

Metodologias para Manuseio de *Mycosphaerella musicola* em Laboratório



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

Documentos 198

Metodologias para Manuseio de *Mycosphaerella musicola* em Laboratório

*Zilton José Maciel Cordeiro
Hermínio Souza Rocha
Aparecida Gomes de Araújo
Autores*

Embrapa Mandioca e Fruticultura

Rua Embrapa, s/n

Caixa Postal 007

CEP 44380-000, Cruz das Almas, Bahia

Fone: (75) 3312-8048

Fax: (75) 3312-8097

Home page: <http://www.cnpmf.embrapa.br>

E-mail: sac@cnpmf.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Aldo Vilar Trindade

Vice-presidente: Ana Lúcia Borges

Secretária: Maria da Conceição Pereira Borba dos Santos

Membros: Cláudia Fortes Ferreira

Fernando Haddad

Edson Perito Amorim

Hermínio Souza Rocha

Marcio Eduardo Canto Pereira

Paulo Ernesto Meissner Filho

Augusto César Moura da Silva

Sônia Maria Sobral Cordeiro

Supervisão editorial: Ana Lúcia Borges

Revisão técnica: Aristoteles Pires de Matos

Fernando Haddad

Revisão Gramatical: Hermínio Souza Rocha

Ficha catalográfica: Sônia Maria Sobral Cordeiro

Tratamento de ilustrações: Maria da Conceição Borba

Editoração eletrônica: Maria da Conceição Borba

1ª edição

1ª versão (2011): 500 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Embrapa Mandioca e Fruticultura

Cordeiro, Zilton José Maciel

Metodologias para manuseio de *Mycosphaerella musicola* em laboratório/ Zilton José Maciel Cordeiro, Hermínio Souza Rocha, Aparecida Gomes de Araújo. – Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2011.

32 p.: il. ; 21cm. – (Documentos / Embrapa Mandioca e Fruticultura, ISSN 1516-5728; 198).

1. Metodo de laboratorio 2. Fungo 3. *Mycosphaerella musicola* l. Rocha, Hermínio Souza. II Araújo, Aparecida Gomes de Araújo III. Título. IV. Série.

CDD 371.382 (21. ed.)

© Embrapa 2011

Autores

Zilton José Maciel Cordeiro

Eng.-Agr., D.Sc., pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

zilton@cnpmf.embrapa.br

Hermínio Souza Rocha

Eng.-Agr., D.Sc., analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, BA.

herminio@cnpmf.embrapa.br

Aparecida Gomes de Araújo

Eng.-Agr., D.Sc., pesquisadora da Emdagro/SergipeTec/Embrapa, Aracaju, SE.

agaraujo2003@yahoo.com.br

Apresentação

Decorrido mais de uma década, desde que foram identificados os primeiros focos da Sigatoka-negra nos bananais brasileiros, uma boa parte das áreas produtoras de banana ainda não foram acometidos pela Sigatoka-negra e, em muitas regiões onde essa doença foi identificada, a prevalência ainda é da Sigatoka-amarela. Considerando estas informações, pode-se afirmar que a Sigatoka-amarela continua sendo o principal problema fitossanitário da bananicultura brasileira, quando se analisa o território nacional como um todo.

Diferentemente de muitas outras espécies de fungos fitopatogênicos, *Mycosphaerella musicola*, agente causal da Sigatoka-amarela da bananeira apresenta um lento desenvolvimento em condições in vitro, exige métodos específicos para o isolamento da espécie a partir de tecidos vegetais com sintomas; manuseio específico para multiplicação do patógeno, para a observação da formação de esporos e inoculação do patógeno. Isso tem restringido substancialmente a realização de trabalhos com este patossistema, fato que tem sido observado pelas consultas frequentes sobre aspectos metodológicos que, aparentemente são simples, mas que não estão disponíveis na maioria dos trabalhos científicos publicados.

Assim, a Embrapa Mandioca e Fruticultura, por intermédio de seus pesquisadores, disponibiliza o presente documento à comunidade científica, onde estão retratadas as bases para o manuseio correto de *M. musicola* em condições de laboratório, facilitando assim a realização de trabalhos que envolvam o patossistema *M. musicola*/bananeira. A publicação é bastante ilustrativa, apresentando todos os passos necessários para a realização de isolamentos, multiplicação do patógeno e indução da esporulação, até o ponto de inoculação no hospedeiro.

Domingo Haroldo Reinhardt
Chefe-Geral

Sumário

Introdução	9
Histórico da Sigatoka-amarela da bananeira	10
Biologia e Sintomatologia	12
A produção de conídios e ascósporos e sua relação com fatores climáticos	15
Isolamento de <i>Mycosphaerella musicola</i>	18
Produção de inóculo de <i>Mycosphaerella musicola</i>	24
Inoculação de <i>Mycosphaerella musicola</i> em plantas teste	27
Considerações finais	30
Referências	30

Metodologias para Manuseio de *Mycosphaerella musicola* em Laboratório

Introdução

A bananicultura é uma das atividades de grande importância no agronegócio brasileiro, embora o País ainda não seja um grande exportador dessa fruta. Todavia, está entre os maiores produtores mundiais, entre os quais ocupa a quinta posição. A produção brasileira é da ordem de sete milhões de toneladas anuais, cujas vendas externas estão em torno de 3% da produção. Isso mostra a importância dessa fruta para o mercado interno, destacando-se pelo consumo de 97% de tudo que é produzido. Outro aspecto de grande relevância é a participação da agricultura familiar na produção de banana, respondendo pela maior parte da produção. É, portanto uma cultura de enorme importância na geração de renda e na fixação do homem no campo, desempenhando assim, enorme papel social. Destaque atual deve ser dado também ao crescimento da bananicultura irrigada, onde a banana aparece como uma das fruteiras preferenciais para implantação em projetos públicos de irrigação, dada a amplitude de mercado e o retorno proporcionado pela atividade. Para pequenos produtores, principalmente, um aspecto de grande relevância é a renda semanal propiciada pela atividade após o primeiro ciclo de produção. Do ponto de vista climático, que reflete diretamente no comportamento fitossanitário da cultura, o Brasil apresenta vantagens comparativas em relação a muitas áreas de produção global, o que poderá refletir, em futuro próximo, na participação brasileira no mercado

exportador. O País possui extensas áreas com condições climáticas pouco favoráveis ao desenvolvimento de doenças foliares como a Sigatoka-amarela. Isso significa produzir sem ou com baixo uso de agrotóxicos, uma situação desejada por consumidores do mundo inteiro.

