

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

Luadir Gasparotto - Embrapa Amazônia Ocidental

Rogério Ejii Hanada - INPA

José Clério Rezende Pereira - Embrapa Amazônia Ocidental

INTRODUÇÃO

A Sigatoka negra é causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Moleret, cujo estágio anamórfico é o fungo *Paracercospora fijiensis* (Moleret) Deighton. É considerada a doença mais destrutiva da bananeira, cujas perdas podem atingir cem por cento da produção para as bananas verdadeiras e setenta por cento para os plátanos.

Essa doença foi registrada no Brasil, em 1998, nos municípios de Tabatinga e Benjamin Constant no estado do Amazonas. Atualmente, o patógeno encontra-se disseminado por todo o Estado, exceto nos municípios de Parintins e Nhamundá, situados no Baixo Amazonas. Também já se encontra nos estados de Roraima, Amapá, Rondônia, Acre, Pará e Mato Grosso. Nos demais Estados produtores de banana do País, há uma preocupação generalizada quanto a sua introdução. Diante desse fato, as autoridades de vários Estados estão emitindo ou já emitiram portarias, impedindo a entrada de mudas e frutas de bananeira oriundas dos Estados atingidos pela doença.

Os esporos do fungo são disseminados principalmente pelo vento, porém as mudas de bananeiras doentes e as folhas infectadas com a Sigatoka negra colocadas entre os cachos, para evitar o ferimento dos frutos durante o transporte, também se constituem em um meio eficiente e rápido para a disseminação do patógeno a longas distâncias. Além desses, os esporos aderidos nas embalagens, principalmente caixas, nos próprios frutos, nas roupas dos operários e nos veículos, dependendo do seu período de sobrevivência, podem ser transportados para áreas livres da doença.

Uma das formas de retardar a disseminação do patógeno é impedir o transporte de mudas contaminadas e o uso das folhas para proteger os frutos de ferimentos durante o transporte e, ao mesmo tempo, utilizar produtos químicos para desinfestação das embalagens e dos veículos, nas áreas contaminadas, antes de saírem em direção às áreas livres da doença.

OBJETIVOS

- Avaliar a sobrevivência de conídios de *M. fijiensis* aderidos a diferentes materiais;
- Avaliar o período da viabilidade dos esporos de *M. fijiensis* em folhas doentes;
- Selecionar produtos eficientes na erradicação dos conídios de *M. fijiensis* aderidos em diferentes materiais.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Isolamento e esporulação do patógeno

O isolamento do patógeno foi feito pelo método direto, ou seja, transferindo-se conídios presentes nas lesões de folhas doentes, com o auxílio de estilete de ponta fina, para placas de Petri, contendo meio de BDA. Em seguida, as placas de Petri foram mantidas em incubadoras a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até a formação de colônias.

Para induzir a esporulação, testou-se o fungo em sete meios de cultura sob quatro regimes de luz. Os meios de cultura foram: FBA, BCA, V8 ágar, V8-CaCO₃ ágar, BDA, ACA e Micophil.

- FBA - Folha de bananeira ágar

Composição: 300g de folha de bananeira triturada, 20g de dextrose, 20g de ágar e completou-se com água destilada para 1000 ml de meio.

- BCA - Batata-cenoura ágar

Composição: 20g de batata, 20g de cenoura, 20g de ágar e completou-se com água destilada para 1000 ml de meio.

- V8 ágar

Composição: 100ml de V8, 20g de ágar e 900ml de água destilada.

- V8-CaCO₃ ágar

Composição: 100ml de V8, 2g de CaCO₃, 20g de ágar e 900ml de água destilada.

- BDA - Batata-dextrose ágar
Composição: 200g de batata, 20g de dextrose, 20g de ágar e completou-se com água destilada para 1000ml de meio.
- ACA - Água de coco ágar
Composição: 1000ml de água de coco e 20g de ágar.
- Micophil
Composição: 10g de farinha de soja, 10g de dextrose, 20g de ágar e completou-se com água destilada para 1000ml de meio.

Os regimes de luz testados foram: escuro contínuo, fotoperíodo de 12h, seqüencial (dez primeiros dias no escuro e cinco dias subseqüentes sob luz contínua) e luz contínua. Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizados, esquema fatorial 4 x 7 com cinco repetições, considerando-se cada erlenmeyer de 125ml uma repetição.

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

Idade da cultura para obtenção de maior quantidade de conídios viáveis

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

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

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

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

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

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

Os materiais contendo os conídios foram distribuídos em sala com condicionador de ar, em salas com temperatura ambiente e em um galpão em condições de campo. Em cada ambiente, foram colocadas quatro repetições.

