

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO, AGRICULTURA E AMBIENTE
CURSO DE AGRONOMIA

Correlação do crescimento micelial e produção de conídios em diferentes meios de cultivo e pH no desenvolvimento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*.

Acadêmica: Nislene Molina Guerreiro e Paula

Humaitá-AM
Novembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE EDUCAÇÃO, AGRICULTURA E AMBIENTE
CURSO DE AGRONOMIA

**Correlação do crescimento micelial e produção de
conídios em diferentes meios de cultivo e pH no
desenvolvimento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*.**

Acadêmica: Nislene Molina Guerreiro e Paula
Orientadora: Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento

“Trabalho apresentado ao Curso de
Bacharelado em AGRONOMIA da
Universidade Federal do Amazonas,
Instituto de Educação, Agricultura e
Ambiente como requisito parcial para a
obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo. ”

Humaitá-AM
Novembro de 2012

EPIÍGRAFE

Busquei ao SENHOR e ELE me acolheu e me livrou de todos os meus temores
(Bíblia Sagrada. Livro de Salmos, cap.34 vers. 4).

Perto está o SENHOR dos que têm o coração quebrantado e salva os de
espírito oprimido (Bíblia Sagrada. Livro de Salmos, cap.34 vers. 18).

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao
seu tamanho original.” (Albert Einstein)

A Deus, autor da vida que permitiu meu caminhar nessa jornada em busca do conhecimento, por ter me fornecido coragem, luta, sabedoria, inteligência e persistência nessa caminhada, tornando possível a realização de um sonho. A ELE toda honra e glória.

Aos meus filhos Isabella e Ivo Neto razões do meu esforço por melhores condições de vida.

Ao meu esposo Rogério pela força, incentivo, compreensão, colaboração, paciência nos momentos difíceis. És especial e muito importante em minha vida.

Aos meus pais Nicolau Guerreiro e Leide Molina que me colocaram nesse mundo. Obrigada por tudo Pai e Mãe.

A minha avó Adélia Molina e minha tia Adélia Maria (*in memoriam*) que me criaram e educaram (Saudades).

Aos meus irmãos, tios e primos que muitas das vezes não dei a atenção e carinho que mereciam. Obrigada pela força e incentivo.

À toda minha família que torceu durante todo o curso para meu sucesso.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus!

Agradeço a aquele, que me permitiu tudo isso, ao longo de toda a minha vida, e, não somente nestes anos, é a Ele que dirijo minha maior gratidão. Deus, mais do que me criar, deu propósito à minha vida. Vem dele tudo o que sou o que tenho e o que espero. Tu és o maior mestre, que uma pessoa pode conhecer e reconhecer. Obrigada!

À Universidade Federal do Amazonas por me proporcionar a oportunidade da realização deste curso.

À Professora Dra. Ana Verônica Silva do Nascimento pela orientação, conhecimentos e ensinamentos transmitidos durante a graduação, pela oportunidade fornecida e confiança que foram fundamentais no cumprimento desta jornada.

À Professora Mcs. Francimara Souza da Costa, pelos incentivos, força, profissionalismo, e exemplo de excelência profissional.

A FAPEAM pelo auxílio financeiro através das bolsas de iniciação científica.

Ao Professor José Maria do laboratório de química, a quem sou muito grata pela sua ajuda nas medições do pH.

A todos os professores do colegiado de agronomia em especial, ao Profº Valdemir Araújo Câmara (*in memoriam*), Edgard Siza Tribuzy, Cristina Aledi Felsemburg, Milton Cesar Costa Campos, Carlos Eduardo Pereira, Rosane Rodrigues da Costa Pereira, Anderson Cristian Bergamin, Luciano Augusto Rohleder, André Moreira Bordinhon, Heron Salazar Costa, e, e aos demais professores do IEAA pelos ensinamentos e conselhos. Serei eternamente grata.

Aos amigos que me auxiliaram na realização deste trabalho: Júlio César Meinhardt, Marjore Jamile Silva, Carla Rafaela Xavier da Costa, Thiago Souza Oliveira, onde passamos várias noites no laboratório montando experimentos, obrigada pela amizade, companheirismo, apoio, dificuldades e tantas risadas que demos juntos sem a qual não teria graça sem vocês. Além de me ajudarem no trabalho eu agradeço ao Thiago Souza e Carla Costa pelo companheirismo e cumplicidade incondicional, obrigada por fazerem parte da minha historia.

Aos meus amigos de curso: Ediana, Márcia, Luís Antônio, Ivanildo, Jordana, Rayele, Luziana, Gisely, Aline, Leidiane, Giovana, Vanessa, Rody, Claudineia, Elenilson, Joselia, Andreson, Ewerton, Nilson, Pedrinho, Fayle, Rui foram tantas noites estudando e amanhecendo juntos, expectativas pelas provas e trabalhos. Sou muito grata por me darem o privilegio de fazerem parte de minha vida. Valeu!

A todos que auxiliaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ágar-água

BDA – Batata-detrose-ágar

FARINHA AVEIA-ÁGAR- (FAA)

FBA- Folha da banana e ágar

EC – Escuro contínuo

LC – Luz contínua

FT – Fotoperíodo de 12h

ADE – Água destilada esterilizada

mm – Milímetro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1A: Sintomas iniciais da doença sigatoka negra. B: Grau de sintomatologia mais avançado.	17
FIGURA 2: Ciclo de vida de <i>M. fijiensis</i> . Fonte: Drawing courtesy Vickie Brewster.	19
FIGURA 3 A: Folha da bananeira. B: Fragmentos da folha. C: Crescimento fúngico. D: Cultura pura para estudos subsequentes.....	21
FIGURA 4 A: Inoculação dos isolados de <i>M. fijiensis</i> em folhas de bananeiras saudas. C: Câmara úmida em condições de laboratório, por 15 dias consecutivos.....	23
FIGURA 5 A: Inoculação dos isolados de <i>M. fijiensis</i> em frutos saudas. B: Frutos inoculados. C: Câmara úmida em condições de laboratório, durante cinco dias.	23
FIGURA 6: Três cultivares de bananas inoculadas, 'Prata', 'Maçã' e 'Terra'....	27
FIGURA 7A: Sintomas característicos da doença sigatoka negra em folha sadia inoculada em laboratórios. B: Folhas de bananeira inoculada apenas com o meio BDA (testemunha).	27
FIGURA 8 Respectivos meios AA, FBA, BDA, e pHs 4,5; 5,5 e 6,5.....	29
FIGURA 9: Correlação de meios de cultura e pH sobre crescimento micelial em mm, de isolados de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> , aos sete dias de incubação.	29
FIGURA 10: Correlação da produção de conídios (10^3 conídios. ml ⁻¹) de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> em diferentes meios de cultura, em três níveis de pH (4,5; 5,5 e 6,5).	31

RESUMO

Correlação do crescimento micelial e produção de conídios em diferentes meios de cultivo e pH no desenvolvimento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*.

As características patogênicas e fisiológicas de isolados de *Mycosphaerella fijiensis* coletados em área produtora de banana no município de Humaitá-AM foram estudados objetivando diferenciá-los entre si e verificar suas variações e função do pH de diferentes meios de cultivo. Para caracterização selecionou-se o isolado que apresentou maior agressividade no hospedeiro. Na determinação da patogenicidade, o isolado foi inoculado em folhas de bananeira cultivar do tipo Terra, Maçã e Prata através do método do ferimento. Foram utilizados discos de micélio, retirados de colônias jovens e cultura puras do isolado obtidas de uma folha com sintomas típicos da doença. Para a caracterização fisiológica, estudou-se o comportamento do isolado nas seguintes condições: o isolado foi cultivado em três meios de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), FBA (extrato de 300g de folhas de banana triturada com auxílio de mix, decocto por 2h e filtrada, 20g de ágar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL) e AA (Ágar-Ágar) e três níveis de pH (4,5; 5,5 e 6,5), durante sete dias, à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e em condições de alternância luminosa. O isolado mostrou-se patogênico para os exemplares de banana Maçã e Terra testadas apresentando necrose foliar na forma de estrias. Os meios BDA e FBA induziram maior crescimento micelial, destacando-se o meio BDA, e com maior produção de conídios destacou-se FBA. Em relação aos diferentes níveis de pH, o isolado cresceu melhor em pH 5,5 e 6,5 no meio BDA em relação aos demais. A esporulação foi favorecida em pH 4,5, destacando-se o meio FBA em relação aos demais. As características variaram quanto a esporulação e crescimento micelial, de acordo com o substrato e pH empregados. Os sintomas observados apresentaram características típicas da doença. Observou-se que o isolado mostrou variação quanto a esporulação, crescimento micelial, de acordo com o substrato e pH empregados.