À semelhança das demais culturas, a bananeira é atacada por diversas pragas e doenças. Entre as doenças que mais afetam a bananicultura brasileira encontra-se a Sigatoka-amarela (*Mycosphaerella musicola* Leach), causando elevadas perdas tanto na produção quanto na qualidade da fruta. Isto significa que esta continua sendo uma doença de grande importância econômica para a bananicultura brasileira, mesmo após a constatação da Sigatoka-negra, o que induz também a pensar que os trabalhos de pesquisas envolvendo o agente causal da Sigatoka-amarela continuam merecendo a atenção da pesquisa na busca de estratégias de controle. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho é divulgar, de forma bastante ilustrativa, aspectos diversos da morfologia e fisiologia de *Mycosphaerella musicola*, enfatizando especialmente os métodos utilizados para seu manuseio em laboratório visando o isolamento, produção de inóculo e inoculação.

Histórico da Sigatoka-amarela da bananeira

A Sigatoka-amarela, também denominada mal-de-Sigatoka, cercosporiose ou mancha foliar da bananeira, causada por *Mycosphaerella musicola* Leach (Stat. Conid. *Cercospora musae* Zimm.) foi observada pela primeira vez próximo a Buitenzorg, 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 que se observou pela primeira vez, a ocorrência da doença de forma epidêmica, resultando no nome popular “doença de Sigatoka” ou simplesmente “Sigatoka”. Subseqüentemente, a doença foi identificada na Ásia, África, Américas Central e do Sul e Caribe, tendo rapidamente se tornado uma das mais importantes moléstias 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 *Cercospora 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 intensidade epidêmica em muitas das ilhas e áreas territoriais das Américas Central e do Sul, tendo assumido uma importância econômica de primeira classe, devido aos efeitos destrutivos verificados (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 observada com 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 disseminada 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 competitiva como é

o caso do Nordeste, Sudeste e Sul. Entre os Estados da Região Sudeste a exceção é São Paulo, onde a Sigatoka-negra, nos bananais do vale do Ribeira, já prevalece sobre a amarela, acarretando aumento no número de aplicações de defensivos. Nos demais Estados, onde a doença já foi constatada, o avanço tem sido relativamente lento (Cordeiro, 2007).

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, 1970). 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 pseudocauls. Em escala macroscópica, os espermogônios, de alguma forma, assemelham-se às pontuações negras formadas pelas frutificações conidiais, porém com um formato melhor delimitado de pontuação. Estas estruturas podem ser formadas em ambas as superfícies foliares, porém com maior predominância na abaxial (Figura 1). 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).

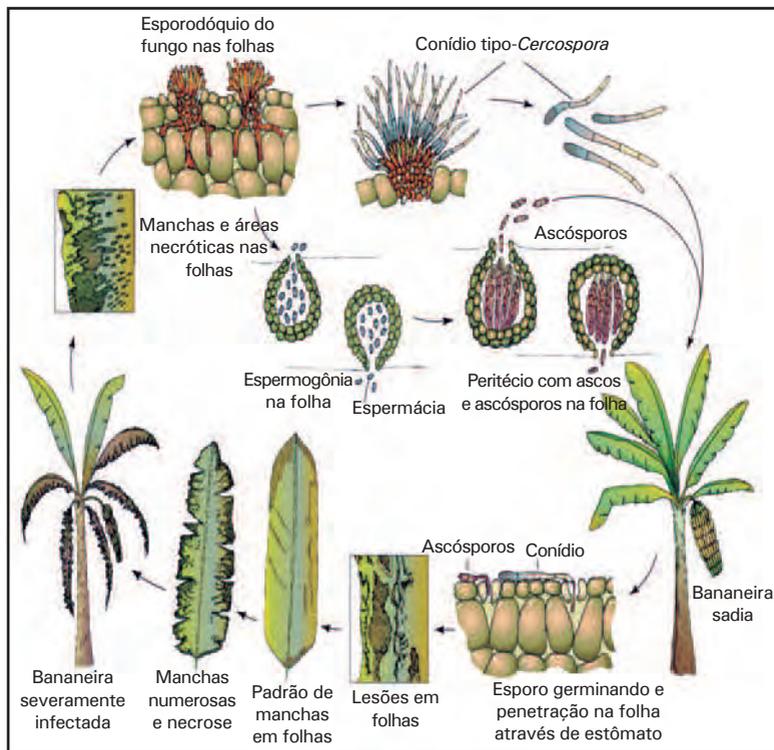


Figura 1. Ciclo de *Mycosphaerella* spp em bananeira, mostrando as fases sexuada (teliomórfica) e assexuada (anamórfica) do patógeno (Agrios, 2005).

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. Estes são produzidos de forma contínua em climas úmidos, sendo disseminados pela água acumulada na superfície foliar durante as 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 a partir dos pseudotécios em períodos de alta umidade (Figura 2), ou mesmo em climas secos porém com ocorrências de orvalhos pesados (Simmonds, 1966).

