	0	0	0
Fotoperíodo	0	598.025	0	0	0	0	32.525
Seqüencial	1.754.360	3.151.108	43.075	2.078.025	3.617.050	0	61.250
Luz contínua	0	0	0	0	0	0	41.250

* BCA = Batata + cenoura + ágar; ACA = Água de coco + ágar; BDA = Batata + dextrose + ágar; FBA = Folha de bananeira + ágar; MIC = Farinha de soja + dextrose + ágar.

- **3.2 - Idade da cultura para obtenção de maior quantidade de conídios de *M. fijiensis***

A produção de conídios foi maior em culturas com 18 dias de idade e a viabilidade dos conídios foi praticamente estável durante todo o período de avaliação (Figura 1).

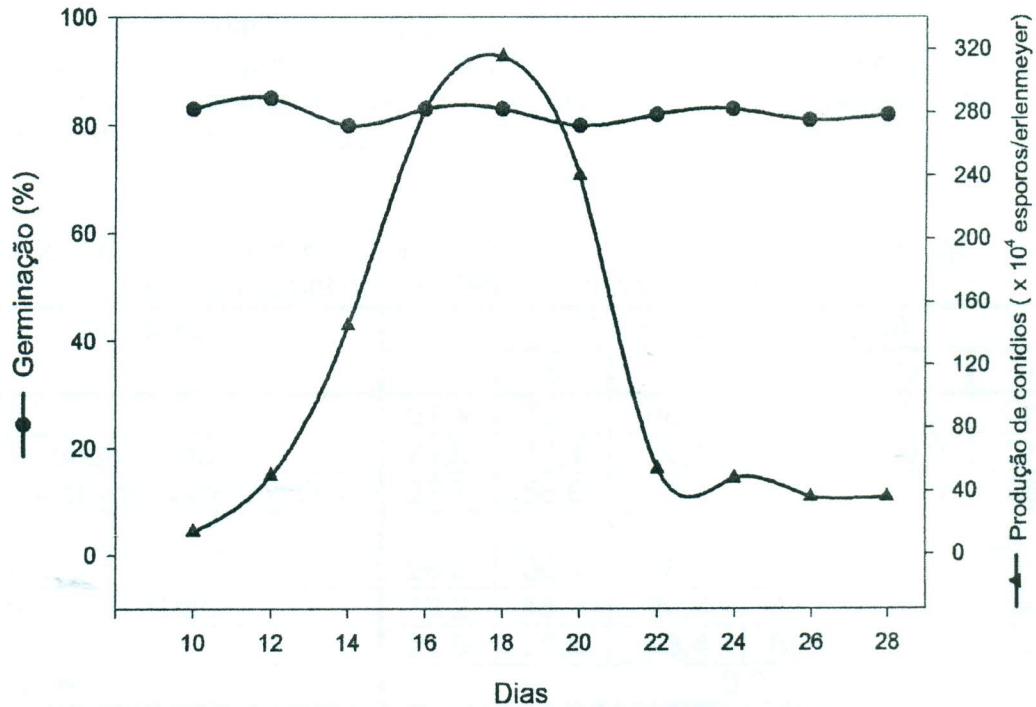


Figura 1 - Influência da idade da cultura na esporulação e viabilidade de conídios de *Mycosphaerella fijiensis*

- **3.3 - Sobrevivência dos conídios de *M. fijiensis* em diferentes materiais.**

Resultados semelhantes foram alcançados nas três condições de ambiente testadas (sala com condicionador de ar, sala com temperatura ambiente e galpão em condições de campo). Os conídios permaneceram viáveis até à última avaliação (60 dias) em folhas de bananeira e tecido, até 30 dias em papelão, madeira, plástico e pneu, até 18 dias nos frutos, devido ao seu apodrecimento, e até dez dias no ferro, provavelmente devido à oxidação do material.

- **3.4 - Viabilidade de *M. fijiensis* em folhas doentes destacadas.**

As folhas coletadas no campo apresentaram conídios do fungo viáveis até à última avaliação (60 dias) nos três ambientes testados.