Palavras-chaves: *Musa* spp., sigatoka negra, caracterização patogênica e fisiológica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Geral	12
2.2. Específicos.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Aspectos gerais da cultura da bananeira	13
3.2. A doença Sigatoka Negra	15
3.3. O agente causal <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	18
3.4 Correlação pH e meio com o desenvolvimento de <i>M. fijiensis</i>	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Coletas das amostras	21
4.2. Testes de patogenicidade	22
4.3. Caracterização fisiológica e morfológica.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1 Reação das cultivares de banana quanto à inoculação ao isolado de <i>M. fijiensis</i>	26
5.2 Caracterização fisiológica e morfológica do isolado de <i>M. fijiensis</i>	27
5.3 Esporulação	30
5.4 Correlação pH e meio com o desenvolvimento de <i>M. fijiensis</i>	31
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO

As bananas (*Musa* spp.) pertencentes à família Musaceae, são espécies vegetais tipicamente tropicais, cujo bom desenvolvimento exige calor constante, elevada umidade e boa distribuição de chuvas (MOREIRA, 1987).

Índia, Uganda, China, Filipinas, Equador e Brasil são os maiores produtores, respondendo por cerca de 60% da produção mundial (FAO, 2010). O Brasil é o sexto maior produtor mundial com uma área de aproximadamente 513,10 mil hectares e no ano de 2009 o Brasil produziu 6.783.480 milhões de toneladas (FAO, 2011). A banana é a fruta de maior consumo mundial depois dos cítricos, fazendo-se presente na dieta das diferentes camadas sociais, seja pela sua importância nutritiva, seja em função do seu preço acessível ao público consumidor e, sobretudo, pelo seu sabor. Consumidas pelas mais diversas camadas da população, a banana se faz presente na mesa dos brasileiros com um consumo per capita em torno de 25 kg/ano.

Os dados de produção brasileira de banana por região fisiográfica em 2009, mostra que a região norte teve um percentual de 11,98 (IBGE, 2009). Há uma alta procura por bananas na região, visto que a mesma é uma das principais bases alimentares para a população desta região. Contudo nos últimos anos a baixa produtividade dos bananais tem aumentado, sobretudo após a constatação da sigatoka negra, doença que induz perdas da ordem de até 100% dos bananais, dos tipos Prata, Terra e Maçã, e têm obrigado alguns estados, como o Amazonas, a efetuar importações constantes para atender à demanda crescente pela fruta (EMBRAPA, 2010).

As bananeiras são afetadas, durante todo o seu ciclo vegetativo e produtivo, por um grande número de doenças, que podem ser causadas por nematoides, vírus, bactérias e fungos (CORDEIRO, 2000). A Doença de destaque é a sigatoka negra, uma das mais prejudiciais doenças da bananeira, sendo considerada a mais grave da cultura, é o principal problema fitossanitário da banana. Causa destruição rápida das folhas, afetando o crescimento e a produtividade das plantas, devido ao comprometimento da capacidade fotossintética. As plantas doentes têm a sua produtividade reduzida e a

qualidade da fruta é afetada em razão da maturação precoce causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* (HINZ, 2000).

Os sintomas induzidos pela doença são caracterizados pela presença de estrias necróticas que se expandem apenas radialmente e tomam o formato de manchas de coloração marrom-claro na face adaxial e marrom-escuro na face abaxial. Em estágios mais avançados da doença, as manchas apresentam coloração marrom-escuro a negra. No centro das manchas é possível visualizar a ocorrência de pontuações escuras representadas pela frutificação do patógeno (PEREIRA *et al.*, 1998).

Com relação aos agentes de disseminação dos esporos do fungo, o vento, a chuva e a água de irrigação são considerados os mais importantes a curta distância, dentro das plantações (PLOETZ, 1999). O transporte às longas distâncias, mudas doentes e folhas infectadas, geralmente utilizadas como proteção nos cachos durante o transporte para evitar ferimentos nos frutos, são os meios mais eficientes e rápidos de disseminação do patógeno para áreas livres da doença (MOURICHON *et al.*, 1997; HANADA *et al.*, 2002).

A composição e concentração de nutrientes são fatores importantes no meio de cultivo do micélio, esporulação do fungo e cultura pura. O valor nutricional e a variabilidade fisiológica do isolado, além das condições ambientais, podem influenciar a multiplicação de conídios de fungos fitopatogênicos (CRUZ *et al.*, 2009). Desta forma, é importante determinar os melhores meios de cultivo e condições propícias para que se obtenha uma alta produção de conídios em um curto período de tempo. É de conhecimento que a composição do meio de cultura, a temperatura e luminosidade definem a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação conídios (DHINGRA e SINCLAIR 1995).

São escassos os trabalhos encontrados na literatura sobre esporulação, germinação e crescimento micelial de *M. fijiensis*. Neste sentido, a obtenção de condições ótimas para o crescimento e reprodução de *M. fijiensis* em meios artificiais constitui um pré-requisito importante, facilitando a realização de vários estudos, relacionados com a biologia, genética e bioquímica do fungo, de modo a fornecer informações básicas para o entendimento da relação patógeno-hospedeiro.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Caracterizar morfolologicamente e fisiologicamente *in vitro* isolado de *Mycosphaerella fijiensis*.

2.2. Específicos

- Comprovar a patogenicidade de *Mycosphaerella fijiensis* em folhas e no fruto de bananeira;
- Caracterizar morfolologicamente através do crescimento micelial o isolado de *Mycosphaerella fijiensis*;
- Caracterizar fisiologicamente *in vitro* o isolado coletados;
- Correlacionar os diferentes níveis de pH versus crescimento micelial versus esporulação de conídios.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Aspectos gerais da cultura da bananeira

A bananeira (*Musa* spp.) a qual pertence à família botânica *Musaceae* e é originária do Extremo Oriente. É uma planta tipicamente tropical, exige calor constante, precipitações bem distribuídas e elevada umidade para o seu bom desenvolvimento e produção. A bananeira pode ser propagada sexuadamente e por via assexuada ou vegetativa. A produção de mudas por via sexuada é o processo mais frequentemente usado para serem obtidas novas variedades, ou para o melhoramento genético (MOREIRA, 1987).

A banana é a fruta mais consumida no Mundo e no Brasil, sendo um alimento energético, rico em sais minerais, como sódio, magnésio, fósforo e especialmente por ser rica em potássio, um elemento químico da maior importância para o saudável funcionamento do coração, além de se constituir na principal fonte de carboidratos dos povos que habitam muitas partes das regiões tropicais do Planeta. A bananeira, além da série de produtos que podem ser confeccionados com o fruto, tem as folhas que podem servir para cobrir abrigos provisórios, ou como embalagens improvisadas, ser utilizada como ataduras de emergência, ou ainda, resultar em certo tipo de papel (VALE *et al.*, 2004). É considerada um dos principais alimentos da humanidade, é uma boa fonte de vitamina A, B6, B12 e C, além de ferro e cálcio, podendo ser consumida de inúmeras maneiras, desde natural até em forma de chips, farinha, purê, frita, doces, vitaminadas, compotas, tortas, além de outras. Essas vantagens comparativas e competitivas da banana remetem para a ampla disponibilidade de mercados para a comercialização desse nutricional e funcional produto da bananeira (FILHO, 2008).

A bananicultura é uma das atividades agrícolas mais importantes no Brasil, ocupando segundo lugar em volume e frutas produzidas, situando-se em torno de aproximadamente seis milhões de toneladas, perdendo apenas para a laranja (PEREIRA, 2000). É cultivada em todas as regiões quentes do mundo, produz durante quase todo o ano, é consumida no mundo inteiro e movimenta a economia de diversos países produtores. É bem apreciada no mundo, por

suas características organolépticas (FAO, 2006). E segundo os dados da FAO no ano de 2009 o Brasil produziu 6.783.480 toneladas (FAO, 2011).