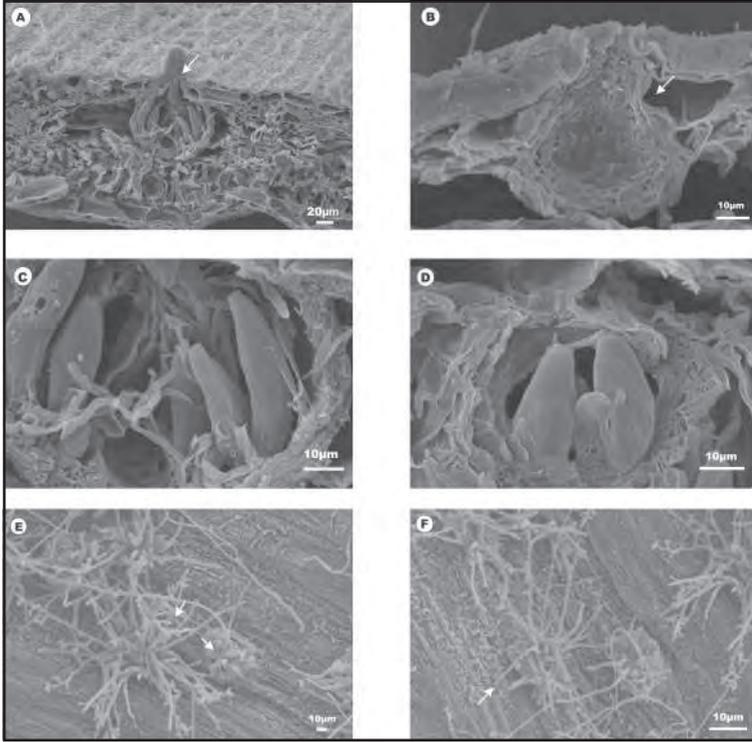


Figura 2. Fotos de microscopia eletrônica de varredura de *Mycosphaerella musicola* contendo detalhes da liberação dos ascósporos (A) a partir do interior dos pseudotécios (B), localizados nas folhas em decomposição, contendo os ascos (C, D), de onde são liberados os ascósporos (A). Estruturas dos esporodóquios liberando conídios (E,F) (Fonte: Rocha et al. 2007).

No que concerne aos sintomas da Sigatoka-amarela, Meredith (1970), classificou o desenvolvimento das lesões em seis estádios: I- Estádio inicial de listra – A pontuação é perceptível ao olho nú apenas como uma leve mancha de descoloração verde-amarelada; II- Segundo estágio de listra - A mancha aumenta de tamanho, principalmente em comprimento, ainda com aparência de descoloração verde-amarelada; III- Terceiro estágio de listra - A mancha começa a dilatar-se levemente na largura e principalmente no comprimento, tornando o centro da lesão com coloração levemente avermelhada enferrujada; IV- Primeiro estágio de mancha - A listra ganha uma coloração marrom escuro,

e simultaneamente, ou dentro de 24 horas, forma-se um halo com aspecto de encharcamento de cor marrom quando a folha encontra-se túrgida. Este halo é visível quando se observa a lesão contra a luz solar durante o período da manhã. A mancha aumenta consideravelmente de tamanho neste estágio. A listra chega a um estágio em que é facilmente reconhecida como uma lesão circular. V- Segundo estágio de mancha – A porção marrom escura da mancha torna-se enrugada e encolhida e o halo torna-se de coloração mais escurecida. VI – Terceiro estágio de mancha – A mancha encontra-se plenamente desenvolvida, com a porção central abaulada e de coloração cinza, com o halo de coloração marrom escuro ou preto, formando um anel bem distinto ao redor da lesão. Este tipo de lesão permanece bem definida mesmo quando a folha está morta, com o anel escuro bem distinto circundando a lesão.

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.

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 inferior 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, caracterizando-se como um evento dependente da ocorrência de chuvas. Os horários de ocorrência de picos de descarga de ascósporos foram entre 18h00 e 03h00.

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. Calpouzus (1955) observou que as esporulações só ocorriam quando a umidade relativa estava igual ou superior a 98%, e também se houvesse a presença de orvalho. Os conídios são primariamente formados na superfície superior de folhas não pulverizadas, e só ocorrem durante a noite (Wardlaw, 1961). Calpouzus (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 *P. musae* da superfície de uma mancha na folha.

Nas pontuações primárias, de coloração marrom, ocorre a formação abundante de conídios em pequenos esporodóquios na face inferior das folhas. Entretanto, essas estruturas permanecem pequenos e subseqüentemente desaparecem com o colapso do tecido. Posteriormente, os esporodóquios são encontrados em maior número e em tamanho maior, em lesões mais velhas com os centros de coloração cinza, na superfície superior. Sob condições adequadas de umidade, estas lesões podem produzir conídios continuamente durante 30 dias.

Observações ao microscópio, permitem verificar que esses esporodóquios, são distribuídos em linhas como pequenas pontuações negras, paralelas às nervuras secundárias. Os esporodóquios 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 de água (Wardlaw, 1961).

Os ascósporos são formados no interior dos ascos, os quais encontram-se contidos nos pseudotécios 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 de água sobre a lesão. Ascósporos podem assim, ser dispersos a partir das folhas baixas que não sofreram a ação do orvalho, enquanto os conídios não serão formados nestas. Ascósporos são dispersos pelo vento, enquanto a dispersão dos conídios é condicionada à presença de 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).

Observa-se que publicações mais antigas fazem referência ao agente causal da Sigatoka-amarela, na forma assexuada, como gênero *Cercospora*, em lugar da denominação atual de *Pseudocercospora*; acérvulos em lugar dos atuais esporodóquios e, na forma sexuada, aparece a denominação de peritécio, hoje referida como pseudotécio. Uma característica da ordem Dothideales, à qual pertence a *Mycosphaerella musicola*, é a presença de ascos bitunicados, produzidos em ascomas do tipo ascostroma, que no caso dessa espécie, é uniloculado, recebendo a denominação de pseudotécio, cujo formato é muito semelhante a um peritécio ou apotécio (Alexopoulos, 1979).