A avaliação da capacidade germinativa dos conídios foi realizada aos 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 18, 23, 30 e 60 dias, após a sua deposição em cada material. Para tanto, transferiram-se os esporos para placas de Petri contendo ágar-água 2%, mantidas em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, sob microscópio óptico, avaliou-se a sua capacidade germinativa.

Viabilidade de *M. fijiensis* em folhas doentes destacadas

Foram coletadas folhas doentes no campo apresentado acima de 50% de área foliar lesionada. Amostras de 20cm x 30cm foram distribuídas em locais semelhantes aos do item anterior. A viabilidade do fungo nas amostras foi avaliada nos mesmos intervalos de tempo do ensaio anterior.

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

Seleção de produtos químicos para erradicação do patógeno

Foram testados benomil, thiabendazol (tecto 600), hipoclorito de sódio, óleo essencial de pimenta longa (OEPL), amônia quaternária, digluconato de chlorhexidina, formaldeído e ecolife nas concentrações de 1, 5, 10, 25, 50 e 100ppm. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento, sendo também utilizada uma testemunha apenas com água destilada.

Uma suspensão de 10^5 conídios/ml foi suspensa nesses produtos,

nas suas respectivas concentrações e mantidas em temperatura ambiente, por trinta horas. Após este período, sob microscópio ótico, quantificaram-se cem conídios, aleatoriamente, de cada parcela, sendo computados apenas os esporos germinados.

Avaliação de produtos químicos para erradicação de conídios de *M. fijiensis* aderidos aos frutos.

Foram testados benomil, thiabendazol (tecto 600), ecolife e amônia quaternária 100 e 200ppm e a testemunha apenas com água destilada. Tanto à solução de cada produto quanto à testemunha foi adicionado 0,5 ml do espalhante agral/l. Para tanto, foram selecionados cinco cachos de banana da cultivar Prata anã, aleatoriamente, de um plantio apresentando severo ataque de *M. fijiensis*, da área experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, Manaus-AM. Destes cachos, foram retiradas 25 bananas, aleatoriamente, para cada tratamento. Em cada tratamento, 25 bananas foram imergidas no seu respectivo produto e concentração durante cinco minutos. Em seguida, os frutos foram mantidos à temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, as bananas foram lavadas e esfregadas com auxílio de um pincel e o líquido centrifugado por dois minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e acrescentados 2ml de água destilada no precipitado, o qual foi mantido em incubadora a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 30 horas. Com auxílio de microscópio óptico, quantificaram-se cem conídios, aleatoriamente, sendo computados os germinados em cada tratamento. O mesmo procedimento foi adotado para quantificar o número de conídios aderidos nos frutos antes do teste.

RESULTADOS

Isolamento e esporulação de conídios de *M. fijiensis*

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

O isolado encontra-se depositado na Coleção de Fungos da Coordenação de Pesquisas de Produtos Florestais do INPA, repicado em tubos de ensaio contendo meio de BDA e preservado em refrigerador a baixa temperatura 5°C . O isolado foi catalogado e codificado de acordo com as normas da micoteca do laboratório (LPM472).

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

Tabela 1 - Produção de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* em meios de cultura e regimes de luminosidade, aos 15 dias de incubação^{1/}. Manaus, AM. 2000.

Meio de Cultura ^{2/}	Regime de Luminosidade ^{3/}			
	EC	FP	SEQ	LC
V8 ágar	0*A**b	0 Cb	14,36 Ba	0 Bb
V8CaCO ₃ ágar	0 Ac	13,28 Ab	14,96 Aa	0 Bc
BCA	0 Ab	0 Cb	10,63 Da	0 Bb
ACA	0 Ab	0 Cb	14,53 Ba	0 Bb
BDA	0 Ab	0 Cb	15,09 Aa	0 Bb
FBA	0 Aa	0 Ca	0 Ea	0 Ba
MA	0 Ac	10,35 Bb	11,01 Ca	10,60 Ab

CV(%) = 2,64

^{1/} Dados transformados para $\ln(x+1)$, onde x é a esporulação de *M. fijiensis*.

^{2/} BCA = Batata cenoura ágar; ACA = Água de coco ágar; BDA = Batata dextrose ágar; FBA = Folha de bananeira ágar; MA = Micophil ágar.

^{3/} EC = Escuro contínuo; FP = Fotoperíodo 12 horas; SEQ = Seqüencial (dez dias no escuro e cinco dias subseqüentes sob luz contínua); LC= Luz contínua.

* Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey (P = 0,05).

** Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha não diferem entre si pelo teste Tukey (P = 0,05).

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

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

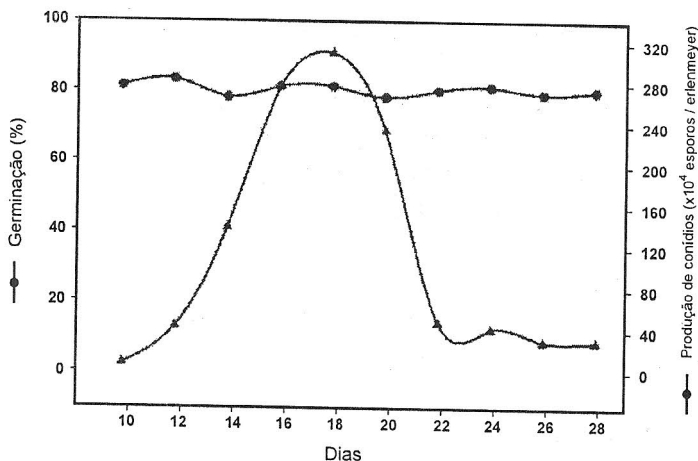


Figura 1 - Influência da idade da cultura na esporulação e viabilidade de conídios de *Mycosphaerella fijiensis*.

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

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

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

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

Efeito dos produtos químicos para erradicação do patógeno.

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

Tabela 2 - Percentagem de inibição da germinação de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* submetidos a diferentes produtos. Manaus, AM. 2000.

Produtos	Concentrações (ppm)					
	1	5	10	25	50	100
Benomil	61,4	72,3	88,0	94,0	95,0	100,0
Amônia quaternária	71,0	77,1	90,4	91,6	96,0	100,0
Digluconato de chlorhexidina	27,7	56,6	62,7	63,9	72,3	88,0
Formaldeído	26,5	36,1	38,6	36,1	38,6	39,8
Hipoclorito de sódio	13,2	18,1	27,7	43,4	26,5	86,7
Ecolife	21,6	28,9	43,4	65,0	81,0	100,0
Thiabendazol (Tecto 600)	21,5	28,2	34,5	52,0	90,2	100,0
OEPL27	27,7	33,1	44,5	51,7	82,2	84,7
Testemunha*	0	0	0	0	0	0

* Água destilada

Efeito dos produtos químicos na erradicação de conídios do patógeno aderidos aos frutos.

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

Tabela 3- Percentagem de inibição da germinação de conídios de *M. fijiensis* aderidos em frutos de banana submetidos a diferentes produtos. Manaus, AM. 2000

Produtos	Concentrações (ppm)	
	100	200
Amônia quaternária	100	100
Benomil	100	100
Ecolife	100	100
Thiabendazol (Tecto 600)	100	100
Testemunha*	0	0

* Água destilada

Conclusões

- O meio de cultura e o regime de luz exerceram grande influência na esporulação de *M. fijiensis*. O meio de BDA, seguido do V8-CaCO₃ ágar e ACA, submetidos ao regime de luz seqüencial, foram os melhores meios para esporulação.
- A produção de conídios em meio de cultura BDA foi máxima em culturas com dezoito dias de idade, enquanto a germinação dos esporos se manteve praticamente estável.
- Os conídios aderidos à superfície de pedaços de tecido, papelão, plástico, madeira, ferro e pneu poderão ser disseminados a longas distâncias, por veículos e/ou pessoas que transitam em banais infectados por Sigatoka negra, independente de transportar o fruto.
- As folhas de bananeiras e frutos também podem ser um meio efetivo para disseminação do patógeno a longas distâncias.

- A presença de estruturas fúngicas, conídios de *M. fijiensis*, em folhas doentes, é uma forte indicação para que tais folhas não sejam utilizadas como proteção dos frutos durante o transporte, pois elas servem de fonte de inóculo para disseminação do fungo a longas distâncias.
- O benomil, o ecolife, o thiabendazol e a amônia quaternária a 100ppm inibiram totalmente a germinação dos conídios de *M. fijiensis*.
- A imersão dos frutos contaminados durante cinco minutos em solução de benomil, de ecolife, de thiabendazol e de amônia quaternária a 100 e 200ppm foi eficiente para inibir a germinação dos conídios.
- Uma pulverização de benomil, ou de ecolife, ou de amônia quaternária, ou de thiabendazol a 200ppm em todos os materiais utilizados no transporte dos frutos poderá reduzir os riscos da disseminação do patógeno.

LITERATURA CONSULTADA

PEREIRA, J. C. R., GASPAROTTO, L. et al . **Doenças da bananeira no Estado do Amazonas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2000. 2.^a ed. Rev. 27p.