A produção brasileira de banana está distribuída nas 27 unidades da Federação, incluindo o Distrito Federal, destacando-se, depois da laranja, como a fruta mais importante em área colhida, quantidade produzida, valor da produção e consumo. Consumidas pelas mais diversas camadas da população, a banana se faz presente na mesa dos brasileiros com um consumo per capita em torno de 25 kg/ano. Porém, a parcela da renda gasta com a aquisição deste produto é de 0,87% do total das despesas com alimentação. Cerca de 98% da produção são consumidos in natura (LIMA *et al* 2007).

Apesar de existir um grande número de variedades de banana no Brasil, considerando a preferência dos consumidores, produtividade, tolerância às doenças, altura de planta e resistência à seca e ao frio. As mais difundidas são cultivares do subgrupo Cavendish, como Nanica, Nanicão e Grande Naine, e cultivares do grupo AAB, como Prata, Prata-Anã e Pacovan, do subgrupo Prata; Terra e D'Angola, do subgrupo Terra; e Maçã e Mysore. Entretanto, todas apresentam pelo menos uma característica indesejável, como altura de planta inadequada ou suscetibilidade a alguma doença (SILVA *et al.*, 1999).

Predominantemente, a banana é cultivada em pequenas propriedades, com uso intensivo da mão de obra familiar, sendo de grande importância social para a fixação do homem no campo e para a geração de emprego rural, especialmente para os produtores de menor acesso a tecnologia, ou seja, a doença traz tanto prejuízos econômicos quanto sociais, pois para os pequenos produtores essa tecnologia de controle químico adotada em muitos países da América Central e do Sul é pouco acessível, tornando-os assim os mais prejudicados pela incidência da doença na cultura (MONTEIRO, 2001).

Em relação aos aspectos agrônômicos, a bananeira apresenta desenvolvimento contínuo até o florescimento. Para tanto, a planta passa por uma fase de crescimento vegetativo e pela fase de diferenciação floral, com a formação do cacho no interior do pseudocaule, cerca de 90 a 100 dias antes da emissão da inflorescência. A partir deste estágio fonológico, cessa-se a emissão de folhas e raízes. Dessa maneira, condições climáticas (luz, temperatura e vento), nutrientes e água, próximas ao ótimo são determinantes

para o seu crescimento e desenvolvimento (ALVES et al., 1997; MOREIRA, 1999; SOTO BALLESTERO, 2008). A bananeira caracteriza-se por ser uma planta herbácea com pseudocaule aéreo que se origina de talos carnosos, rizoma, de onde se desenvolvem numerosos calos que posteriormente dão origem aos filhos. Estes se apresentam em torno do talo ou rizoma em função da filotaxia da planta e inicia o processo de independência da planta-mãe a partir do aparecimento da folha F10, primeira folha com 10cm de largura de limbo, e termina com o aparecimento da folha FM, primeira folha com as dimensões foliares características da cultivar, na fase de diferenciação floral (SOTO BALLESTERO, 2008).

3.2. A doença Sigatoka Negra

Além dos problemas tecnológicos, nos últimos anos, vários fatores de ordem fitossanitária têm afetado diretamente o cultivo da banana no Brasil. Dentre eles se destacam as doenças conhecidas como mal-do-panamá, sigatoka amarela, moko e a sigatoka negra. Esta última, muito importante para o homem por causar danos às plantas e seus produtos, bem como por influenciarem direta ou indiretamente na rentabilidade do empreendimento agrícola. A sigatoka negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* é a doença mais importante da bananicultura mundial (MARIN et al., 2003). É considerada a doença mais destrutiva da bananeira no mundo porque impede a produção de frutos e pode causar perdas totais na produção.

A sigatoka Negra foi descrita pela primeira vez nas Ilhas Fiji, vale de Sigatoka, em 1963, com o nome de estria negra ("black leaf streak"). Atualmente esta disseminada por toda a América Central, algumas regiões da África, da Ásia e, na América do Sul, já foi encontrada na Colômbia, Equador e Venezuela. As regiões atingidas tiveram como consequência imediata o aumento do custo de controle, e passaram a sofrer perdas que variam de 50 a 100% na produção (KIMATI, H. & CORDEIRO, Z.J. M, 1995).

Em 1998 a doença foi registrada oficialmente no Brasil, nos municípios de Tabatinga e Benjamin Constant, no estado da Amazonas. A partir desta data a doença vem se disseminando por vários estados brasileiros, na região

Norte, com exceção do estado do Tocantins, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Região centro Oeste), São Paulo e Minas Gerais (Região Sudeste), e Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Região Sul), são outras localidades por onde a doença se disseminou (MALBURG, 2004).

O dano atribuído à doença é a destruição rápida das folhas, afetando o crescimento e a produtividade das plantas, devido ao comprometimento da capacidade fotossintética. As plantas doentes têm a sua produtividade reduzida e a qualidade da fruta é afetada em razão da maturação precoce (HINZ, 2000). Os principais sintomas da doença, segundo Gasparotto *et al.* (2006), são: descoloração ou pontos despigmentados na face abaxial das folhas, estrias marrom-claras, de 2 a 3 mm de comprimento; expansão radial e longitudinal das estrias que se tornam visíveis nas duas faces da folha; a estria adquire coloração marrom-escura e aspecto de manchas de formato irregular; as manchas adquirem coloração marrom-escura a negra e as manchas coalescem induzindo a morte prematura do limbo.

A germinação dos ascósporos e conídios e desenvolvimento da doença são fortemente influenciados por fatores ambientais, como chuva, temperatura, umidade relativa e vento. Pereira *et al.* (1999) afirmam que o esporo germina, quando depositado sobre folhas suscetíveis (vela, 1, 2 e 3), se um filme de água estiver presente sobre elas. Entretanto, Jacome & Schuh (1992) comprovaram que os ascósporos requerem umidade na superfície da folha para germinar e que a infecção por conídios ocorreu independentemente da presença de água, exigindo-se, apenas, elevada umidade relativa do ar. Nesse caso, os sintomas da doença apareceram mesmo com a redução do tempo de permanência da água na folha de 18 para 9 e 10 horas, embora com atraso de 7 e 14 dias, respectivamente. Esse atraso, segundo os autores, pode estar associado ao maior período de tempo que os conídios levaram para absorver a água necessária para a germinação.

São fatores chaves para a inoculação e rápido desenvolvimento do patógeno, a temperatura, bem como a frequência de chuva (principalmente, a duração da chuva), Mobambo *et al.* (1996) afirmaram que os sintomas das doenças costumam variar de acordo com a estação do ano, seca ou chuva,

sendo que o desenvolvimento da sigatoka-negra é menor na estação de seca do que na de chuvosa.

Em 2011 no município de Humaitá- AM foi realizado um levantamento das propriedades produtoras de banana, onde observou-se plantas com sintomas da doença, sintomas esses que evoluem seguindo umas etapas de desenvolvimento de lesões:

1. Descoloração ou pontos despigmentados na face interior da folha;
2. Pequenas estrias marrons-claras;
3. Expansão radial e longitudinal das estrias, que são visualizadas em ambas faces da folha;
4. A estria adquire coloração marrom- escura e formato de mancha;
5. A mancha apresenta um halo de cor escura proeminente, circundado por um pequeno halo amarelo;
6. A mancha adquire formato próximo à elipse, com o centro deprimido de coloração cinza-palha e com pontuações escuras.

Folhas na forma de pontuações claras ou pequenas áreas descoloridas. Essas pontuações evoluem para estrias, e adquirem uma coloração marrom-claro. Na face adaxial, com o progresso da doença, as estrias ampliam-se radial e longitudinalmente, e apresentar coloração marrom-claro (Figura 1A). Plantas com sintomas em um estagio mais avançado as manchas apresentam coloração marrom-escura a negra centro deprimido e adquirem uma coloração branco-palha (Figura 1B), (PEREIRA *et al.*, 1998).



FIGURA 1A: Sintomas iniciais da doença sigatoka negra. B: Grau de sintomatologia mais avançado. Foto: Nislene Molina. Humaitá, AM. 2011

3.3. O agente causal *Mycosphaerella fijiensis*

O fungo pertence à classe ascomiceto, conhecido como *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (estádio anamórfico *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton. Sinonímia: *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* Mulder & Stover; *Cercospora fijiensis* Morelet; *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton), (KIMATI, H. & CORDEIRO, Z.J.M, 1995). Ambas as fases são importantes no desenvolvimento da doença. A fase ascospórica ou sexuada, que constitui o inóculo primário, permite a sobrevivência do patógeno principalmente quando as condições ambientais são desfavoráveis (períodos frios e de baixa umidade relativa do ar). Por outro lado, a fase conidial ou assexual, que constitui o inóculo secundário, garante a rápida multiplicação do patógeno em menor espaço de tempo e em maior quantidade. Isso resulta em uma maior velocidade de desenvolvimento da doença que, de um modo geral, ocorre nos períodos mais quentes e com umidade relativa mais elevada (PEREIRA *et al.*, 1999).