Isolamento de *Mycosphaerella musicola*

O manuseio, em laboratório, do fungo *Mycosphaerella musicola* é uma das etapas do trabalho com o agente causal da Sigatoka-amarela da bananeira, que quase sempre trás dificuldades no andamento das atividades. *M. musicola* é um fungo de crescimento muito lento em meio de cultura e, por isso mesmo, as técnicas comuns de isolamento de patógenos não oferecem sucesso para esta espécie. Nesse sentido, métodos alternativos têm sido utilizados. Abaixo são descritas duas alternativas de isolamento a partir de conídios e de ascósporos.

Isolamento a partir da captura de conídios

As metodologias descritas a seguir foram trabalhadas, com algumas modificações, a partir dos trabalhos de Cordeiro (1997) e Abreu (2000). As folhas apresentando lesões características da Sigatoka-amarela (Figura 3) são coletadas, transportadas para o laboratório, onde são lavadas em água de torneira com uso de esponja macia e detergente, deixando-as secar em papel toalha. Utilizando pinça e bisturi, procede-se a retirada de pequenos retângulos correspondentes à lesão (cerca de 10mm x 5mm), os quais são submetidos à desinfestação superficial em álcool 70%, durante um minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 5 minutos. Após a desinfestação segue-se a tríplice lavagem em água destilada estéril e a transferência para placas de Petri, contendo meio ágar-água a 2%. Os pequenos pedaços de folha devem ser dispostos em linhas paralelas nas placas, com a superfície superior voltada para cima. A disposição em linhas paralelas irá facilitar a visualização sob microscópio estereoscópico, quando da captura dos conídios.

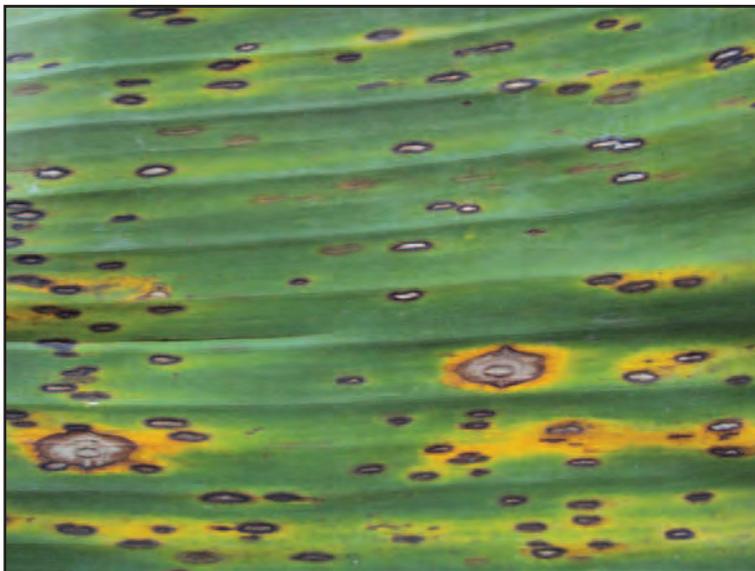


Foto: Aparecida Gomes de Araújo

Figura 3. Fração de folha de bananeira com sintomas característicos de Sigatoka-amarela, para realização de câmara úmida.

As placas contendo as porções foliares devem ser mantidas em estufa incubadora tipo BOD sob temperatura controlada a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas, durante 48hs. Após esse período as seções são examinadas ao microscópio estereoscópico para identificação e localização dos esporodóquios (Figuras 4B, 4C e 4D). Com o auxílio de estilete de ponta fina, flambado, são coletados os conídios e transferidos para placas de Petri ou tubos de ensaio contendo meio de cultura (BDA ou Malte).

Uma outra alternativa para isolamento de *M. musicola* é a utilização de pedaços maiores de folhas de bananeiras apresentando os sintomas da Sigatoka (5 x 5 cm), colocando-os em câmara úmida, preparada em placa de Petri contendo papel filtro previamente embebido em água destilada (Figura 4A). Sob as mesmas condições anteriormente descritas, após 48 horas, são identificados e localizados os esporodóquios, para em seguida proceder-se à coleta dos conídios e transferência para placas de Petri ou tubos de ensaio com meio de cultura.

Fotos: Aparecida Gomes de Araújo

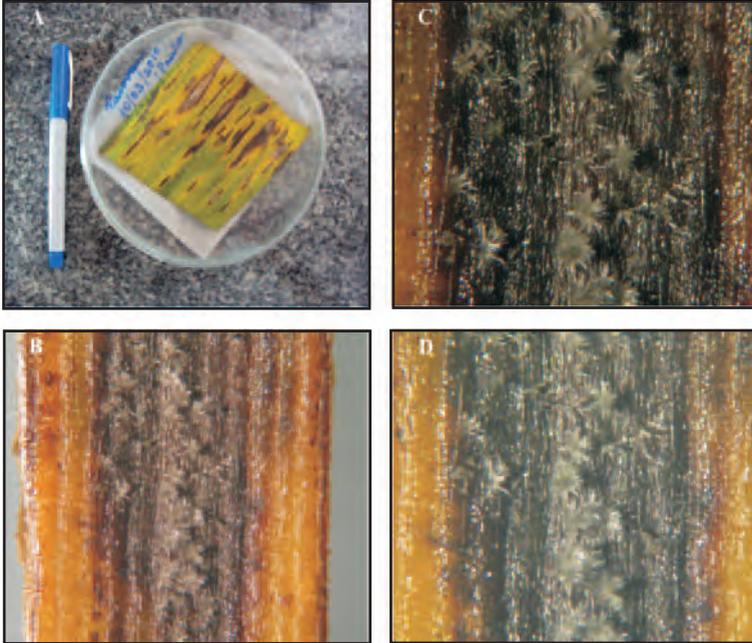


Figura 4. A - Câmara úmida de folhas de bananeira para emissão de esporodóquios, B - esporodóquios de *Mycosphaerella musicola*, agente causal da Sigatoka-amarela após 48 horas de incubação em ágar-água (2%), C e D - esporodóquios visualizados em microscópio estereoscópico.