- 3.5 - Efeitos de produtos para erradicação do patógeno**

O benomil, o ecolife e amônia quaternária a 100 ppm inibiram totalmente a germinação dos conídios de *M. fijiensis*, enquanto que formaldeído, hipoclorito de sódio e digluconato de chlorhexidina inibiram parcialmente (Tabela 2).

Tabela 2 – Porcentagem de inibição da germinação de conídios de *M. fijiensis* submetidos a diferentes produtos químicos.

Produtos	Concentrações (ppm)					
	1	5	10	25	50	100
Benomil	61,4	72,3	88,0	94,0	95,0	100,0
Amônia quaternária	71,0	77,1	90,4	91,6	96,0	100,0
Digluconato de chlorhexidina	27,7	56,6	62,7	63,9	72,3	88,0
Formaldeído	26,5	36,1	38,6	36,1	38,6	39,8
Hipoclorito de sódio	13,2	18,1	27,7	43,4	26,5	86,7
Ecolife	21,6	28,9	43,4	65,0	81,0	100,0
Testemunha*					0,0	

* Água destilada

- 3.6 - Efeitos dos produtos na erradicação de conídios do patógeno aderidos aos frutos.**

Antes do teste, constatou-se que haviam aderidos em cada fruto cerca de 11.000 conídios. Benomil, amônia quaternária e ecolife a 100 ppm e 200 ppm inibiram totalmente a germinação dos conídios aderidos nos frutos (Tabela 3).

Tabela 3 - Percentagem de inibição da germinação de conídios de *M. fijiensis* aderidos no fruto de banana submetidos a diferentes produtos químicos.

Produtos	Concentrações (ppm)	
	100	200
Amônia Quaternária	100,00	100,0
Benomil	100,00	100,0
Ecolife	100,00	100,0
Testemunha		0,0

– CONCLUSÕES

- O meio de cultura e o regime de luz exerceram grande influência na esporulação de *M. fijiensis*. O meio de BDA, seguido do V8 + CaCO₃ + ágar e ACA, submetidos ao regime de luz sequencial, foram os melhores para esporulação.
- A produção de conídios em meio de cultura BDA foi máxima em culturas com 18 dias de idade, enquanto que a germinação dos esporos manteve-se praticamente estável
- Os conídios aderidos à superfície de pedaços de tecido, papelão, plástico, madeira, ferro e pneu podem ser disseminados a longas distâncias por veículos e/ou pessoas que transitam em bananais afetadas por Sigatoka negra, independentemente de transportar o fruto.
- As folhas de bananeiras e frutos também podem ser um meio efetivo para disseminação do patógeno a longas distâncias.
- A presença de estruturas fúngicas (conídios de *M. fijiensis*) em folhas doentes é uma forte indicação para que tais folhas não sejam utilizadas como proteção para os frutos durante o transporte, pois elas servem de fonte de inóculo para disseminação do fungo a longas distâncias.
- Benomil, ecolife e amônia quaternária a 100 ppm inibiram totalmente a germinação dos conídios de *M. fijiensis*.
- A imersão dos frutos contaminados durante cinco minutos em solução de ecolife, amônia quaternária e benomil a 100 ppm e 200 ppm foi eficiente para inibir a germinação dos conídios.
- Uma pulverização de benomil, ou de ecolife, ou de amônia quaternária a 200 ppm em todos os materiais utilizados no transporte dos frutos, prováveis meios de disseminação do fungo, poderá reduzir os riscos da disseminação do patógeno.

EXECUÇÃO

**Luadir Gasparotto
Rogério Eiji Hanada
José Clério Rezende Pereira**

**Carlos Alberto de Souza Ferreira
Chefe do SSV/DFA/AM**

**Arlena Maria Guimarães Gato
Chefe do SEDAG/DFA/AM**

**Jamil Tuffi Sarmento Nicolau
Delegado Federal da DFA/AM**