M. fijiensis, caracteriza-se pela grande velocidade e intensidade de ataque, dificuldade de controle e pelo amplo espectro de cultivares de bananas que infecta. O fungo destrói grandes áreas de tecido foliar fotossintetizante, comprometendo o rendimento da cultura e a qualidade dos frutos. A germinação dos ascósporos e conídios, bem como o desenvolvimento da doença, tem influência pelos fatores ambientais, especialmente temperatura e umidade (FIORAVANÇO *et al* 2005).

A duração do ciclo de vida do fungo (Figura 2) é um grande problema, é influenciado principalmente pelas condições climáticas (umidade relativa do ar-UR, temperatura-T e precipitações-P), o tipo de hospedeiro e manejo da cultura. Em virtude do seu polimorfismo, o patógeno está bem adaptado para explorar uma extensa gama de climas tropicais, estação seca como úmidas agindo de forma complementar ou adicional, onde têm preocupado produtores, pesquisadores e instituições de pesquisa envolvidos com a cultura (MENDES *et al* 2007). Hanada *et al.* (2002), estudando a sobrevivência de conídios de *M. fijiensis* em diferentes materiais, constataram que os esporos sobrevivem por até 60 dias aderidos às folhas de bananeira e nos tecidos das roupas dos

operários; até 30 dias em pedaços de madeira, plásticos e papelão, usados na confecção de caixas para embalagens dos frutos; e na casca dos frutos, até o seu apodrecimento. Vale ressaltar que, na casca de frutos verdes da cultivar Prata Anã, colhidos em um bananal com alta severidade de sigatoka negra, foram encontrados até 11 mil conídios aderidos em cada fruto.

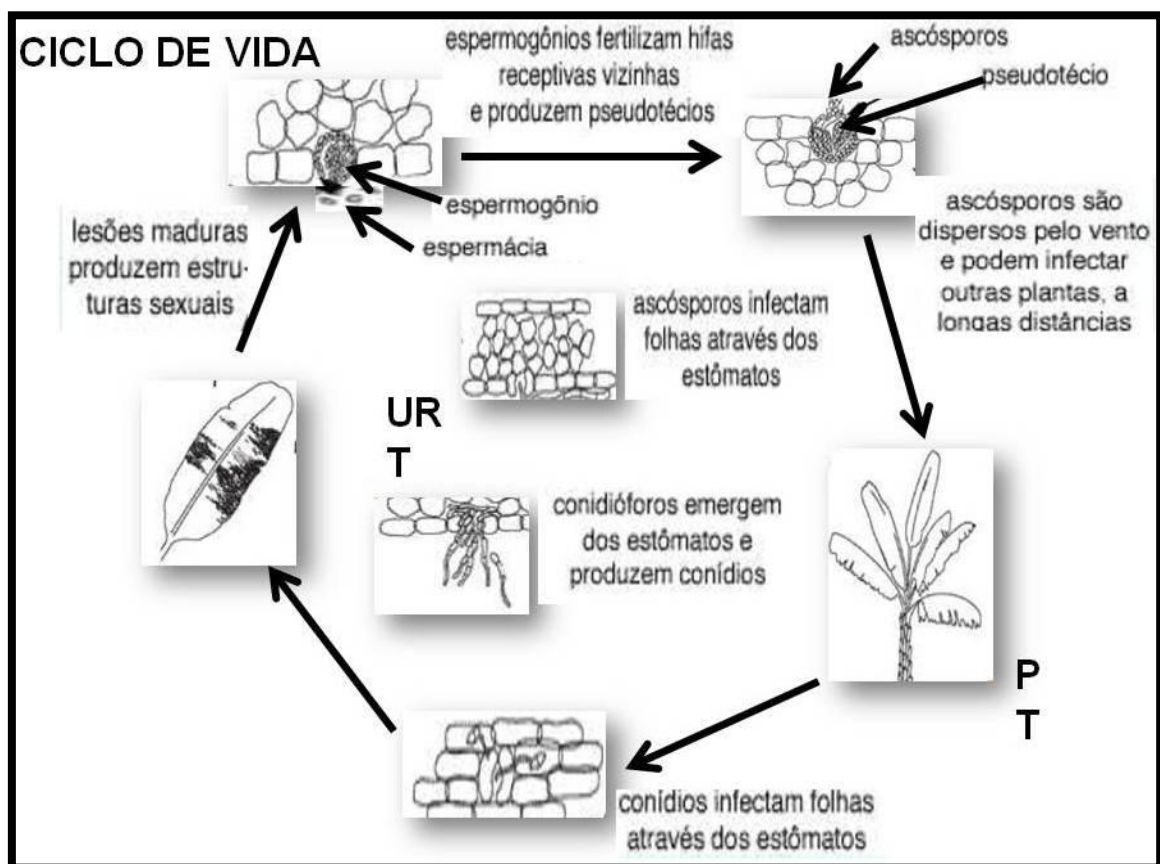


FIGURA 2: Ciclo de vida de *M. fijiensis*. Fonte: Drawing courtesy Vickie Brewster.

3.4 Correlação pH e meio com o desenvolvimento de *M. fijiensis*.

Correlação é quando duas variáveis estão ligadas por uma relação estatística, falamos que existe uma correlação entre elas. Sendo então, a comprovação da existência e do grau de relação entre duas (ou mais) variáveis. Variáveis essas onde podemos avaliar e medir as relações entre elas (COSTA NETO, 1992).

Montarroyos *et al.* (2007) revendo a literatura afirmaram que na composição do meio de cultura, as fontes de carbono e nitrogênio, o pH do

meio e os regimes de luminosidade são os principais fatores para a aquisição de culturas *in vitro* de diversos fungos fitopatogênicos. Isto foi confirmado por Dhingra & Sinclair (1995) quando relataram que a composição do meio de cultura determina a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação dos fitopatógenos.

Veiga & Kimati (1974) referiram em seus estudos que o meio (FAA) foi o melhor para a esporulação de *Cercospora sojina*. Hanada *et al.* (2002a) confirmaram a eficiência do meio (BDA) na esporulação de *M. fijiensis*, mas Veiga & Kimati (1974) defenderam que o meio FAA pode substituir outros meios sem prejuízos e explicaram ainda que, por esse ser um meio importado torna-se de difícil a obtenção em algumas regiões.

Romero & Sutton (1997) conseguiram resultados favoráveis na inoculação de *M. fijiensis* com temperatura de 26°C em 21,1 dias e 22°C em 25,2 dias, enquanto Mello *et al.* (2004) relataram que em meio BDA o período de inoculação de *Cercospora carisis* varia entre 14 e 21 dias com temperatura de 28°C.

Estudos para se obter informações sobre doenças que acometem as diferentes culturas vêm tornado-se extremamente necessários, sendo que o controle de muitas dessas é realizado, especialmente, pelo uso de híbridos resistentes, sendo assim é importante a determinação de condições ótimas para o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coletas das amostras

Os isolados foram obtidos de folhas de bananeira 'Terra', 'Prata' e 'Maçã', exibindo sintomas típicos da doença Sigatoka negra e coletada em áreas produtoras localizadas na comunidade Paraizinho e vicinal Alto Crato, no município de Humaitá-AM (Figura 3A). O isolamento do patógeno foi realizado no Laboratório de Fitossanidade do Instituto de Agricultura e Ambiente (IEAA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) localizado no município de Humaitá/AM. O método utilizado foi o indireto. Pequenos fragmentos, retirados da área de transição da lesão, foram tratados com álcool 70%, durante 30s e desinfestados com uma solução de hipoclorito de sódio, numa concentração de 1,5%, por 1 a 2 min. Em seguida, os fragmentos foram lavados em duas porções consecutivas de água destilada esterilizada, sendo logo depois colocados sobre papel de filtro estéril (Figura 3B) e transferidos para placas de Petri, contendo meio de batata-dextrose-ágar (BDA) (Figura 3C). Após o crescimento do fungo, foi realizada a transferência, em condições assépticas, para placas de Petri contendo BDA, onde se obteve a cultura pura do isolado, estes foram repicados para placas Petri contendo BDA mantidos em B.O.D a 25°C para realização de estudos subsequentes (Figura 3D).