Realizada a primeira operação, após cinco a sete dias, são visualizadas as colônias compactas de coloração acinzentada, crescendo na superfície do meio de cultura (Figura 5A). As colônias de *Mycosphaerella musicola* apresentam pequeno crescimento radial, mas um bom crescimento aéreo, de formato arredondado, de consistência dura, difíceis de serem quebradas (Figura 5 B). Há ainda variação quanto à coloração, que geralmente altera com a idade da cultura, podendo ser observadas as cores cinza claro, cinza escuro, branco e rósea.

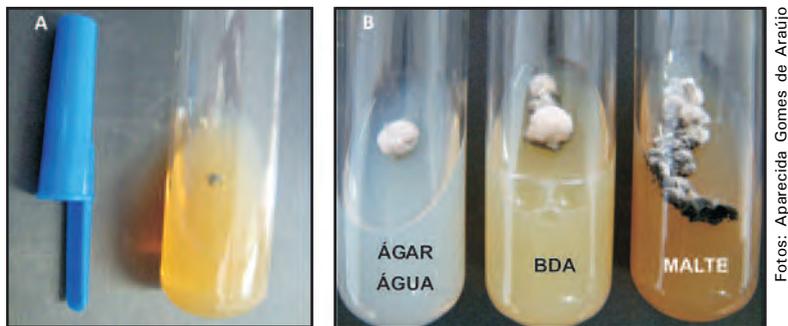


Figura 5. Característica das colônias de *Mycosphaerella musicola* em diferentes meios de cultivo. A - com uma semana após isolamento e B - após 30 dias de cultivo em diferentes meios de cultura.

Isolamento por captura de ascósporos (adaptação de Orozco-Santos, 1998)

Porções de folhas de bananeiras contendo lesões de Sigatoka-amarela em estágio 6, de acordo com a escala de Meredith (1970) (Figura 6), são coletadas e cortadas em dimensões de aproximadamente 15 x 15 cm. As porções são então lavadas em água destilada e esterilizada (ADE), passando uma esponja com detergente neutro, levemente em ambas as superfícies foliares. Após a retirada do detergente, as folhas devem ser deixadas em ADE por 5 minutos. Em seguida, sob condições de fluxo laminar, procede-se a montagem das porções das folhas nos topos das placas de petri (Figura 7), com as superfícies inferiores voltadas para o meio de cultura, agar-água, no interior das placas. Desta forma, em aproximadamente duas horas os ascósporos serão liberados a partir dos ascos, caindo diretamente sobre a superfície do meio de cultura e iniciando o processo de germinação (Figura 8). Cabe ressaltar que as porções de folhas de bananeiras são montadas com uma folha de papel de filtro umedecido aderido à face superior, de forma que a umidade relativa seja mantida próximo da saturação e haja a liberação dos ascósporos com o entumescimento dos ascos. Com isso gotas d'água poderão cair no meio de cultura, mas não irão comprometer em absoluto a captura dos ascósporos posteriormente.

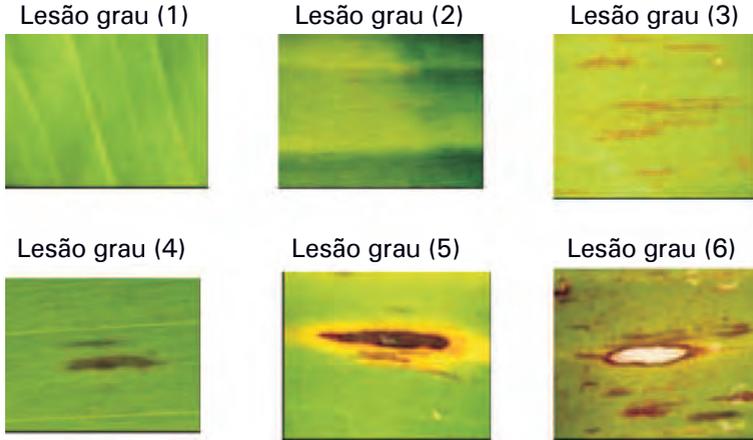


Figura 6. Escala de Meredith (1970), para diferentes graus de desenvolvimento das lesões de Sigatoka-amarela.

Foto: Herminio Souza Rocha



Figura 7. Montagem das porções de folhas de bananeiras contendo lesões de Sigatoka-amarela em estágio 6, para indução da descarga de ascósporos e posterior coleta para produção de cultura monospórica.

Após aproximadamente 2 horas de descarga, serão observados ascósporos em estágio inicial de germinação, juntamente com outros já bem germinados e ramificados (Figura 8). Ao se encontrar poucos ascósporos espaçados, recorta-se uma porção do meio de cultura, com o auxílio de um estilete, depositando o mesmo sobre uma lâmina para visualização sob microscópio óptico, no aumento de 10x. Com o auxílio de um estilete, coleta-se uma porção de meio de cultura que tenha um ascósporo isolado, transferindo esta pequena porção de meio de cultura para outra placa de Petri contendo meio BDA.

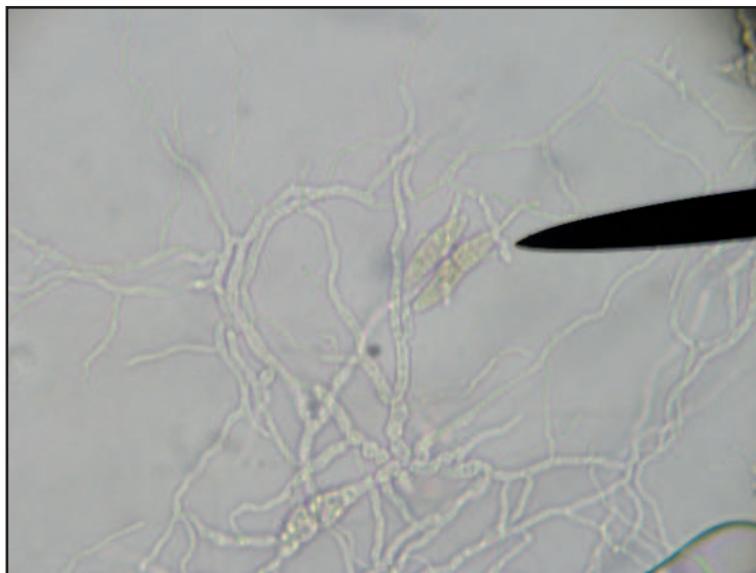


Foto: Hermínio Souza Rocha

Figura 8. Visualização dos ascósporos em objetiva de 10x após 2 horas de liberação. Estágio ideal para coleta e transferência para nova placa de Petri, contendo meio BDA, para cultura monospórica.

Produção de inóculo de *Mycosphaerella musicola*

Cultivo de *M. musicola*

Culturas monospóricas ou isolamentos a partir de esporodódios, mantidos em estufa tipo BOD devem ser manuseadas sob ambiente de câmara de fluxo laminar vertical. Para o estabelecimento das placas, retiram-se frações das colônias dos tubos de ensaio, com o auxílio de um estilete procedendo-se a maceração, com o auxílio de almofariz e pistilo. Em seguida, dilui-se o macerado em água destilada esterilizada e, utilizando pipeta graduada, transfere-se a suspensão de fragmentos de micélio para as placas de Petri contendo meio de cultura V8, espalhando-a com o auxílio de uma alça de Drigalski, conforme as etapas demonstradas na Figura 9. Em seguida, as placas devem ser seladas com filme plástico, até o limite de $\frac{3}{4}$ do perímetro total, de forma a possibilitar trocas gasosas com o ambiente externo, transferido-as para estufas tipo BOD, com temperatura ajustada para 25 ± 2 °C e luz constante (Cordeiro, 1997; Abreu, 2000).

De acordo com trabalhos realizados (Abreu, 2000) o maior rendimento de esporos de *M. musicola*, ocorre com cerca de onze dias de cultivo a 25 °C e luz constante. Todavia, verificou-se nesse trabalho que após três dias de cultivo já há produção de esporos. Não há nenhuma informação, por outro lado, que correlacione a idade da cultura com agressividade do isolado.

Obtenção da suspensão de inóculo

Conforme informação anterior, após 11 dias de incubação, a cultura atinge seu maior rendimento e está no ponto de efetuar a preparação da suspensão de inóculo. Para tanto, adiciona-se um volume de 10 mL de água destilada por placa e procede-se à liberação dos conídios com o auxílio de uma escovinha macia ou pincel (Figura 10C e D), que deve ser passado sobre as colônias com movimentos suaves. Após 15 minutos de repouso, a suspensão de esporos obtida deve ser filtrada em gaze e sua concentração ajustada com auxílio de câmara de Neubauer (Figura 10E e F).



Fotos: Aparecida Gomes de Araújo

Figura 9. Etapas do processo de multiplicação de *Mycosphaerella musicola* (A a F), para produção de inóculo. A e B – produção de um macerado a partir de colônias do fungo; C e D – transferência de uma alíquota do macerado para meio V8; E e F – espalhamento do macerado sobre o meio usando alça de Drigalski.

Sob microscópio óptico poderão ser visualizadas frações de micélio (Figura 11A), esporodóquios e os conídios soltos (Figuras 11B, C e D). A observação da suspensão obtida após esporulação, no microscópio óptico, utilizando câmara de Neubauer, permite visualizar os conídios livres (Figura 11D).