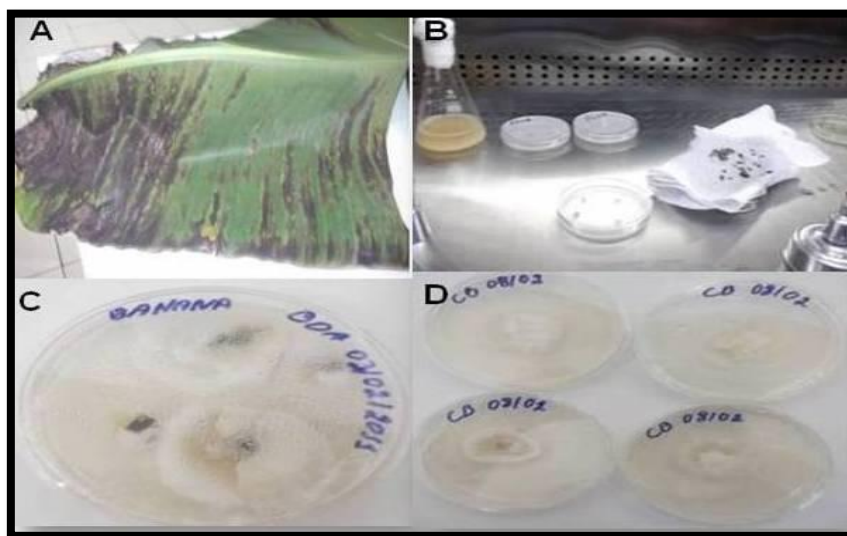


FIGURA 3 A: Folha da bananeira. B: Fragmentos da folha. C: Crescimento fúngico. D: Cultura pura para estudos subsequentes. Foto: Nislene Molina. Humaitá, AM. 2011.

4.2. Testes de patogenicidade

Para a inoculação dos isolados de *M. fijiensis*, foram utilizados segmentos de folhas de bananeiras cortadas em tiras de 6,5 cm de largura onde se procedeu à inoculação do isolado de *M. fijiensis*, através do método com ferimento na folha, discos de BDA, contendo estruturas do patógeno, foram retirados de colônias puras, e depositados sobre a folha de bananeira cultivar Terra, previamente desinfestada e ferida com estilete flambado (Figura 4A). Para as testemunhas foi utilizado o mesmo procedimento, utilizando apenas discos de meio AA sem o inoculo, depositados na superfície foliar ferida. As folhas inoculadas e testemunhas foram mantidas em câmara úmida, em condições de laboratório, por (15) quinze dias consecutivos (Figura 4B). O mesmo procedimento foi realizado com os frutos (Figura 5A). As bandejas foram cobertas com sacos plásticos (Figura 5B), e internamente umedecidos com água destilada esterilizada, sendo mantidos por (5) cinco dias consecutivos em condições de laboratório (Figura 5C). Durante os dias do experimento foram feitas manutenção da umidade na câmara úmida duas vezes ao dia. O material foi reisolado e observado em microscópico para confirmação do patógeno.

A avaliação foi efetuada levando-se em consideração a presença ou ausência de sintomas necróticos nas folhas inoculadas com os isolados de *M. fijiensis*. Foi escolhido para os testes subsequentes o isolado que apresentou maior agressividade ao hospedeiro e crescimento rápido em meio de cultivo.

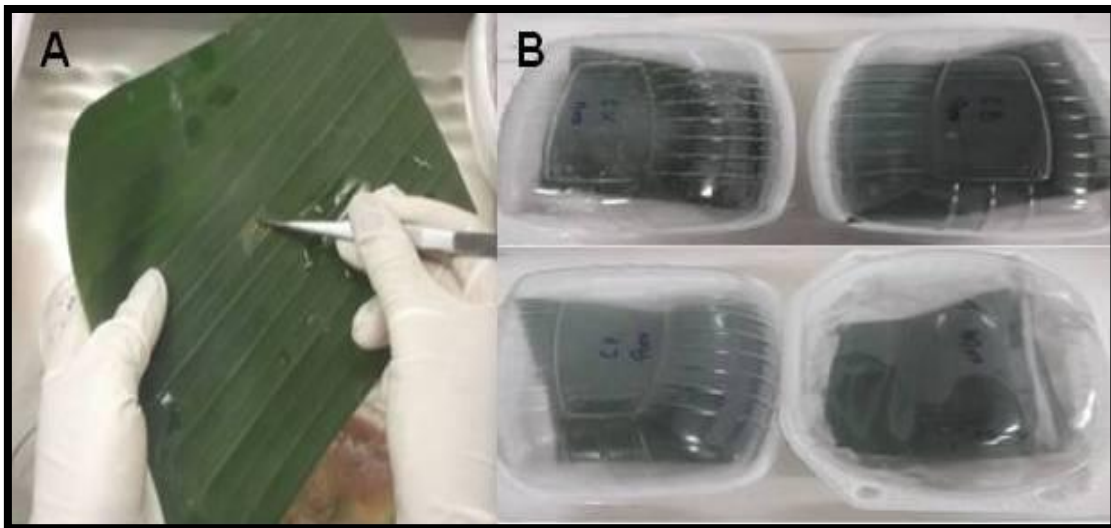


FIGURA 4 A: Inoculação dos isolados de *M. fijiensis* em folhas de bananeiras saudáveis. C: Câmara úmida em condições de laboratório, por 15 dias consecutivos. Foto: Nislene Molina. Humaitá, AM. 2011.



FIGURA 5 A: Inoculação dos isolados de *M. fijiensis* em frutos saudáveis. B: Frutos inoculados. C: Câmara úmida em condições de laboratório, durante 5 dias consecutivos. Foto: Nislene Molina. Humaitá, AM. 2011.

4.3. Caracterização fisiológica e morfológica

Para os estudos fisiológicos, o isolado de *M. fijiensis* foi cultivado em diferentes meios de cultura, em três níveis de pH (4,5; 5,5 e 6,5), em um regime de alternância luminosa (12 h claro/ 12 h escuro), temperatura de 25 °C e umidade relativa de 60%. Foram utilizados os seguintes meios de cultura:

BDA (batata, 200 g; dextrose, 20 g; ágar, 17 g); FBA (extrato de 300 g de folhas de banana triturada com auxílio de mix, decocto por 2 h e filtrada, 20 g de ágar e água destilada, quantidade suficiente para 1.000 mL) e AA (Ágar-ágar). Após o preparo, todos os meios foram autoclavados por 20 minutos a 120°C, 1 atm.

Após a obtenção de cultura pura do isolado, foram removidos discos de micélio (4 mm de diâmetro) contendo estruturas de *M. fijiensis* e transferidos, individualmente, para o centro de placas de Petri, contendo os diferentes meios, sendo o pH ajustado para 4,5, 5,5 e 6,5 pela adição de base e ácidos.

A avaliação do crescimento micelial consistiu de medidas do diâmetro das colônias, em dois sentidos diametralmente opostos, a cada 24h. As medições foram executadas com auxílio de uma régua milimetrada definindo uma média de cinco leituras. As leituras foram concluídas quando o crescimento da colônia cobriu completamente o diâmetro da placa em um dos tratamentos no quinto dia de avaliação. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico SISVAR v. 4.0 (FERREIRA, 2000).

A caracterização fisiológica foi efetuada utilizando-se as culturas de *M. fijiensis* que produziram conídios, sendo a avaliação feita com base na contagem dos mesmos pelo método da gota (MENEZES, *et al* 1997). Após a avaliação do crescimento do fungo, procedeu-se a quantificação da esporulação a partir do preparo da suspensão de conídios. Esta consistiu na remoção e transferência da colônia das placas contendo 3 mL de água destilada esterilizada para um becker, onde foram removidos os esporos com uma escova de cerdas macias, em seguida o material foi filtrado através de duas camadas de gaze estéril, onde obteve uma suspensão e contou-se três gotas por placas, sendo quantificada a esporulação de conídios por meio de três leituras em lâmina.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições para cada tratamento. Em arranjo fatorial 3 x 3, representado pelos diferentes meios e níveis de pH, perfazendo um total de 9 tratamentos. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri de 90 mm de diâmetro.

Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizou-se o programa estatístico SISVAR v. 4.0 (FERREIRA, 2000).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Reação das cultivares de banana quanto à inoculação ao isolado de *M. fijiensis*.

Os três isolados identificados e inoculados através do método de deposição com ferimento nas folhas de bananeira sadias foram patogênicos, não ocorrendo sintomas nas folhas testemunhas. Dentre os três isolados inoculados, apenas um isolado mostrou-se mais agressivo, apresentando um grau de sintomatologia avançado nas três cultivares de banana inoculadas (Figura 6). Após o período de 15 dias à inoculação, os tecidos foliares exibiram os sintomas típicos da doença sigatoka negra (Figura 7). A colonização do patógeno estendeu-se além do ponto de inoculação, em sentido paralelo às nervuras secundárias. Os sintomas exibidos nas cultivares Terra, Prata e Maçã foram semelhantes aos obtidos por PEREIRA *et al.*, (1998) e (CORDEIRO *et al.*, 2003). Os postulados de Koch foram seguidos, e os sintomas observados foram semelhantes aos descritos na literatura com descoloração ou pontos despigmentados; estrias marrom-claras, expansão radial e longitudinal das estrias que se tornam visíveis nas duas faces da folha; a estria adquire coloração marrom-escura e aspecto de manchas de formato irregular; as manchas adquirem coloração marrom-escura a negra e as manchas coalescem induzindo a morte prematura do limbo (GASPAROTTO *et al.*, 2006). Após os procedimentos descritos acima, as folhas de bananeira inoculadas apresentaram sintomas característicos da doença sigatoka negra, realizou-se o reisolamento do fungo *M. fijiensis* confirmando assim o postulado de Koch. Os resultados obtidos pela realização dos postulados de Koch confirmam a espécie e a patogenicidade de *M. fijiensis*.



FIGURA 6: Três cultivares de bananas inoculadas. A: Prata. B: Maçã e C: Terra. Foto: Nislene Molina. Humaitá, AM. 2011.

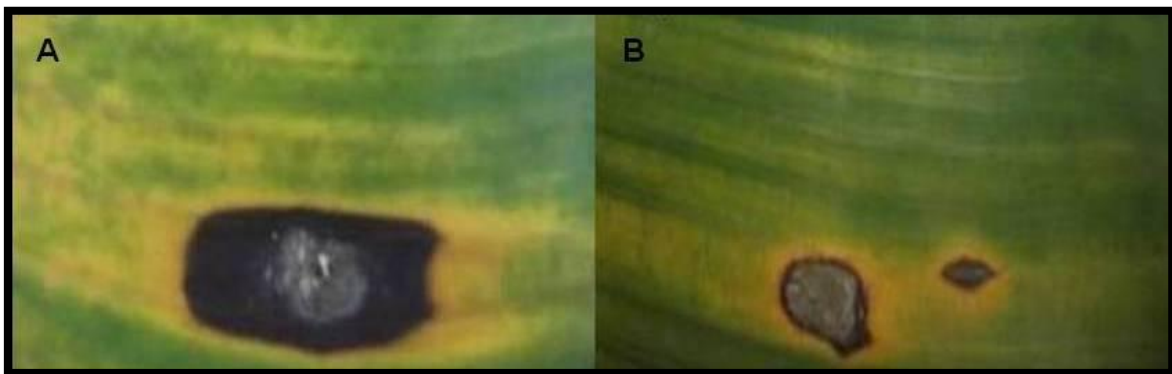


FIGURA 7A: Sintomas característicos da doença sigatoka negra em folha sadia inoculada em laboratórios. B: Folhas de bananeira inoculada apenas com o meio BDA (testemunha). Foto: Nislene Molina. Humaitá, AM. 2011.

5.2 Caracterização fisiológica e morfológica do isolado de *M. fijiensis*

Considerando-se o efeito dos fatores independentes (alternância de luz, temperatura, meio de cultura e pH), observou-se que a média do crescimento micelial no meio BDA e FBA foi significativamente superior àquelas obtidas para o meio AA. Por outro lado, no meio AA, o isolado apresentou um crescimento muito lento. Quanto ao fator meio de cultura, de um modo geral, BDA, seguido de FBA, induziram maior média de crescimento micelial de *M. fijiensis*, não diferindo entre si, enquanto que no meio AA não houve crescimento significativo, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Isto também foi confirmado por Dhingra e Sinclair (1995) quando relataram que a composição do meio de cultura, temperatura e luminosidade determina a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação dos microrganismos fitopatogênicos. Uma das características do gênero *Cercospora* é o crescimento lento e a insuficiência de esporulação em meios artificiais (BRUNELLI *et al.*, 2006). Esses autores verificaram que agentes físicos são capazes de induzir ou inibir os desenvolvimentos vegetativos e reprodutivos da maioria dos fungos, sendo os mais importantes a temperatura e a luminosidade.

Embora na maioria dos casos, as diferenças não tenham sido significativas, observou-se maior crescimento micelial, quando o isolado foi cultivado em substratos com pH 5,5 e 6,5. Na interação dos quatro fatores, alternância de luz, temperatura, meios e pH, os dados obtidos mostraram uma variação de comportamento de acordo com o substrato e nível de pH utilizados. Montarroyos *et al.* (2007) revendo a literatura afirmaram que na composição do meio de cultura, as fontes de carbono e nitrogênio, o pH do meio e os regimes de luminosidade são os principais fatores para a obtenção de culturas *in vitro* de diversos fungos fitopatogênicos. Em nossos estudos, as combinações que mais favoreceram o crescimento micelial do isolado de *M. fijiensis*, foram assim especificadas: a) BDA, melhor crescimento nos três níveis de pH, sendo o pH 6,5 possivelmente o mais favorável; b) FBA, apresentou maior crescimento nos três níveis de pH, principalmente, 5,5; c) AA mostrou crescimento mínimo nos níveis de pH, sendo 6,5 o mais favorável (Figura 8). Os resultados mostraram uma diferenciação no processo de crescimento, em função do efeito das condições de cultivo (Figura 9).

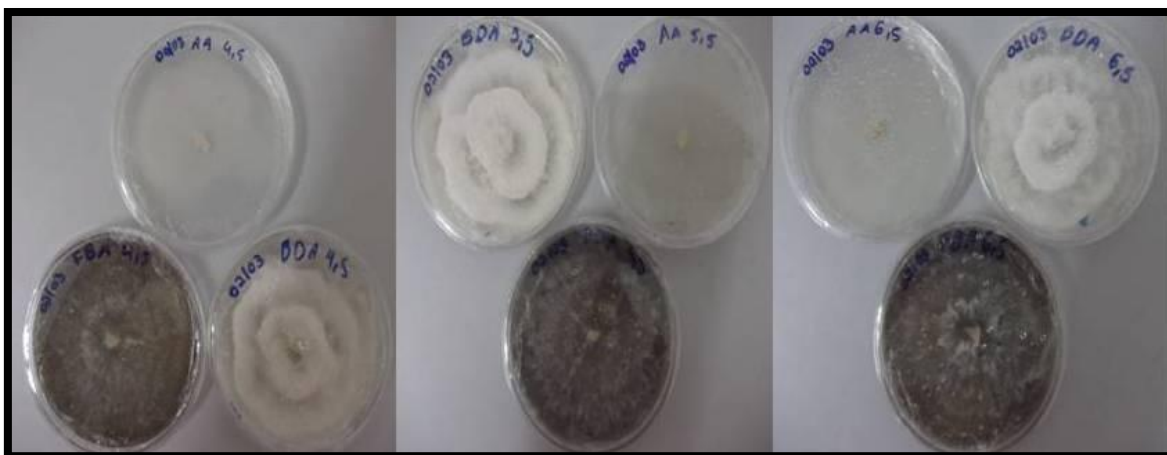


FIGURA 8 Respectivos meios AA, FBA, BDA, e pHs 4,5; 5,5 e 6,5. Foto: Nislene Molina. Humaitá, AM. 2011.

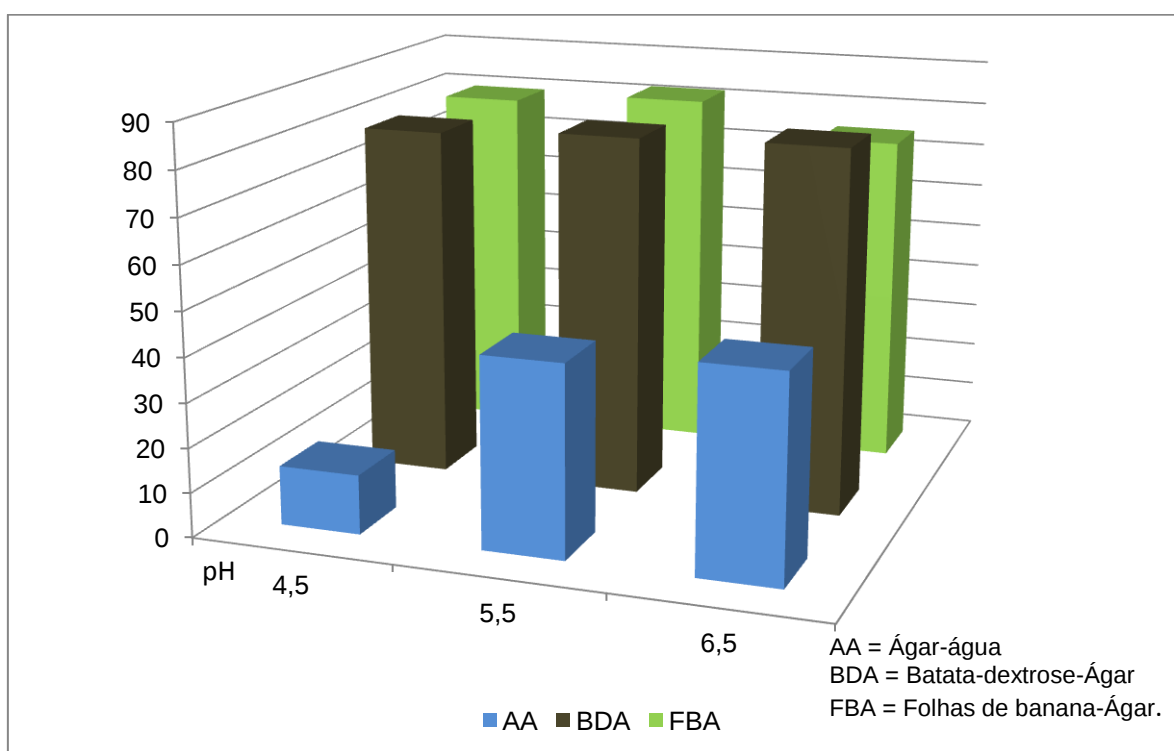


FIGURA 9: Correlação de meios de cultura e pH sobre crescimento micelial em mm, de isolados de *Mycosphaerella fijiensis*, aos sete dias de incubação.

5.3 Esporulação

Do isolado estudado *M. fijiensis*, observou-se que a média da esporulação de FBA foi significativamente superior àquelas obtidas para nos demais meios. Por outro lado BDA e AA apresentaram uma menor produção de conídios, não diferindo estatisticamente entre si (Figura 10). A esporulação nos diferentes meios de cultura estudados revelou que os meios BDA e FBA proporcionaram maior condição de esporulação de *M. fijiensis*, nesse processo fisiológico. Foi constatada a produção mínima de esporos no meio AA, nos três níveis de pH estudados. Com relação à influência dos níveis pH na esporulação, observou-se que no pH 4,5 ocorreu maior produção com $41,814 \times 10^3$ conídios, diferindo estatisticamente daquela obtida nos demais pH, sendo o FBA o meio que mais induziu a esporulação *M. fijiensis*.

Os resultados da esporulação mostraram uma diferenciação de comportamento entre os meios e pH empregados, de conformidade com as condições nutricionais a que foram submetidos. Assim, a maior produção de conídios foi constatada quando cultivado no meio de FBA, em pH 4,5, seguido pelos pH 6,5 e 5,5 do mesmo meio. Geralmente, a produção de conídios ocorre quando há uma exaustão do meio, resultante da utilização dos nutrientes pelo fungo, durante a fase de crescimento vegetativo. Associadas a este processo, alterações na composição do meio podem ocorrer devido a metabólitos secundários liberados pelo fungo. A junção de material vegetal no meio de cultura é uma técnica usada para estimular a produção de esporos para alguns fungos (NOZAKI *et al.*, 2004). Segundo Nozaki *et al.*, (2004), nem sempre as condições que favorecem o crescimento do fungo são as mesmas para esporulação. Tuite (1969) e Satyanarayana Sadasiva Reddy (1986) recomendam que meios preparados a partir de partes de plantas suscetíveis podem aumentar as chances de esporulação. No presente trabalho mostrou que o substrato preparado a partir da inclusão do decocto da folha de bananeira estimulou a esporulação de *M. fijiensis*.

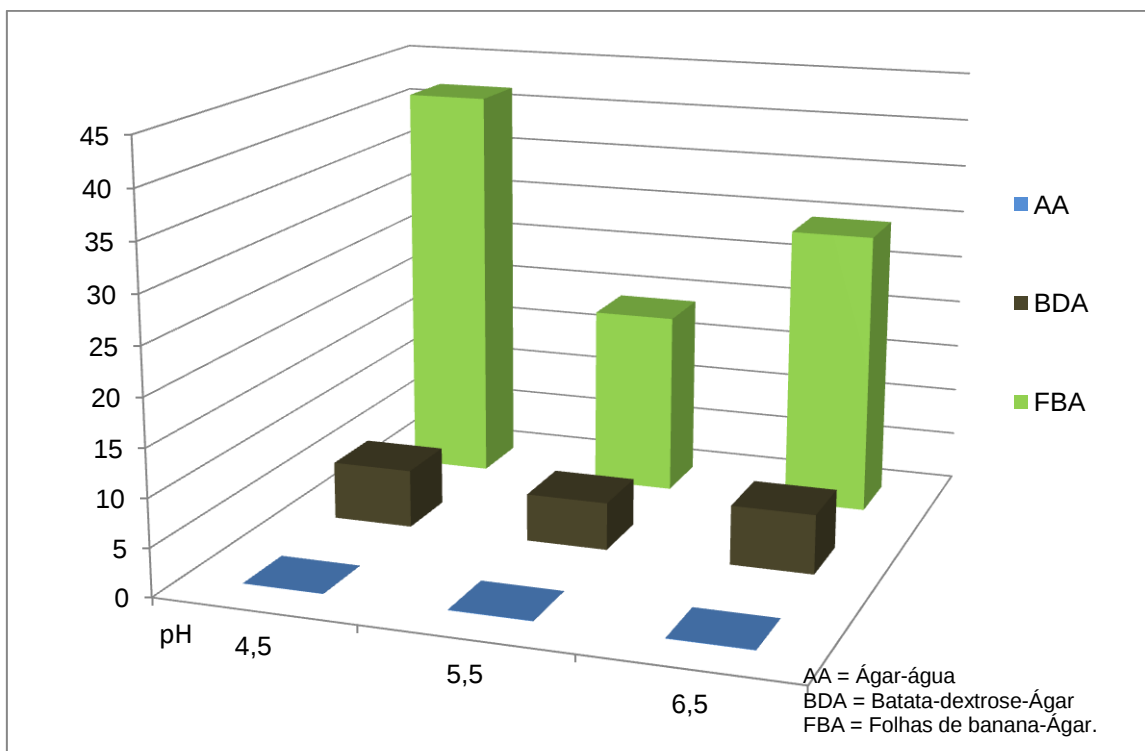


FIGURA 10: Correlação da produção de conídios (10^3 conídios. ml^{-1}) de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura, em três níveis de pH (4,5; 5,5 e 6,5).

5.4 Correlação pH e meio com o desenvolvimento de *M. fijiensis*.

No crescimento micelial foi possível observar uma correlação nos pHs 4,5; 5,5 e 6,5, entretanto para a esporulação não foi possível essa correlação devido a baixa variação dos pHs. Então, precisa ser estudado uma maior variação de pHs para se ter uma correlação.

Estudos dessa natureza servem de base para futuras pesquisas que apontem à necessidade da produção de conídios em grandes quantidades para trabalhos de inoculação de plantas tendo como objetivo identificar de fontes de resistência ao patógeno.