Fotos: Aparecida Gomes de Araújo

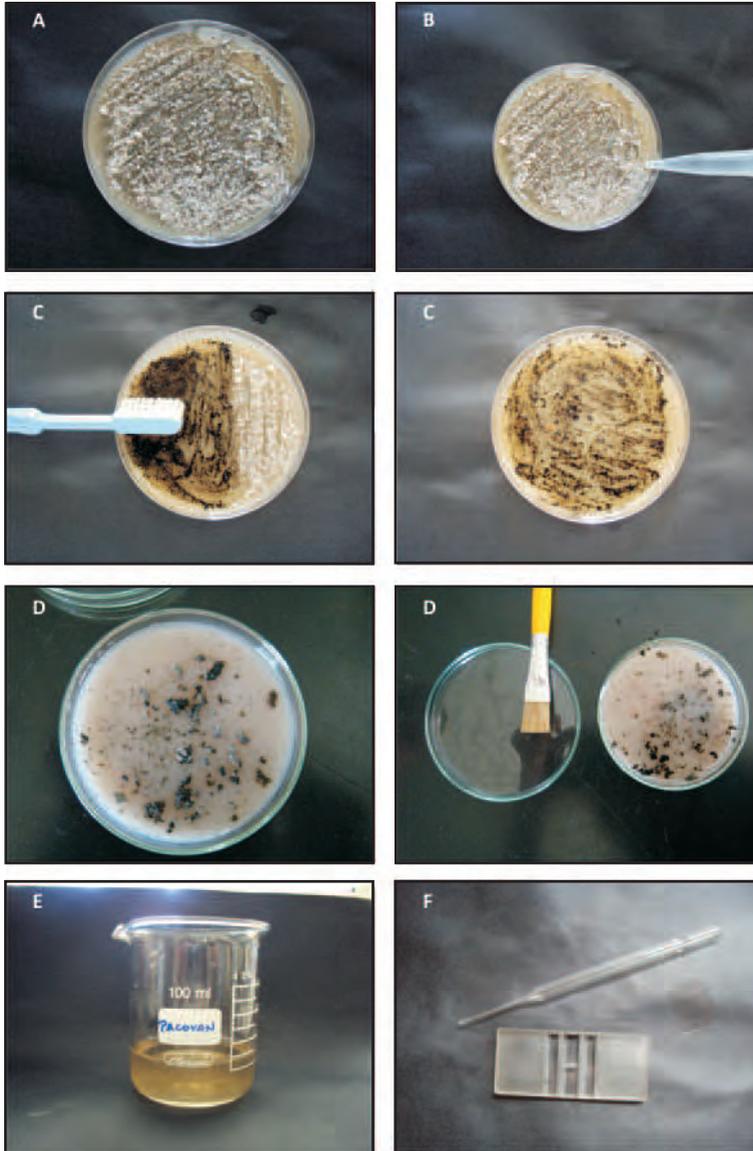
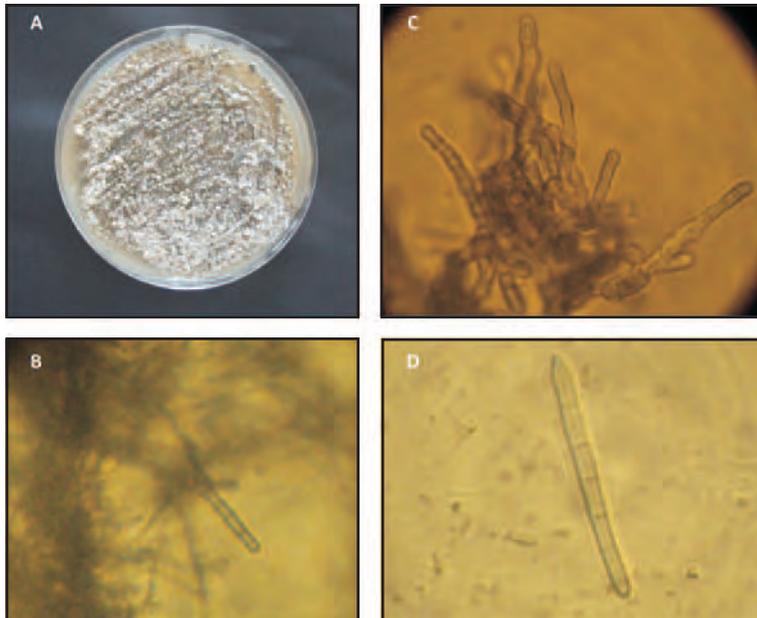


Figura 10. Sequência para liberação de conídios de *Mycosphaerella musicola* em cultura: A – aspecto da colônia; B - adição de água; C – liberação de conídios com escova macia; D – liberação com pincel; E – suspensão obtida; F - contagem de esporos em câmara de Newbauer.



Fotos: Aparecida Gomes de Araújo

Figura 11. A - Placa de Petri contendo o micélio de *Mycosphaerella musicola* esporulado, B - conídios presos ao conidióforo, C- detalhe de conidióforos e D- conídio visualizado sob microscópio.

Inoculação de *Mycosphaerella musicola* em plantas teste

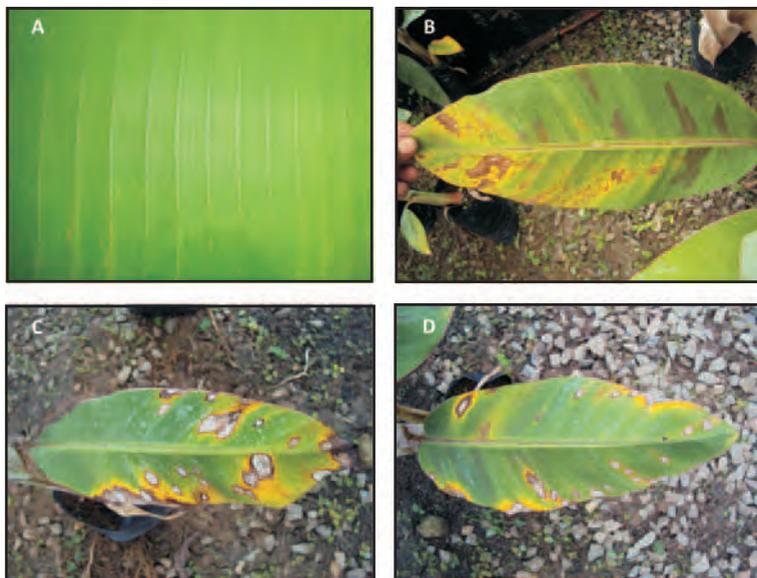
Com as devidas diluições, a concentração deve ser ajustada para 1×10^4 conídios/mL por meio da equação $C_i.V_i = C_f.V_f$, onde C_i = concentração inicial; V_i = volume inicial; C_f = concentração final e V_f = volume final. Com as concentrações ajustadas, a suspensão estará pronta para ser inoculada nas plantas de bananeira, em quaisquer trabalhos de fitopatologia com o patossistema Sigatoka-amarela (Figura 12).

Foto: Hermínio Souza Rocha



Figura 12. Inoculação de plantas de bananeira na face inferior da folha 1 (um) com suspensão de conídios de *Mycosphaerella musicola*.

A inoculação do patógeno deve ser realizada na superfície inferior do limbo das folhas números 1 e 2, mediante pulverização da suspensão até o ponto de escoamento. A depender das variáveis climáticas, após 17-25 dias da inoculação, os primeiros sintomas (Figura 13A) são visualizados (período de incubação da doença), sendo a evolução dos estádios verificada ao longo do desenvolvimento da doença, atingindo o período de latência, ou seja, o período de tempo compreendido entre a inoculação e a esporulação, o que pode variar de acordo com a cultivar, a agressividade do isolado e as condições climáticas (Figuras 13B, 13C e 13D).



Fotos: Aparecida Gomes de Araújo

Figura 13. Sintomas iniciais da Sigatoka-amarela (A) e com 30 dias após inoculação de plantas de bananeira cv Prata Anã com isolados de *Mycosphaerella musicola* oriundos de duas diferentes localidades, Cruz das Almas-BA (B e C) e Lavras-MG (D).