Então, é fundamental que se tenha informações sobre o crescimento micelial e/ou esporulação desses patógenos proporcionando a identificação de genótipos resistentes. Pesquisas *in vitro* visando à obtenção de colônias são importantes, pois assim se obtém as características sobre virulência e severidade da doença. Podendo-se determinar condições ótimas para o crescimento micelial e produção de esporos desses fungos fitopatogênicos.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados mostraram que as condições mais promissoras para crescimento e produção de conídios de *M. fijiensis* envolveram o meio de FBA seguido de BDA;
- No crescimento micelial a melhor condição para o desenvolvimento *M. fijiensis* foram nos meios BDA seguido de FBA nos respectivos pHs 4,5; 5,5 e 6,5;
- Na esporulação a melhor condição para a produção de conídios ocorreu quando o fungo foi cultivado em meio FBA com pH ajustado a 4,5. Para se obter alguma correlação, precisa ser estudado uma maior variação dos níveis de pHs, para assim se ter uma correlação mais precisa.

7. REFERÊNCIAS

ALVES, E.J.(Org). A cultura da banana: exigências climáticas: **A cultura da banana**: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais. Brasília: Embrapa-SPI, 1997.585p.

BRUNELLI, K. R.; FAZZA, A. C.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAMARGO, L. E. A. Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zea-maydis*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n.1, p. 92-94, 2006.

COSTA NETO, P. L. O. **Estatística**. 12. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 1992.

CORDEIRO, Z.J.M.; BORGES, A.L.; FANCELLI, M. *et al.* **Cultivo da banana para o estado do Amazonas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2003. Sistema de Produção, 6 (versão eletrônica). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 19 de março. 2011.

CORDEIRO, Z. J. M. (org.) **Banana**. Fitossanidade. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura/Brasília: Embrapa para transferência de Tecnologia, 2000. 121p. (Frutas do Brasil, 8).

CRUZ, M. F. A.; PRESTES, A. M.; MACIEL, J. L. N. Esporulação de *Pyricularia grisea* em diferentes meios de cultura e regimes de luz. **Ciência Rural**, v.39, p.1562-1564, 2009.

DINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434p.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária. Disponível. <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2010/setembro/4asemana/livro-faz-panorama-da-cultura-da-bananeira-na-regiao-norte-do-brasil>. Acesso em: 12 janeiro 2011.

FAO, 2006. **Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação** (Roma Itália) STATISTICS DIVISION. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Consultado em 12/05/2012.

FAO. **Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação**. Faostat. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>>. Consultado em 12/05/2012.

FAO, 2011. **Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Atualizado em 17/05/2011. Consultado em 12/05/2012

FERREIRA, D. F. Análises Estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. In: 45. 2000 São Carlos. **Anais da reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria**. São Carlos: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

FILHO, A.F. **Banana (parte I)** Disponível: <http://www.acesa.com/saud/arquivo/serholistico/2008/04/01-artigo/>. Acesso em 25/01/2011. 2008

FIORAVANÇO, João C.; PAIVA, Marília C. Sigatoka-negra da Bananeira **Revista brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n. 2, p. 135-141, abr-jun, 2005.

GASPAROTTO, L., PEREIRA, J.C.R., HANADA, R.E. & MONTARRYOS, A.V.V. **Sigatoka-negra da banana**. 1º. Ed. Embrapa. Manaus. 2006.

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

HINZ, R. H. Moko e Sigatoka Negra. In: **Curso sobre doenças da bananeira**. Jataí - GO: DFA/GO, 2000. 9p.

IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2009. Consultado em 12/05/2012.

JACOME, L.H.; SCHUH, W. Effects of leaf wetness and temperature on development of black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.82, n.5, p.515-520. 1992.

KIMATI, H. & CORDEIRO, Z.J.M. Doenças da bananeira. In: Bergamin Filho, A., AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**, 3a ed., Agronômica Ceres, São Paulo, 1995. pp. 267-293.

LIMA, M. B.; VILARINHOS, A. D. **Importância econômica e social da banana**. EMBRAPA, 2007. Disponível: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia40/AG01/arvore/AG01_28_4102006805.html. Acesso em 25/01/2011.

MALBURG, J. L., **Avanço Fatal**. Revista Cultivar Hortalças e Frutas, Pelotas-RS, Nº 28, Outubro/Novembro. 2004, pg 20.

MARIN, D. H. et al. Black sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. **Plant Disease**, v.87, p.208-222, 2003.

MATSUURA, F. C. A. U; COSTA, J. I. P. da; FOLEGATTI, M. I. da S. Marketing de banana: preferências do consumidor quanto aos atributos de qualidade dos frutos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 26, n. 1, abr. 2004.

MELLO, S.C.M., ÁVILA, Z.R. & BORGES NETO, C.R. Desenvolvimento de metodologia para cultivo do fungo *Cercospora caricis*, agente de biocontrole de *Cyperus rotundus*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)** 1ª. Ed. Brasília, 2004.

MENDES, L. B., BEDIN, C., LOPES, R. L. B., BOSQUÊ, G. G. **Ocorrência da Sigatoka negra em banana**. Revista Científica Eletrônica de Agronomia – ISSN: 1677-0293. Ano VII – Número 12 – 2007 – Periódicos Semestrais.

MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D.M.W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, 1997. 106p.

MOBAMBO, K.N., PASBERG, C., GAUHL, F. & ZUOFA, K. Host response to black sigatoka in Musa germplasm of different ages under natural inoculation conditions. **Elsevier** 16:359-363. 1996.

MONTARROYOS AVV, COELHO RSB, FERRAZ GMG, SANTOS R, SANTOS VF, ANDRADE PP (2007) Efeito de meio de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento de *Mycosphaerella musicola*. **Summa Phytopathol** 33: 86-89.

MONTEIRO. L. O fantasma negro. **Safrá**, Goiânia, v.2, n.20, p.9-10, 2001.

MOREIRA, R.S. **Banana**: teoria e prática de cultivo. Campinas: Fundação Cargill, 1987.335 p.

MOREIRA, R.S. **Banana**: teoria e prática de cultivo. 2. ed. São Paulo: Fundação Cargill, 1999. 1 CD-ROM.

MOURICHON, X.; CARLIER, J.; FOURÉ, E. **Sigatoka leaf spot diseases**. Montpellier: INIBAP. 1997. Musa Disease Fact Sheet, 8. Disponível em: <http://www.cgiar.org/opgri/inibap>. Acesso em: 19 março. 2011.

NOZAKI, M. DE H.; CAMARGO, M. E BARRETO, M. Caracterização de *Diaporthe citri* em diferentes meios de cultura, condições de temperatura e luminosidade. **Fitopatologia Brasileira**, v.29 p. 429-432, 2004.

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

PEREIRA, J.C.R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A.F.S. Ocorrência de Sigatoka negra no estado do Amazonas. **Informativo SBF**, Brasília, v.17, n.2, p.11-13. 1998.

PEREIRA, J. C. de R.; GASPAROTTO, L. **Ataque às folhas**. Revista Cultivar HF. Pelotas- RS, Nº 03, Agosto/Setembro, pg 34 e 35, 2000.

PLOETZ, R. **La más importante enfermedad de la fruta más importante; la Sigatoka negra del banano.** 1999. Disponível em: <http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/aps/bananos/sigatokanegra.html>. Acesso em: 12 /05/ 2012.

ROMERO, R.A. & SUTTON, T.B. Reaction of four *Musa* genotypes at three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. **Plant Disease** 81:1139-1142. 1997.

SATYANARAYANA, K. & SADASIVA REDDY, C. A new and cheap medium supporting the sporulation of *Pyricularia oryzae*. Cav. **Indian Journal Mycological Plant Pathology** 16:329. 1986.

SILVA, S. de O.; SHEPHERD, K.; ALVES, E. J; DANTAS, J. L. L. Cultivares de banana. In: ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1999. p.85-105.

SOTO BALLESTERO, M. **Banamos: cultivo e comercialización.** 3. ed. San José: Litografia e Imprensa LIL, 1992. 674p.

TUITE, J. Plant Pathological Methods, Fungi and Bacteria. Burgess Publishing Company, Minneapolis. 1969.

Vale, F.X.R.; Jesus Junior, W.C.; Zambolim, L. **Epidemiologia Aplicada ao Manejo de Doenças de Plantas.** Belo Horizonte: Perfil Editora, 2004. 531p.

VEIGA, P. & KIMATI, H. Influência de meios de cultura e regime luminoso na esporulação de *Cercospora sojina* Hara. **Revista Centro Ciências Rurais** 4:159-164. 1974.