Em condições de campo e condições climáticas adequadas, o sintoma inicial da doença caracteriza-se por uma leve descoloração em forma de ponto entre as nervuras secundárias da segunda até a quarta folha, a partir da vela. Essa descoloração aumenta paulatinamente, transformando-se em uma estria de tonalidade amarela. Com o tempo as pequenas estrias crescem e formam manchas necróticas, elípticas e alongadas, dispostas paralelamente às nervuras secundárias da folha. Nesse estágio observa-se na parte central da mancha uma coloração cinza, com amarelecimento das bordas.

A partir do estágio de mancha, é possível observar as frutificações do fungo sob a forma de pontuações negras. Em estádios avançados da doença, principalmente nos surtos severos, dá-se o coalescimento das lesões, com o comprometimento de uma grande área foliar, caracterizando o efeito mais drástico da Sigatoka-amarela, ou seja, a morte prematura das folhas com a perda em atividade fotossintética.

Considerações Finais

A espécie *Mycosphaerella musicola* (*Pseudocercospora musae*), agente causal da Sigatoka-amarela da bananeira, é um patógeno de natureza heterotática, com alta diversidade genética no território brasileiro, onde está presente desde a década de 1940. O processo evolutivo, impulsionado pelas variações climáticas e múltiplas variedades hospedeiras, foi determinante para o estabelecimento de um patógeno altamente adaptado às condições brasileiras, fazendo-se presente em todo o território nacional, mesmo nas regiões de clima hostil, caracterizado por um longo período seco. As características do patógeno aliadas à diversidade ambiental, favoreceram a formação de uma população de *M. musicola* com alta variabilidade em virulência e agressividade, dificultando, conseqüentemente, as ações de controle da doença. A espécie *M. fijiensis*, agente causal da Sigatoka-negra, embora esteja presente em estados do Sudeste e Sul, ainda não conseguiu suplantá-la, conforme era esperado. Isso certamente tem a ver com a adaptabilidade da espécie às condições brasileiras. Diante disso, a realização de estudos visando o melhor conhecimento da variabilidade desse patógeno, aliado às avaliações epidemiológicas, serão de suma importância, para auxiliar na elaboração de medidas de manejo visando reduzir os impactos da Sigatoka-amarela, já que ainda constitui-se na principal doença responsável pelo comprometimento fitossanitário dos bananais no Brasil. Este documento apresenta as principais bases metodológicas disponíveis para contribuir com a execução de trabalhos de pesquisas neste patossistema, com o objetivo de auxiliar no desenvolvimento de ensaios e experimentos, para a melhor elucidação das interações de *M. musicola* com os diferentes ambientes em que se encontra presente.

Referências

ABREU, K. C. L. de M. Variabilidade morfológica e patogênica em isolados de *Mycosphaerella musicola* Leach. Cruz das Almas, 2000, 50p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 2000.

- AGRIOS, G.N. *Plant Pathology*. Amsterdam: Elsevier Academic. (2005).
- ALEXOPOULOS, C. J.; MINS C. W. *Introductory mycology*. New York, John Wiley & Sons, 1979, 632p.
- CALPOUZOS, L. *Studies on the Sigatoka disease of bananas and its fungus pathogen*. Atkins Gnd. Research Lab., Cuba, 70, 1955.
- CORDEIRO, Z.J.M. Doenças. In: Alves E. J., org. *A Cultura da Banana Aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais 1ª*. Ed. Brasília: Embrapa- SPI/Cruz das Almas: Embrapa – CNPMF, 1997 Cap. XIII p. 353-408.
- CORDEIRO, Z.J.M. Variabilidade patogênica de isolados de *Mycosphaerella musicola* e resistência induzida e genética em genótipos de bananeira. Piracicaba, 1997, 118p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.
- CORDEIRO, Z.J.M.; MATOS, A.P. de; FERREIRA, D.M.V.; ABREU, K.C.L. de M. **Manual para identificação e controle da Sigatoka-negra da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2005. 36p. (Documento 153).
- CORDEIRO, Z.J.M. Panorama Nacional das Principais Doenças da Bananeira. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA (org.), **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Universidade Federal de Lavras: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 165-184. 2007.
- 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.
- FULTON, R.H. Perfect stages of *Cercospora musae* in Central América and factors affecting ascospore frequency. (Abstrc.) *Phytopathology*, vol 52 p. 11. 1962.
- KIMATI, H.; GALLI, F. Doenças da bananeira *Musa* spp. In: **MANUAL de Fitopatologia**; doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 1980. v.2, p. 87-101.
- KNOWLES, C.H. ‘Visit to upper Rewa to investigate leaf diseases of the banana’ Pamphl. Dep. Agriculture Fiji No. 24. 5p. 1916.
- PHILPOTT, J.C. & KNOWLES, C.H. ‘Report on a visit to Sigatoka’ Pamphl. Dept. of Agriculture. Fiji No. 3. 1913.
- 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 variety in Jamaica. Gov. Printer. Kingston, Jamaica. 118p. 1946.

McGAHAN, M.W. & FULTON, R.H. Leaf spot of bananas 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, D.S. Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola*. **Phytopathology Paper** No. 11 Commonwealth Mycology Institute, 147 p. 1970.

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 52: p. 459-467. 1970.

PRICE, D. Climate and control of banana leaf spot. Span 3. p. 122-124. 1960.

ROCHA, H. S. ; POZZA, E. A. ; MEDICE, R. ; ALVES, E. . Morphological descriptions of the anamorph and teleomorph of *Mycosphaerella musicola* Leach., by scanning electron microscopy (SEM). In: XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, 2007, Búzios. Anais, 2007.

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

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

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

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

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

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

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**. Longmans, Edinburgh, 1961. Cap. 11, p. 314-341.



Embrapa

Mandioca e Fruticultura

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

G O V E R N O F E D E R A L
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA