

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE SIGATOKA-NEGRA

(*Mycosphaerella fijiensis* MORELET) DE BANANEIRAS (*Musa* sp)

BIANCA REGINA DA HORA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Fisiologia Vegetal.

BOTUCATU – SP

- 2009 -

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

AÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO CONTROLE DE SIGATOKA-NEGRA
(*Mycosphaerella fijiensis* MORELET) DE BANANEIRAS (*Musa* sp)

BIANCA REGINA DA HORA

PROF^a DR^a ELIZABETH ORIKA ONO
Orientadora

PROF^a DR^a SELMA DZIMIDAS RODRIGUES
Co-Orientadora

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Fisiologia Vegetal

BOTUCATU - SP
- 2009 -

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU – UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Hora, Bianca Regina.

Ação de óleos essenciais no controle de sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) de bananeiras (*Musa sp*) / Bianca Regina da Hora. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2009.

Orientadora: Elizabeth Orika Ono

Co-orientadora: Selma Dzimidas Rodrigues

Assunto CAPES: 20303009

1. Fisiologia vegetal

CDD 581.4

Palavras-chave: Controle orgânico; Meios de cultura; *Mycosphaerella fijiensis*; Óleo essencial

AGRADECIMENTO

Agradeço a Prof^ª Dr^ª Elizabeth Orika Ono pela orientação nesta dissertação, bem como a Prof^ª Dr^ª Selma Dzimidas Rodrigues pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. João Domingos Rodrigues pela sugestão do tema desenvolvido nesta dissertação.

Ao Prof. Dr. Wilson e sua aluna Cris Mendes do Campus de Registro da UNESP, pelo ensino da metodologia de obtenção do patógeno.

Aos técnicos do laboratório do Câmpus do Litoral Paulista – Unidade São Vicente da UNESP pelo auxílio na condução deste trabalho.

A todos aqueles que me ajudaram na realização deste trabalho seja na coleta (Denis e Selma), no laboratório (Denis e Eglee) e nas conversas (Rodrigo, Camila, Denis, Eglee e Hudson).

Ao Prof. Dr. Rodrigo Egydio Barreto pela ajuda com as análises estatísticas do trabalho, bem como ao Denis.

Ao motorista Edson (Cabeça) do Câmpus do Litoral Paulista – Unidade São Vicente da UNESP.

Aos amigos que mesmo longe estavam dando o apoio neccessário para a conclusão deste trabalho.

À minha família, principalmente minha mãe (Dulcinéa).

Ao Denis por ter-me aguentado de mau-humor por semanas e por ter puxado minhas orelhas quando precisava.

À Grande Deusa.

Que canções cantava a Sereia, ou que nome assumiu Aquiles quando se escondeu entre mulheres, apesar de serem questões intrigantes, não estão além de *toda* conjectura.

Sir Thomas Browne

HORA, B.R. **Ação de óleos essenciais no controle de sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) de bananeiras (*Musa* sp).** 2009. 68p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

RESUMO - O Brasil é um dos maiores mercados produtores de banana, a segunda fruta mais consumida no país. No entanto, a bananicultura apresenta certas desvantagens em seu cultivo, por sofrer com condições ambientais, pestes e patógenos de acordo com a variedade ou cultivar. Dentre estes problemas, o que mais vem causando grandes prejuízos mundialmente é a sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, tendo como forma anamórfica *Pseudocercospora fijiensis* Deighton. O controle atual desse fungo além de empregar grandes quantidades de agroquímicos, o que onera a produção, contamina o meio ambiente, lesa a saúde do aplicador e dificulta a exportação e pode também produzir híbridos resistentes. Para um controle menos danoso ao meio ambiente e ao produtor/aplicador uma alternativa encontrada tem sido a procura de metodologias menos custosas e mais seguras. A aplicação de óleos essenciais no combate a patógenos tem apresentado resultados positivos em outras culturas e é uma alternativa desejável para o cultivo do fruto, sendo mais baratos que os agroquímicos e biodegradáveis. Assim, este trabalho teve como objetivos encontrar melhores meios de cultura para o crescimento micelial desse fungo. Além disto, avaliar a atividade inibitória na germinação de conídios *in vitro* de *M. fijiensis* dos óleos essenciais de *Carapa guianensis* (andiroba), *Copaifera officinalis* (copaíba), *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (cravo), *Eucalypto globulus* Labill. (eucalipto) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) em diluições de 1mL com 10 ou 30% de óleo essencial em óleo vegetal inerte. Para isto, isolaram-se ascósporos de folhas infectadas de bananeira em meio batata dextrose ágar (BDA) e clorafenicol. Os experimentos com óleos essenciais utilizaram o método indireto, preparando-se suspensão de 7.000 conídios, da qual uma alíquota foi colocada em placas de 6 cm de diâmetro, juntamente com 0,3 ou 0,1 mL do respectivo óleo essencial diluído em óleo vegetal. Cada tratamento constou de quatro repetições, colocadas em BDO por duas horas a 25°C ± 2°C. A contagem de conídios foi aleatória, utilizando-se 100 por placa, entre germinados e não germinados. Nos experimentos de crescimento micelial das colônias previamente isoladas, em BDA, transferiram-se fragmentos para placas contendo meio farinha de aveia-sacarose (FAS), farinha de aveia-ágar (FAA) e BDA; cada experimento constou de 10 repetições que foram mantidas em BDO por 10 dias sob regime luminoso de escuro contínuo a 26°C ± 2°C. Verificou-se a normalidade dos dados de cada tratamento através do teste de Shapiro-Wilk (teste W), procedendo-se em seguida a análise de variância não-paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis/Dunn, com chance de erro de 5%. Os resultados mostraram que as soluções de óleos essenciais de andiroba, copaíba, cravo e eucalipto inibiram significativamente a germinação dos conídios. Quanto ao óleo de tomilho, somente a diluição de tomilho 0,3 mL não distinguiu-se da testemunha e dos demais tratamentos. De acordo com os resultados observados os óleos em ambas as diluições empregadas podem ser utilizados no controle de *M. fijiensis*, exceto tomilho na concentração acima referida. Quanto aos meios de cultura, há evidências estatísticas para afirmar que o crescimento de micélios foi o mesmo entre o meio BDA e o FAS. Entretanto, tanto o crescimento em BDA e FAA como entre os dois meios a base de aveia foi estatisticamente diferente, comprovando que os melhores meios para o crescimento micelial de *M. fijiensis* foram o BDA e o FAS.

Palavras-chave: sigatoka-negra, *Carapa guianensis* Aubl, *Copaifera officinalis* L., *Eugenia caryophyllus* Spreng., *Eucalyptus globulus* Labill., *Thymus vulgaris* L, controle orgânico, crescimento micelial.

SUMARIO

INTRODUÇÃO	8
REVISÃO DE LITERATURA	9
Descrição Botânica	9
Importância Econômica	11
Doenças Foliares na bananeira	13
Mal-do-panamá	14
Mancha-de-cordana	14
Vírus da estria da bananeira	14
Sigatoka-amarela	15
Sigatoka-negra	15
Óleo Vegetal	24
Metabolismo Secundário	24
Meios de Cultura	30
CAPÍTULO I	32
CAPÍTULO II	42
CAPÍTULO III	52
CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
CONCLUSÕES GERAIS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a literatura a bananeira é uma das culturas mais importantes e sua fruta mais popular, sendo o quarto alimento mais valioso na nutrição humana, após o arroz, trigo e leite. Além disso, a cultura ocupa uma vasta área de cultivo, sendo o Vale do Ribeira responsável por 67% desse total. Infelizmente, o transporte desta fruta a partir do Estado de São Paulo para outros, bem como sua exportação, decresceu drasticamente, em função da sigatoka-negra.

A bananicultura apresenta certas desvantagens em seu cultivo, pois está sempre sofrendo com as condições ambientais, pestes e patógenos de acordo com a variedade ou cultivar. Dentre os problemas o que mais vem causando grandes prejuízos mundialmente é a sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, tendo como forma anamórfica *Pseudocercospora fijiensis* Deighton. O controle atual desse fungo, além de empregar grandes quantidades de agroquímicos, o que onera a produção, contamina o meio ambiente, lesa a saúde do aplicador e dificulta a exportação e pode também, produzir híbridos resistentes.

A bananeira é suscetível a inúmeras doenças foliares, como a sigatoka-amarela (*Mycosphaerella muscicola* Leach ex Mulder) e sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) que causam grandes perdas na produção e aumentam o uso de fungicidas. Esses podem contaminar o solo além de ainda causar danos na saúde dos aplicadores (normalmente, pequenos produtores), assim, vários estudos têm comprovado o efeito de compostos vegetais, tais como óleos essenciais que podem atuar como fungicidas naturais, tornando-se uma alternativa viável para o controle destas doenças. Estudos para se obter informações sobre o patógeno são fundamentais para se ter um controle adequado do mesmo, para isso são necessárias pesquisas *in vitro* para obtenção de colônias, adquirindo assim metodologias práticas.

Desta forma, o presente trabalho visou à aplicação de óleos essenciais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), copaíba (*Copaifera officinalis* L.), cravo (*Eugenia caryophyllus* Spreng.), eucalipto glóbulos (*Eucalyptus globulus* Labill.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L) no controle da germinação dos conídios de sigatoka-negra de bananeiras, bem como a avaliação de diferentes meios de cultura para o melhor crescimento micelial desse patógeno.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Descrição Botânica

A bananeira é classificada taxonomicamente como uma monocotiledônea da ordem *Zingiberales*, pertencente à família *Musaceae* compreendendo duas ou três espécies economicamente importantes, a saber: *Musa paradisiaca* L., banana maçã (Gomes, 1978), *Musa acuminata* Colla e *Musa balbisiana* Colla (Gasparotto et al., 2006). De acordo com o Sistema APGII os gêneros *Heliconia* e *Strelitza* não pertencem mais a família *Musaceae*, constituindo as famílias distintas *Heliconiaceae* e *Strelitzaceae*, respectivamente (Souza & Lorenzi, 2005).

Souza & Lorenzi (2005) descreveram a família *Musaceae* como ervas robustas e perenes, com caule do tipo rizoma, com crescimento simpodial. O pseudocaule é formado pelo conjunto das bainhas foliares, sendo que as folhas, por sua vez, são alternas espiraladas e peniparalelinérveas. A inflorescência é constituída por cimeiras subtendidas por brácteas vistosas, cujas flores são relativamente vistosas, bissexuadas ou unissexuadas, zigomorfas e diclamídeas. O cálice é trímero, apresentando duas pétalas unidas e uma livre; os estames são em número de cinco ou seis livres entre si e as anteras são rimosas. O gineceu é gamocarpelar, com óvário ínfero (trilocular), sendo a placentação axial e lóculos pluriovulados. Apresenta nectários septais e o látex, geralmente é incolor. O fruto formado é do tipo baga.

A bananeira, de acordo com Borges & Souza (2004), é uma planta em que a parte aérea é cortada na pós-colheita, apresentando rizoma, um caule subterrâneo de onde saem as raízes primárias, em grupos de três ou quatro, totalizando 200 a 500 raízes, com espessura predominantemente menor que 0,5 mm, podendo atingir até 8 mm, brancas e tenras quando jovens tornando-se amareladas e endurecidas conforme envelhecem. O pseudocaule é formado por uma copa de folhas compridas e largas, com nervura central desenvolvida. Relataram ainda que a planta possa emitir de 30 a 70 folhas, com o aparecimento de uma nova folha a intervalos de 7 a 11 dias. A inflorescência sai do centro da copa, apresentando brácteas ovaladas, de coloração geralmente roxo-avermelhada, em cujas axilas nascem as flores. De cada conjunto de flores formam-se as pencas (7 a 15), apresentando número variável de frutos (40 a 220), dependendo da variedade.

Gasparotto et al. (2006) afirmaram que a emissão das folhas depende da disponibilidade de água e dos nutrientes no solo e da cultivar. Em condições amazônicas (úmidas e quentes) as folhas são emitidas a cada 7 ou 8 dias, no entanto, para regiões como a Sul e Sudeste do Brasil que apresentam épocas definidas, chuvosa / quente e seca / fria, esse período é bem maior.

Conforme Moreira (1999), as bananas comestíveis são das espécies *Musa acuminata* e *M. balbisiana*, ambas com 11 cromossomos, sendo a primeira representada pelo grupo genômico A, cuja ploidia pode ser AA, AAA e AAAA; a segunda é representada pelo grupo genômico B, cuja ploidia pode ser BB, BBB e BBBB. As duas espécies podem se cruzar entre si na natureza e também em condições laboratoriais, produzindo os híbridos: AB, AAB, ABB, AB BB, AABB e AAAB.

Gomes (1978) afirmou que os pesquisadores, geralmente, atribuem a origem da bananeira ao quente e úmido Sudeste asiático, onde já era cultivada muito antes de Cristo. Nhi & Valmoyor (1998) relataram que o gênero *Musa* é originário do Sudeste asiático e do Vietnã, sendo os lugares onde mais se tem diversidade e cultivo de banana. Gasporotto et al. (2006) concordaram em parte com esse relato, comentando que ainda não há precisão quanto ao centro originário da bananeira, por se ter perdido na mitologia grega e indiana, contudo, talvez o centro de origem encontra-se no Sul e Sudeste do continente asiático, desde a Índia até Papua na Nova Guiné. Os mesmo autores comentaram ainda, que a palavra banana é originária das línguas serra-leonesa e liberiana.

Alexandre, o grande conquistador, encontrou a bananeira no vale do rio Indo, 327 anos a.C., e os árabes, por sua vez, a partir do século VII, contribuíram para a difusão da planta, pois a levaram à África, onde se popularizou rapidamente. Colombo encontrou-a nas Antilhas, Vicente Pizon e outros navegantes que precederam Pedro Álvares Cabral, observaram-na na América do Sul, o que deixa os pesquisadores com dúvidas se há variedades brasileiras ou mesmo sul-americanas (Gomes, 1978).

Souza & Lorenzi (2005) afirmaram que a família possui distribuição paleotropical, incluindo dois gêneros e 35 espécies. Comentaram ainda, que com os avanços filogenéticos hoje se tem informações de que não ocorrem espécies nativas no Brasil, no entanto, por serem amplamente cultivadas no país torna-se possível confundi-las com as plantas nativas.

A bananeira é encontrada entre os paralelos de 30° de latitude norte e sul, onde as temperaturas variam de 10°C a 40°C. O cultivo destas plantas é feito em regiões onde as temperaturas variam de 15°C a 35°C, sendo a temperatura ótima de 28°C. Baixas temperaturas provocam a compactação da roseta foliar, dificultando o lançamento da inflorescência, o que deforma o cacho, inviabilizando assim, sua comercialização. Por outro lado, o desenvolvimento da planta é inibido em temperaturas acima de 35°C, pois ocorre a desidratação dos tecidos, sobretudo das folhas (Moreira, 1999; Borges & Souza, 2004).

O método convencional de propagação é por sementes nas espécies selvagens e por perfilhos, nas espécies comerciais. Uma bananeira pode reproduzir tantos perfilhos quanto for o

número de folhas emitidas até a formação do cacho, quando sua atividade é cessada (Gasparotto et al., 2006).

O beneficiamento correto dos frutos após a colheita propicia melhor qualidade dos mesmos, tanto para a comercialização no mercado interno quanto para a exportação. Após a seleção e limpeza, despencamento, lavagem e confecção de buquês e a classificação dos frutos, estes são embalados e acondicionados em caixas de papelão ou de madeira revestidas de plástico ou não, evitando que os frutos sofram escoriações e excessiva perda de água por transpiração. As caixas de papelão são utilizadas para a exportação, enquanto que as de madeira são utilizadas para a comercialização interna referiram Madina & Pereira (2004), relatando que a conservação dos frutos por refrigeração, em atmosfera controlada e modificada, bem como a maturação controlada por climatização deve ser empregada para melhor conservação dos frutos. Hanada et al. (2002a) comentaram que habitualmente os produtores utilizam as folhas das próprias bananeiras para melhor condicionamento dos frutos no transporte.

2.2. Importância econômica

Ploetz (2000) afirmou que a banana e os plátanos são considerados o quarto produto alimentício mais importante mundialmente, logo após o arroz, o trigo e o leite. Sendo que Borges & Souza (2004) confirmaram a importância da banana como uma das frutas mais consumidas no mundo, cultivada na maioria dos países tropicais, podendo ser comercializada por dúzia, quilo e até mesmo unidade, sendo à base da alimentação de alguns deles (Gonçalves, 2006). Tal assertiva é confirmada por Strobel et al. (1993) e INIBAP (1994) quando relataram que a banana é um alimento primário para milhões de pessoas em algumas áreas do mundo, incluindo a África Central, o Sudeste Asiático, a América Central e do Sul e o Caribe e Borges & Souza (2004) indicaram que a banana constitui uma importante fonte de alimento, podendo ser utilizada verde ou madura, crua ou processada.

Estudos realizados por J. Chevalier, químico francês, são comentados por Gomes (1978) para afirmou que as análises químicas mostraram que a banana apresenta 28% de substâncias nutritivas, enquanto a uva fornece 17%, maçã somente 13% e alface não mais que 4%, o que o torna um alimento, para muitos, completo. Outras comparações podem ser observadas na Tabela 1. Faturete et al. (2007) referiram que as bananas contêm muitos carboidratos ($31\text{g } 100\text{g}^{-1}$) e baixo teor de gordura ($0,4\text{g } 100\text{g}^{-1}$). Elas seriam ótimas fontes de vitaminas e minerais, particularmente ferro ($24\text{mg } \text{kg}^{-1}$), potássio ($9,5\text{mg } \text{kg}^{-1}$) e cálcio ($715\text{mg } \text{kg}^{-1}$). O fruto tem alto valor nutricional, pois é uma fonte de energia, por conter amido e açúcares na sua composição,

além de vitaminas A, B e C (Perea-Dallos, 1993; Borges et al., 2006).

Devido aos seus teores energéticos a bananeira é cultivada em todas as regiões tropicais do mundo, sendo a banana a fruta de maior produção e comercialização mundial representando 37% do comércio internacional (Gasparotto et al., 2006). Fullerton & Olsen (1995) relataram que somente 10%, 68 milhões de toneladas, da produção mundial de banana é voltada para a exportação, sendo os outros 90% produzidos para a subsistência, isto porque a bananicultura possui grande importância econômica e social, sendo cultivada numa extensa região tropical, geralmente por pequenos agricultores (Ploetz, 2000; Gonçalves, 2006). Os autores ainda complementaram relatando que aproximadamente 98% da produção mundial ocorre em países em desenvolvimento, sendo os países desenvolvidos o destino da exportação.

Tabela 1. Valor nutritivo de alguns vegetais.

	Parte não comestível	Água	Proteína	Gordura	Valor em calorias/quilo
Frutas/Hortaliças					
Banana	35,0%	75,3%	1,3%	0,4%	1.013
Pêra	10%	80,9%	1,0%	0,5%	358
Maçã	25,0%	84,6%	0,4%	0,5%	638
Tomate	-	94,3%	0,9%	0,4%	220
Batata	20,0%	78,3%	2,2%	0,1%	848
Espinafre	-	92,3%	2,1%	0,3%	209
Repolho	15,0%	91,5%	1,6%	0,3%	253

Fonte: Gomes, 1978.

Em 2000, 123 países produziram banana, porém tanto a produção quanto as exportações foram altamente concentradas em alguns países, como a Índia (13,9 milhões de toneladas), seguido pelo Equador (6,8 milhões de toneladas) e Brasil (6,3 milhões de toneladas). No ano de 2000, a produção brasileira sofreu forte queda devido a doenças foliares que acometeram a cultura (Flori et al., 1995). Borges & Souza (2004) e Gonçalves (2006) comentaram que em 2003 a produção para consumo in natura do fruto foi de aproximadamente 68 milhões de toneladas, tendo como maior produtor a Índia (24,1%), seguido pelo Brasil (9,5%), China (8,5%) e Equador (8,2%).

Mascarenhas (1997) relatou que o Brasil é um dos maiores mercados mundiais desse fruto, pois a banana é a segunda fruta mais consumida no Brasil, logo atrás da laranja, estando o consumo per capita nacional em torno de 25 kg (Borges & Souza, 2004).

Cultivada de norte a sul do país, totaliza uma área de 503 mil hectares em 2002, compreendendo da faixa litorânea até os planaltos interioranos, sendo 99% da produção voltada para o consumo interno. No entanto, segundo IBGE (2004), a cultura da banana apresenta baixa produtividade no Brasil, obtendo-se em torno de 1.200 cachos por hectare ao ano, equivalente a 12,11 t ha⁻¹ ano⁻¹, enquanto a Costa Rica produz 42,03 t ha⁻¹ ano⁻¹, praticamente três vezes e meia a produtividade brasileira. México, Índia e Colômbia apresentaram 24,09; 24,72 e 31,15 t ha⁻¹ ano⁻¹, respectivamente da fruta em seus balanços.

O mercado interno consome praticamente toda a produção nacional e apenas 3,25% da produção é exportada para países como a Argentina, Inglaterra, Itália e Uruguai (AGRIANUAL, 2005).

Borges & Souza (2004) apontaram que as regiões mais produtivas no Brasil são a Sudeste e a Nordeste, que juntas representam 66% da produção nacional (6.422.855 toneladas). São Paulo é o maior produtor com 1.003.414 toneladas, seguido da Bahia, com 625.933 toneladas, Pará, com 567.084 toneladas e Minas Gerais com 541.101 toneladas (AGRIANUAL, 2005). O responsável pela maior produção no Estado de São Paulo é o Vale do Ribeira.

As variedades mais produzidas no país são: Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra e D'Angola, do grupo AAB, visando o mercado interno, já as variedades Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA, tem sua produção voltada para a exportação (Borges & Souza, 2004).

2.3. Doenças foliares na bananeira

Marín et al. (2003) relataram que uma desvantagem da produção de banana é que ela está sempre sofrendo com as condições ambientais, pestes e patógenos, de acordo com a variedade ou cultivar. Por exemplo, o mal-do-Panamá dizimou, em todo o país, os plantios da cultivar Maçã (Borges & Souza, 2004; Gasparotto et al., 2006). O moko da bananeira, uma doença causada pela bactéria *Ralstonia solanacearum* tem causado grandes prejuízos nos bananais das várzeas dos rios amazônicos e constitui doença quarentenária para as demais regiões, exceto Sergipe, onde é relatada a sua ocorrência (Gasparotto et al., 2006).

A sigatoka-amarela, apesar de não destruir os plantios como as demais doenças, onera os custos de produção nas regiões que atendem aos mercados mais exigentes e reduz drasticamente a produção naquelas onde não se adota o controle químico. Com exceção das variedades Maçã, Musore, Terra e D'Angola as demais variedades são suscetíveis.

Grave doença, a sigatoka-negra foi constatada no Brasil em 1998, tendo se expandido

rapidamente pelo país, causando prejuízos elevados e deixando produtores e técnicos bastante preocupados, considerando-se a alta capacidade de destruição que apresenta, e passando a constituir um grande problema de importância social e econômica, uma vez que somente Mysore é a variedade resistente (Gasparotto et al., 2006; Borges & Souza, 2004). Orozco-Santos & Farias-Larios (2002) constataram que essa doença atualmente é considerada como o maior problema da produção comercial de banana em todos os continentes do mundo.

2.3.1. Mal-do-panamá

O mal-do-panamá é causado por um fungo de solo, *Fusarium oxysporum* Schlechtend, que apresenta estruturas de resistência, clamidósporos, os quais permitem sobrevivência mesmo na ausência do hospedeiro. As plantas infectadas com *F. oxysporum* exibem externamente um amarelecimento progressivo das folhas mais velhas para as mais novas e sendo um fungo de solo, desloca-se de baixo para cima no pseudocaule, começando pelos bordos do limbo foliar e evoluindo no sentido da nervura principal. Os sintomas dessa doença na planta são o murchamento das folhas, seguida de seca e ruptura junto ao pseudocaule. Mesmo com a morte das folhas mais velhas é normal encontrar bananeiras ainda eretas e cortando-se o pseudocaule, longitudinal ou transversalmente, é possível a observação de descoloração pardo-avermelhada em decorrência da presença do patógeno nos vasos (Cordeiro et al., 2004).

2.3.2. Mancha-de-cordana

A mancha-de-cordana, causada pelo fungo *Cordana musae* Zimm., está normalmente associada a alguma forma de estresse da planta, em geral a outras doenças, principalmente à sigatoka-amarela e/ou à deficiência mineral. As lesões apresentam um formato piriforme, com zonas concêntricas e circundadas por um halo amarelado com o centro esbranquiçado. Nos primeiros estádios pode ser confundida com a sigatoka-amarela, podendo haver sobreposição das lesões (Gasparotto et al., 2006).

2.3.3. Vírus da estria da bananeira (VEB)

A estria da bananeira é causada pelo vírus da estria da bananeira (*Banana streak virus*, BSV), transmitido de bananeira para bananeira pela cochonilha *Planococcus citri*. No entanto, a transmissão por mudas infectadas é a maior fonte de disseminação. Os primeiros sintomas são estrias ou riscas longitudinais, paralelas às nervuras secundárias, de coloração creme a amarelo-pálida. Estas estrias, amarelo-claras dispõem-se continuamente desde a nervura principal até a borda das folhas, podendo ser confundidas com os primeiros estádios da sigatoka-negra, onde as

estrias são distribuídas aleatoriamente e não sequenciadas como em VEB. Estas estrias de coloração marrom-escuras só são perceptíveis nas folhas mais velhas, sendo observadas nas folhas mais novas apenas estrias marrom-claras e cloróticas. Com o progresso tornam-se amarelo-amarronzadas e por fim marrom-escuras. Quando a infecção é severa, todo o limbo foliar adquire coloração marrom-escuro. As folhas das plantas infectadas apresentam riscas cloróticas que com o passar do tempo, tornam-se necróticas (Cordeiro et al., 2004; Gasparotto et al., 2006).

2.3.4. Sigatoka-amarela

A sigatoka-amarela é causada pelo fungo *Mycospahaerella musicola* Leach (fase telemórfica, *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton, forma anamórfica), conhecida também como mal-de-sigatoka e cercosporiose. Os sintomas iniciais da doença aparecem como uma leve descoloração em forma de ponto entre as nervuras secundárias da segunda à quarta folha, a partir da vela. Essa descoloração aumenta, formando uma estria de tonalidade amarela, que com o passar do tempo adquirem coloração marrom, tornando-se pretas, posteriormente necróticas, circundadas por um halo amarelado e adquirindo a forma elíptica-alongada (Cordeiro et al., 2004).

Gonçalves (2006) relatou que a primeira constatação foi feita em Java no ano de 1902 por Zimmermann, sendo somente reconhecida sua importância quando causou prejuízos no Vale de Sigatoka, nas Fiji, em 1913.

De acordo com Balint-Kurti et al. (2001) estudos indicam que as estratégias de patogenicidade usado por *M. fijiensis* e *M. musicola* são similares, sendo separadas pelos sintomas e pela estrutura dos conídios e conidióforos; técnicas moleculares também são empregadas com a mesma finalidade.

2.3.5. Sigatoka-negra

As doenças foliares descritas até aqui causaram muitos prejuízos aos bananais do mundo, sendo que o mal-do-panamá levou quase à extinção a banana Maçã, variedade muito consumida por seu sabor adocicado e a sigatoka-amarela causou e, ainda causa perdas de até 100% da produção. Esses são somente dois exemplos entre tantos, no entanto, nenhuma delas é tão severa quanto à sigatoka-negra que afeta a qualidade e quantidade de produção dos bananais tornando-se a que mais causa prejuízos à cultura de banana no mundo (Craenen & Ortiz, 1997; Martínez et al., 1998; Vicente, 1998; Jacome, 2002a; Marin et al., 2003; Calvalcante et al., 2004; Cordeiro et al., 2004; Castro et al., 2005; Júnior et al., 2007).

Esse patógeno foi descrito pela primeira vez em 1964 na região de Fiji, sudoeste de Viti levu, a 60 km do Vale de Sigatoka (Carlier et al., 1994; Marín et al., 2003), tendo sua origem, supostamente, em Nova Papua Guiné e nas Ilhas Salomões. Esta espécie também foi encontrada na Austrália, nas ilhas do Pacífico, na África e na América Latina, provavelmente importada através de plantas infectadas (Carlier et al., 1994).

Em 1964 o que Rhodes descreveu como raia negra (Black Leaf Streak), ficaria conhecida como mal da sigatoka-negra. Morelet (1969) revalidou o nome da espécie como *Mycosphaerella fijiensis* e Deighton (1969) descreveu a forma anamórfica pertencendo ao gênero *Pseudocercospora* como *Pseudocercospora fijiensis*. No ano de 1972 foi descrita outra forma em Honduras que recebeu o nome de *M. fijiensis* var. *difformis*, (Marín et al., 2003). No entanto, filogeneticamente não há diferenças entre as duas, assim, Deighton descreveu a forma anamórfica pertencendo ao gênero *Pseudocercospora* como *P. fijiensis*, tornando *M. fijiensis* var. *difformis* sinônimo de *M. fijiensis*. Posteriormente, em 1979, o mesmo pesquisador revisando o gênero *Paracercospora* fez uma nova combinação para as duas formas anamórficas de *M. fijiensis*, baseada em pequenos engrossamentos observados nas bordas das cicatrizes dos hilos conidiais. Com os avanços em filogenética constatou-se por sequenciamento do DNAr, juntamente com as características morfológicas, que não há diferenças que sustentem a separação dos gêneros, fazendo com que *Paracercospora* seja sinônimo de *Pseudocercospora*, sendo então, *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton o nome correto para a fase anamórfica de *M. fijiensis* (Crous et al., 2001; Crous et al., 2002; Jones, 2002).

Cordeiro et al. (2004) reportaram que o esporo assexual de *P. fijiensis* (conídio) está presente durante as fases de estrias ou manchas jovens da doença, onde se observam conidióforos (estrutura de produção dos conídios) saindo sozinhos ou em pequeno número dos estômatos localizados na face abaxial da folha. Quanto à fase sexuada, esta é considerada mais importante no aumento da doença. É a forma mais comum de inoculação, uma vez que grande número de ascósporos (esporos sexuados) é produzido em estruturas denominadas pseudotécios, que se formam, principalmente, na face superior da folha, durante as fases de pico da doença e em períodos de alta umidade e temperatura favorável (Jacome & Schuh, 1992a; Cordeiro et al., 2004).

As condições climáticas afetam o desenvolvimento das doenças foliares, referiu Fouré (1994), sendo que Júnior et al. (2007) confirmaram, ao relatarem que o aparecimento e desenvolvimento de uma doença é resultado da interação de três fatores: planta suscetível, agente patogênico e fatores ambientais favoráveis.

Vicente (1998), citando Pérez & Mauri (1992), Pérez et al. (1993) e Porras & Pérez (1996),

comentaram que a epidemiologia da sigatoka-negra é dependente de fatores abióticos e bióticos. São fatores chaves para a inoculação e rápido desenvolvimento do patógeno, a temperatura, bem como a frequência de chuva (principalmente, a duração da chuva), enquanto Mobambo et al. (1996) afirmaram que os sintomas das doenças costumam variar de acordo com a estação do ano, seca ou chuvosa, sendo que o desenvolvimento da sigatoka-negra é menor na estação de seca do que na de chuva. Martínez et al. (1998) relatou que as zonas que mais sofrem com a severidade da sigatoka-negra são aquelas que têm precipitação superior a 1400 mm por ano e umidade relativa em torno de 80%. Em períodos onde as temperaturas estão abaixo de 20°C, com pequena deposição de orvalho ou de chuvas o desenvolvimento da doença é mais lento e o intervalo de aplicação de defensivos agrícolas é maior.

Reafirmando que a temperatura e a umidade relativa interferem na epidemiologia da sigatoka-negra, Jacome & Schuh (1992a) comprovaram que uma média entre as observações *in vitro* e *in vivo*, de temperatura, indica que, os melhores crescimento e produção de conídios estão entre 25-28°C, sendo a temperatura ótima, 26,8°C, onde ocorre 100% de germinação, com um período de incubação de 14-18 dias em folhas velhas ou novas. O crescimento do fungo foi observado, pelos mesmos autores, na temperatura de 35°C e as colônias podem apresentar micélio de cor cinza escuro a verde-oliva. Stover et al. (1992b) sugeriram que as temperaturas acima de 21°C e um filme d'água sobre a folha proporcionam rápido desenvolvimento, sendo que Jacome & Schuh (1992b) afirmaram que os ascósporos requerem água livre e ambiente quase saturado, umidade entre 98-100%, para a germinação e crescimento. Em contraste, os conídios germinam com uma taxa de umidade entre 92-100%. Em Honduras e na América Central as condições são favoráveis para a germinação de conídios entre os meses de fevereiro a maio, não ocorrendo em outras épocas do ano. De acordo com Jacome & Schuh (1992b) se as condições de umidade foram menores que as requeridas para a germinação esta não ocorre. A infecção por conídios pode ser a responsável pelo desenvolvimento do patógeno em parte do seu período de crescimento e pela dispersão do patógeno durante a estação seca, sendo a umidade o fator limitante para a infecção.

Jacome & Schuh (1992c) referiram que a agressividade e a virulência da doença variam de acordo com as diferenças climáticas e genéticas da população do patógeno. Os mesmos autores relataram que no passado a resistência evoluía de acordo de maneira natural com a variabilidade e as condições ambientais diferentes. Os fatores ambientais podem causar maiores efeitos de expressão de resistência, especialmente, à parcial. Jones (2002) e Mourichon (2002) reportando a bibliografia especializada afirmaram que depois do aparecimento da sigatoka-negra era esperado que em poucos anos ela se espalhasse pelas outras regiões do Pacífico.

Desta forma Gasparotto et al. (2006) referiram que a infecção ocorre nas folhas mais novas da planta, da segunda para a quarta folha e os sintomas inicialmente são observados na face abaxial, de 14 a 20 dias após a infecção, predominantemente na extremidade lateral do limbo, nas folhas 1 e 2, através de pontuações claras ou áreas despigmentadas. Essas pontuações tornam-se estrias de cor marrom com 1 a 2 mm de largura, sendo nessa fase uma possível confusão com a VEB, podendo ser visualizadas também na face adaxial da folha. A seguir, as estrias alongam-se radialmente e apresentam coloração marrom-escura na face abaxial, assumindo, assim, a forma de manchas irregulares. Estas por sua vez, tornam-se negras, dando à folha um aspecto escurecido, o que caracteriza o nome da doença. Em estádios mais avançados das manchas negras, inicia-se o processo de morte prematura de todo o limbo foliar, a partir da borda e estas necroses advêm das lesões iniciais, geralmente devido à alta taxa de infecção. O coalescimento deste patógeno ocorre ainda na fase de estrias o que pode impossibilitar a formação de um halo amarelo ao redor das lesões, provocando confusão dessa doença com a sigatoka-amarela.

Nas regiões das lesões, após a morte foliar, com coloração cinza-palha podem ser observadas na face adaxial pontuações escuras representadas pelos peritécios. A infecção das folhas da bananeira por conídios de sigatoka-negra é observada em três períodos durante a inoculação. Em geral, as estrias marrons são observadas primeiramente, de 14 a 21 dias depois da inoculação e após 28 dias, podem ser observadas manchas (Jacome & Schuh, 1992a; Mourichon et al., 1997; Marín et al., 2003; Cordeiro et al., 2004; Gasparotto et al., 2006). Hoss et al. (2000) relataram que a estabilização do patógeno ocorre de 3 a 4 semanas, em folhas de cultivares suscetíveis depois da penetração do estômato, até os sintomas de necrose aparecerem.

Gasparotto et al. (2006) ainda afirmaram que, a partir do estágio de manchas marrom-escuras observadas próximas à nervura principal, é possível a observação de muitas lesões ou manchas o que caracteriza a agressividade da doença quando comparada à sigatoka-amarela.

O processo de infecção pelo patógeno pode então ser dividido em seis estádios, como descrito por Gasparotto et al. (2006):

1. Descoloração ou pontos despigmentados na face abaxial das folhas 1 e 2;
2. Estrias marrom-claras, de 2 a 3 mm de comprimento;
3. Expansão radial e longitudinal das estrias que se tornam visíveis nas duas faces da folha;
4. As estrias adquirem coloração marrom-escura e aspecto de manchas de formato irregular;
5. As manchas adquirem coloração marrom-escura a negra e
6. As manchas coalescem induzindo a morte prematura do limbo.

A similaridade nos danos causados pela taxa de desenvolvimento de sintomas da sigatoka-negra em diferentes estádios de crescimento e severidade depende da cultivar e da região de cultivo da bananeira (Mobambo et al., 1997).

Segundo Fouré (1994) as lesões nas folhas atacadas evoluem para necroses levando à queda na produção fotossintética, por morte do tecido fotossintetizante, o que demonstra a severidade da doença. Cordeiro et al. (2004) relataram que isto ocorre devido à rápida destruição da área foliar e são sentidos na redução da capacidade produtiva do bananal (Jacome & Schuh, 1992b; Fouré, 1994; Martín et al., 2003; Jimenez et al., 2007), por redução no tamanho do fruto e provoca seu amadurecimento precoce. Gasparotto et al. (2006) asseguram que devido o fato da bananeira não emitir folhas após o florescimento, torna a doença mais severa, pois cerca de 40 dias depois do florescimento a planta encontra-se com as folhas completamente destruídas, os frutos não se desenvolvem, ou seja, não crescem, amadurecem precocemente e apresentam-se desuniformes, o que é comprovado quando Vicente (1998), Balint-Kurti et al. (2001), Martin et al. (2003) e Calvacante et al. (2004) relataram que a necrose causada pela sigatoka-negra resulta em perda estimada de 33 a 50% na produção, por causar morte precoce das folhas. Carlier et al. (1994) ainda complementaram demonstrando que essa queda severa das folhas em cultivares de banana dificulta o controle com fungicidas, ao passo que Cordeiro et al. (2004) afirmaram que as perdas na produção podem chegar a 80%.

Hanada et al. (2002b), citam Amorim (1995), para advogarem que a disseminação de propágulos férteis do patógeno é o processo responsável pelo incremento da doença. Os mesmos autores, citando Gonzáles (1999) e Stover (1980), relataram que *M. fijiensis* produzem quantidades significativas de propágulos, os ascósporos, que são levados pelo vento, e que são desenvolvidos em grande quantidade no interior dos peritécios, sendo os principais agentes de dispersão em bananeiras. Tal fato é confirmado por Craenen & Ortiz (1997) quando afirmaram que a dispersão de sigatoka-negra é feita pelo vento e complementam afirmando que esta disseminação de esporos pode ser realizada pela água. Rutter et al. (1998) e Burt (2002) relataram em seus estudos na Costa Rica que o vento é a melhor maneira de dispersão de esporos do patógeno, bem como dos ascósporos e conídios que podem ser carregados pelo vento a curta e longas distâncias, o que faz com que os esporos sejam espalhados em uma plantação. Jacome & Schuh (1993) demonstraram que os conídios também podem ser considerados estruturas de disseminação do patógeno e Hanada et al. (2002b) relataram que além do vento as mudas doentes e as folhas infectadas, utilizadas para a proteção dos frutos durante o transporte, também constituem uma forma de dispersão. Os autores comprovaram que os esporos do patógeno permanecem viáveis nas folhas e tecidos de algodão por 60 dias, em papelão, madeira, plástico e

pneu por 30 dias e 18 dias em frutos maduros.

Johanson et al. (1994) reportando a bibliografia especializada afirmaram que depois de ser descoberta nas Ilhas Fiji, a sigatoka-negra foi observada na Austrália, Nova Guiné, Ilhas Norfolk, Tahiti e no Havaí. Na mesma época foram identificados focos na Ásia (Gonçalves, 2006).

Em 1972 a doença foi constatada em Belize (Jones, 2002) e Honduras (Calvalcante et al., 2004), em 1973 na Zâmbia (Jones, 2002; Gonçalves, 2006), entre os anos de 1977 e 1980 foi constatada no México (Jacome & Schuh, 1992b), Guatemala (Jones, 2002), Costa Rica, El Salvador e Nicarágua (Jones, 2002; Calvalcante, 2004), em 1980, no Gabão, Congo, Guiné Equatorial e Camarões (Fouré, 1994).

O primeiro relato na Austrália foi em 1981, bem como nas regiões próximas, Ilhas de Murray, Badu, Moa e Thursday. No mesmo ano, no norte do México, sul do Panamá e nordeste da Colômbia (Jones, 2002). Apesar de muitos esforços para conter o avanço da doença não se pode erradicá-la da Austrália, ocorrendo uma segunda infecção em 1984 (Jones, 1984).

Jones (2002) reportou informações pessoais sobre o aparecimento da sigatoka-negra no Brasil em 1996, no entanto, o primeiro relato oficial brasileiro sobre esse assunto só foi realizado em 1998 (Cordeiro et al., 1998).

De acordo com Romero (2002) no final dos anos de 1980 até 1999 a sigatoka-negra foi constatada em seis diferentes países africanos, bem como na Ásia e América Latina e regiões da Austrália/Oceania, assegurando ainda que, possivelmente no futuro, a sigatoka-negra apresentaria uma distribuição igual a da sigatoka-amarela. Mourichon (2002) complementou, afirmando que a sigatoka-negra estaria distribuída por todas as áreas de produção de banana no mundo, principalmente no sudeste da Ásia, zonas originárias do patógeno, Pacífico, América Latina e África (Calvalcante et al., 2002; Jones, 2002). Isto foi confirmado no Workshop em São José, Costa Rica, onde ficou clara a distribuição do patógeno na América, pois se constatou a doença na América Central, México, Flórida (EUA), Colômbia, Peru, Venezuela, Bolívia e Brasil, além da região Caribenha, a saber: Cuba, Jamaica, República Dominicana e Haiti, estando presente também no continente africano, nas regiões centro-oeste e leste e, recentemente, descoberta em Madagascar. A doença também foi encontrada no nordeste da Austrália.

Cordeiro et al. (1998) relataram que foi constatada no Brasil em 1998, no Estado do Amazonas e de acordo com Pereira et al. (1998) a sigatoka-negra ocorreu no Brasil, nesse mesmo ano, nos municípios de Tabatinga e Benjamin Constant, Estado do Amazonas. Ritzinger et al. (1999) afirmaram que a sigatoka-negra foi verificada no Estado do Acre em novembro de 1998, no Campo Experimental da Embrapa Acre. Em 1999 a doença chegou aos Estados de Rondônia e Mato Grosso (Cordeiro et al., 2006) e em 2001 o patógeno já estava distribuído por

todos os estados da região Norte e no Mato Grosso (Gasparotto et al., 2001). No Estado de Minas Gerais em junho 2004 observou-se a presença da sigatoka-negra (Castro et al., 2005) e no mesmo ano no Município de Miracatu, Estado de São Paulo (Cordeiro et al., 2006). A doença já estava presente em quase todo o território brasileiro, em 2006, ou seja: nos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rio Grande do Sul, Rondônia, Roraima, Santa Catarina, São Paulo (Gasparotto et al., 2006).

Os autores Mourichon & Fullerton (1990) reportaram que o patógeno ataca, principalmente, as bananas de genoma AAA, bem como outros grupos genômicos (AA, AAB e ABB). O maior impacto foi na África e na América Latina em bananas do grupo AAB, muito usados na alimentação, pois os produtores destas regiões não possuem financiamento e recursos técnicos para o uso de fungicidas. No Brasil a produção do subgrupo Terra (AAB), no Acre, é severamente atacada (Calvalcante et al., 2004), enquanto que no Estado de Minas Gerais a doença é mais agressiva para as cultivares Prata, Prata Anã e Cavendish (Ploetz, 2000; Cordeiro et al., 2006). Cavalcante et al. (1999) relataram que a sigatoka-negra causa grandes problemas nas áreas de cultivo das variedades Maçã, Prata e D'angola (Comprida subgrupo Terra), todas suscetíveis à doença.

Em trabalho de 2004, Cavalcante et al. referiram que em dois anos (1997-1999) o volume de produção em cacho cresceu 61% nos mercados do Amazonas, Rondônia, Mato Grosso e Goiás, no entanto, o período de 2000-2001 foi marcado por declínio de 42% na produção do estado, provavelmente devido à sigatoka-negra. Os autores ainda confirmaram que um aspecto importante a ser destacado está relacionado ao baixo nível tecnológico empregado no cultivo e no transporte da produção. Este fato favorece a dispersão da doença e compromete a produtividade, além da qualidade da produção acreana.

Faturete et al. (2007) afirmaram que estudos são necessários para guiarem novas descobertas e atividades de desenvolvimento para que a produção de bananas aumente, diminuindo assim, a taxa de queda na produção.

Em experimentos realizados no Estado do Amazonas, Gasparotto et al. (2008) constataram que o número de folhas viáveis no florescimento foi inferior a nove e a severidade da doença na folha 10 foi superior a 30%. Na colheita, os cachos atingiram cerca de 6 a 8 kg com frutos pouco desenvolvidos e número reduzido por cacho devido ao ataque do patógeno. Cerca de 50 dias após a emissão do cacho as plantas encontravam-se com todas as folhas mortas devido ao ataque da sigatoka-negra. A perda no primeiro ciclo de plantio foi devido à doença, que causou perdas de 50 a 60% da produção.

Strobel et al. (1993), citando Jaramillo (1986), relataram que a severa epidemia da

sigatoka-negra em Honduras e outros países entre 1972-73 resultou em perdas de aproximadamente 47%, enquanto Jeger et al. (1995) comentaram que a sigatoka-negra causou prejuízos de mais de 50% na economia da África Central e Oeste.

Estudos citológicos de interação entre *M. fijiensis* e as cultivares resistentes, revelaram que o patógeno age primeiramente como um parasita biotrófico que coloniza exclusivamente os espaços intracelulares do mesófilo foliar sem formar haustórios, entrando nas folhas da bananeira através dos estômatos. Um dos principais mecanismos que poderiam estar envolvidos no desenvolvimento lento das lesões observadas nos genótipos parcialmente resistentes poderia ser: compostos antifúngicos sintéticos de maneira constitutiva ou tolerante às toxinas pontuais produzidas por *M. fijiensis*. Este mecanismo se apresenta, como marcador na seleção dos genótipos de banana com resistência duradoura à *M. fijiensis* (Beveraggi et al., 1995; Harelimana et al., 1997; Lepoivre et al., 2002). Hoss et al. (2000) relataram que o mecanismo de defesa pode ser atribuído a fatores fisiológicos e bioquímicos para a penetração nos estômatos do hospedeiro pelas hifas do fungo. Conseqüentemente, a determinação dos eventos de conexão das futuras relações entre os dois organismos vai variar de acordo com o contato de cada estágio. Os mesmos autores referiram que nas áreas com alta incidência de esporulação do fungo, o controle da doença atualmente tem como base, agentes químicos em larga escala, porque as cultivares resistentes são conhecidas somente em nível experimental.

Pode-se, reportou Burt (2002), utilizar fungicidas para o controle de sigatoka-negra, mas isto onera os custos dos pequenos produtores e, ainda, causa prejuízos ao meio ambiente. Roux et al. (2002) relataram que o controle químico das doenças causadas pelas espécies de *Mycosphaerella* causa danos ao meio ambiente, sendo perigosos e custoso para muitos produtores. No entanto, Ploetz (2000) advogou que sem o uso freqüente de fungicidas não se pode ter um controle da sigatoka-negra o que acarreta em uma quantidade de frutos menores e com menor preço de mercado, por sua vez, Riveros et al. (2002) utilizaram o controle microbiológico para sigatoka-negra, encontrando resultados satisfatórios.

Harelimana et al. (1997) relataram que o controle químico e a criação de cultivares resistentes à doença são duas estratégias dominantes para o controle da sigatoka-negra. Ao passo que Robinson (1996), citado por Gonçalves (2006), ressaltou que os custos para o controle da sigatoka-negra são muito altos, causando danos ao meio ambiente e podendo provocar rápido desenvolvimento de resistência ao produto. Um exemplo disso seria a resistência do patógeno ao Benomyl utilizado na Costa Rica, após dois anos de aplicações (Romero & Sutton, 1998). Ploetz (2000) comentou que se sabendo da existência de patógenos resistentes à azoxystrobina, a alternativa encontrada foi a utilização de misturas, coquetéis, para o combate ao patógeno e uma

como a mistura de trifloxystrobina e azoxystrobina que apresenta resultados satisfatórios (Pàrez et al., 2002).

Um processo de obtenção de plantas resistentes à sigatoka-negra, conforme Stover (1986), citado por Strobel et al. (1993), seria a utilização do método tradicional, onde se espera a maturação da planta que propicia a condição para o fungo produzir esporos, infectando, naturalmente, as folhas seguindo o esquema artificial de indução da doença. Este processo requer 12 meses para se estabilizar mostrando então, as cultivares resistentes e as suscetíveis à doença.

Jacome & Schuh (1992a) observaram que em Honduras o controle do patógeno é mais difícil em algumas regiões, em comparação a outras, sugerindo que o fenômeno ocorre devido às diferenças climáticas e genéticas do patógeno. Os autores ainda relataram que estudos para o controle de fatores ambientais são necessários.

A sigatoka-negra cresce em plantas resistentes à sigatoka-amarela (Strobel et al., 1993, citando Buddenhagen, 1986 e Ploetz, 2000) e a primeira tem suplantado a segunda nas culturas, sendo economicamente importante nas plantações de banana.

Romero & Sutton (1997) e Jenny et al. (2002) relataram que as pesquisas com métodos convencionais de resistência ao patógeno estão sendo feitos por várias instituições de pesquisa, para evitar o uso de fungicidas, como: Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) em Honduras, pelo Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD-FLHOR) na França e Guadalupe, pelo International Institute of Tropical Agriculture (IITA) na Nigéria e Uganda, pelo Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains (CARBAP) em Camarões e pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) no Brasil.

Em Fiji, Jones (2002) e Mourichon (2002) demonstraram que se tentou o controle, usando o mesmo produto para sigatoka-amarela via aplicação foliar de óleo mineral e que não foi muito eficiente. O primeiro autor relatou que as medidas tomadas pela Austrália no controle do patógeno foram: (1) estabilização de áreas de quarentena, (2) controle da movimentação dos frutos de uma área para outra de plantio, (3) monitoramento e diagnóstico para a detecção de estrias nas folhas, (4) destruição de plantas afetadas, (5) podas drásticas de todas as bananeiras nas áreas de crescimento, (6) aplicação de fungicidas sistêmicos e (7) tolerância zero a sigatoka-negra.

Na década de 1950 optou-se pela utilização de óleos de petróleo, o que impedia a penetração do fungo na folha, reduzindo a germinação e o crescimento do tubo germinativo e aumentando o período de incubação do patógeno. No entanto, estes óleos mostraram-se pouco eficientes e muito fitotóxicos.

Pérez et al. (1993) relataram que em Cuba utiliza-se uma mistura de fungicida e óleo que atua na inibição do crescimento micelial, bem como, no desenvolvimento de estádios primários de sigatoka-negra o que reduz as manchas de necrose maduras e a produção de ascósporos. No entanto, infecções latentes não-visíveis e novas deposições de ascósporos são viáveis para a germinação.

Em trabalho de 2000, Ploetz reportou que em Camarões recomenda-se a aplicação anual desses fungicidas de 10-14 vezes, sendo que na América Tropical esse número pode variar de 35 a 45 aplicações anuais e na América Central variando de 25 a 40 aplicações. O autor ainda ressaltou que essas aplicações são necessárias devido ao clima destas regiões.

Jorge & Polanco (2002) afirmaram que na República Dominicana, no início, como método de controle utilizou-se os mesmo defensivos agrícolas que eram aplicados contra a sigatoka-amarela, no entanto, estes não surtiram efeitos fazendo com que se optasse por combinações de manejo. Atualmente, utilizam-se a retirada das folhas, a aplicação de fungicidas e a fertilização, sempre utilizando as cultivares resistentes, principalmente, os híbridos da FHIA. Romero & Sautton (1997) referiram que FHIA 1 e FHIA 2 são resistentes às variações de temperatura e diferentes populações do patógeno.

Conforme Jimenez et al. (2007), no Equador o controle da sigatoka-negra é feito com fungicidas sistêmicos e de contato, além da aplicação foliar de óleo mineral. Nos últimos 10 anos o uso de fungicidas vem crescendo naquele país, sendo os mais usados, entre os fungicidas sistêmicos: benzimidazol, triazol, morpholina e estrobilurina e entre os fungicidas de contato: chlorothalonil e mancozeb; outros muito utilizados são os do grupo do propiconazol.

A Embrapa nos últimos anos tem investido em melhoramento genético da bananeira, procurando variedades resistentes às doenças e para a sigatoka-negra as variedades resistentes produzidas pela empresa são: Caipira (grupo AAA), Thap Maeo (grupo AAB), FHIA-18, Pacovan Ken, Prata-Graúda, Preciosa e Maravilha (Borges & Souza, 2004).

2.4. Óleo Vegetal

2.4.1. Metabolismo Secundário

De acordo com Raven et al. (2007) os compostos produzidos pelas plantas têm sido separados em metabólitos ou produtos primários e secundários, sendo os primários, por definição, moléculas que se encontram em todas as células vegetais e são necessárias para a vida da planta. Os metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais, por sua vez são compostos orgânicos que parecem não ter função direta no crescimento e desenvolvimento da planta. Os metabólitos secundários em geral não apresentam ação direta conhecida na

fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídios (Taiz & Zeiger, 2009).

Alguns pesquisadores discordam dessa definição de metabólitos secundário afirmando que estes, por fazerem parte de produtos relacionados efetivamente com o desenvolvimento e crescimento do vegetal, como os hormônios vegetais e carotenóides, não poderiam estar entre os produtos do metabolismo secundário, sendo a única justificativa para a divisão entre metabolismo primário e secundário o momento da produção, uma vez que o metabolismo secundário precisa dos produtos do primário para ser sintetizado (Rodrigues & Ono, 2008 comunicação pessoal), sendo que Larcher (2000) relatou que as substâncias bioativas vegetais, são o resultado final ou intermediário do metabolismo secundário, que tem como matéria-prima as substâncias originadas no metabolismo primário.

Os produtos secundários também diferem dos metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e acil-lipídios) por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, metabólitos secundários específicos são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, enquanto que os metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal (Raven et al., 2007; Taiz & Zieger, 2009).

Por apresentarem concentrações significativas de proteínas e carboidratos, os vegetais são importantes na alimentação dos animais, insetos, caracóis e vertebrados. Assim, em sua estratégia de defesa produzem compostos tóxicos, provenientes do metabolismo secundário, que são produzidos em grandes quantidades quando passam por períodos de estresse, devido a ataque de patógenos ou herbívoros ou por fatores ambientais entre outros (Mooney et al., 1991; Heldt, 2005).

No século XIX e começo do século XX, químicos orgânicos começaram a estudar o que era conhecido como compostos finais do metabolismo, sem função, mas importantes como medicamentos, venenos, aromatizantes e materiais industriais. Archibold (1995) afirmou que a defesa química das plantas é fornecida por diversos compostos do metabolismo secundário por serem tóxicos aos herbívoros. Atualmente, sabe-se que a variedade das substâncias do metabolismo secundário tem como origem a filogenia das plantas em co-evolução metabólica com microorganismos parasitas e, especialmente, com herbívoros, além de agirem como atrativos de animais polinizadores e dispersores de sementes, além de agentes na competição planta-planta (Larcher, 2000; Taiz & Zeiger, 2009).

Os metabólitos secundários são também importantes para a evolução das angiospermas, incluindo compostos não relacionados quimicamente, como alcalóides, quinonas, óleos voláteis (incluindo terpenóides), glicosídeos (incluindo substâncias cianogênicas e saponinas),

flavonóides e até mesmo ráfides (cristais de oxalato de cálcio em forma de agulhas) (Raven et al., 2007) e podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: compostos fenólicos, compostos nitrogenados e terpenos.

O termo substâncias fenólicas engloba uma grande variedade de compostos, todos eles apresentando um grupo hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático (um anel de seis átomos de carbono, contendo três duplas ligações). Estão quase universalmente presentes nas plantas e são conhecidos por acumularem-se em todas as partes do vegetal (raízes, caule, folhas, flores e frutos). Embora representem o grupo mais estudado dentre os metabólitos secundários, a função de muitos compostos fenólicos ainda é desconhecida (Simões et al., 2000). Sabe-se que uma das funções dos taninos é impedir que a planta seja atacada, principalmente, por herbívoros, pois estes são acumulados nas folhas. Para animais ruminantes os taninos são importantes por proporcionarem maior resistência na ingestão da comida para a atividade das bactérias em seu trato digestório (Fritz & Simms, 1992; Archibold, 1995).

Os compostos fenólicos são biossintetizados em diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. As duas rotas metabólicas básicas são a rota do ácido chiquímico e a do ácido malônico, ocorrendo na primeira a biossíntese da maioria dos ácidos fenólicos, enquanto a segunda está envolvida com a biossíntese dos flavonóides. O metabolismo dos aminoácidos até a formação do ácido chiquímico, juntamente com a via do acetato policetídeo, dá origem aos fenilpropanóides, flavonóides, taninos e muitas substâncias encontradas nas plantas, bem como em líquens. Os alcalóides somente ocorrem pela via metabólica dos aminoácidos; além disso, a rota do ácido chiquímico converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose-fosfato em aminoácidos aromáticos (Larcher, 2000; Taiz & Zeiger, 2009).

Os compostos nitrogenados também são biossintetizados pela rota do ácido chiquímico. O nitrogênio representa menos de 1% da massa seca de uma planta e os compostos nitrogenados são extremamente importantes fisiologicamente. Uma variedade de metabólitos secundários possui nitrogênio na sua estrutura, incluindo os alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não-protéicos (Kozlowki et al., 1991; Taiz & Zeiger, 2009).

Os terpenos ou terpenóides constituem o maior grupo de produtos secundários (mais de 22.000 compostos); considerados os mais difundidos do reino vegetal, geralmente são insolúveis em água. Todos os terpenos derivam-se da união de unidades pentacarbonadas que apresentam um esqueleto ramificado de isopentano. Os elementos estruturais básicos dos terpenos são algumas vezes chamados de unidade isoprênica, pois os terpenos, quando submetidos a altas temperaturas, podem se decompor em isoprenos, assim, todos os terpenos são, ocasionalmente,

referidos como isoprenóides. Os terpenos são classificados pelo número de unidades pentacarbonadas: os de 10 carbonos, que têm duas unidades C_5 , são os monoterpenos; os de 15 carbonos (três unidades C_5) os sesquiterpenos; os de 20 carbonos (quatro unidades C_5), os diterpenos; os triterpenos 30 carbonos, tetraterpenos apresentam 40 carbonos e os politerpenos ($[C_5]_n$ carbonos, onde $n > 8$) são os maiores terpenos. Uma única planta pode sintetizar muitos terpenos, em distintas partes, para uma grande diversidade de propósitos e em épocas diferentes, ao longo de seu desenvolvimento (Salisbury & Ross, 1991; Larcher, 2000; Raven et al., 2007; Taiz & Zeiger, 2009).

Desta forma os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por duas rotas diferentes. Na rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil coenzima A são ligadas, a partir de uma série de etapas da rota, para formar o ácido mevalônico. Esse intermediário de seis carbonos é então pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir isopentenil difosfato (IPP), que é uma unidade ativa básica na formação dos terpenos. Há pouco tempo descobriu-se que o IPP também pode ser formado a partir de intermediários da glicólise ou do ciclo de redução fotossintética do carbono, através de um conjunto de reações denominado rota do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos. Embora nem todos os detalhes tenham sido esclarecidos, o gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato parecem se combinar para formar um intermediário que eventualmente, é convertido em IPP (Heldt, 2005; Taiz & Zeiger, 2009).

O isopentenil difosfato e seu isômero, dimetilalil difosfato (DMAPP), são unidades pentacarbonadas ativas na biossíntese dos terpenos que se unem para formar o geranyl difosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos, a partir da qual são formados os monoterpenos. O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP formando um composto de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos, precursor dos diterpenos. Finalmente, o FPP e GGPP podem dimerizar para formar os triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}), respectivamente como referiram os autores supracitados.

Certos terpenos têm função bem caracterizada no crescimento e no desenvolvimento vegetal, podendo ser considerados como metabólitos primários em vez de secundários, portanto, as giberelinas são diterpenos, os esteróis são derivados de triterpenos, os carotenóides de cores vermelha, amarela e laranja são tetraterpenos e o ácido abscísico (ABA), é um sesquiterpeno, C_{15} , produzido pela degradação de um precursor de carotenóides (Kozlowisk et al., 1991; Heldt, 2005; Taiz & Zeiger, 2009).

Os terpenos são tóxicos e deterrentes para muitos insetos e mamíferos herbívoros,

exercendo assim, importante função na defesa; assim, os ésteres de monoterpenos (piretróides) encontrados em folhas e flores de espécies de *Chrysanthemum* apresentam grande atividade como inseticida. Outro exemplo são os terpenos que ocorrem no gênero *Salvia*, tóxicos para gramíneas anuais e ervas. Uma hipótese que explicaria este fato é que os terpenos inibidores volatilizam e o movimento em estado de vapor inibe, principalmente, a germinação de sementes e o crescimento de plantas que estão ao seu alcance (Haper, 1994; Taiz & Zeiger, 2009). Heldt (2005) referiu que muitos isoprenóides são formados somente em resposta à infecção por bactérias e fungos.

O maior composto terpenóide conhecido é a borracha, o látex extraído da *Hevea brasiliensis*, que consiste em moléculas contendo de 400 até 100.000 unidades de isoprenos.

Muitos terpenóides são venenosos como os glicosídeos cardioativos extraídos das dedaleiras (*Digitalis*) e os encontrados em *Nerium apocynaceae* (espirradeira) sendo muito eficientes contra herbivoria. Além desses, outros compostos são pigmentos fotossintéticos (carotenóides) e os hormônios vegetais (giberelinas e ABA), enquanto que outros ainda servem como componentes estruturais de membranas (esteróis) ou como transportadores de elétrons (ubiquinona e plastoquinona) (Heldt, 2005; Raven et al., 2007).

Muitos dos monoterpenos e sesquiterpenos são componentes dos óleos essenciais, além de triglicerídios e ácidos graxos com 18 átomos de carbono. Estes compostos são geralmente lipofílicos, e seus componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos etc, em diferentes concentrações, incluindo ácidos oléicos e ácidos linoléicos, sendo altamente voláteis e contribuindo para a fragância ou essência das plantas que as produzem, por exemplo, hortelã-pimenta, limão, manjeriço, sálvia, rosas e eucalipto. Tendo uma composição muito semelhante as gorduras, os óleos essenciais diferem dessas por serem líquidos em temperatura ambiente, enquanto as gorduras são sólidas nas mesmas condições. Esses óleos têm, pois composição muito complexa, com vários tipos de substâncias terpênicas, podendo variar quantitativamente em função do local e época de coleta da planta (Taiz & Zeiger, 2009).

O óleo essencial produzido pelas folhas de algumas plantas inibe a ação dos herbívoros; algumas protegem contra ataque de fungos ou bactérias; outros são conhecidos por serem alelopáticos. Os terpenos das essências das folhas atraem os insetos polinizadores (Kozłowski et al., 1991; Salisbury & Ross, 1991; Simões & Spiter, 1999, citado por Santurio et al. (2007); Larcher, 2000; Raven et al., 2007; Taiz & Zeiger, 2009). Fritz & Simms (1992) relataram que os óleos essenciais produzidos por um vegetal podem conter mais de cem constituintes, no entanto, complementaram afirmando que isto é virtualmente impossível a priori porque alguns compostos

particulares são comumente mais importantes na atuação contra insetos. Os autores ainda advogaram que para se determinar qual dos compostos é o realmente ativo, é necessário entender sua biossíntese, estrutura e operacionalidade.

Os óleos essenciais podem ser extraídos de sementes, caules, folhas e flores, por meio de destilação por arraste a vapor, sendo importantes comercialmente como aromatizantes de alimentos, na indústria de perfumes, como fontes de vitaminas (A, D e E), como inseticidas naturais e solventes (Salisbury & Ross, 1991; Heldt, 2005; Taiz & Zeiger, 2009). Pesquisas recentes revelaram um aspecto interessante na função protetora dos terpenos voláteis em milho, algodão, tabaco selvagem e outras espécies: certos monoterpenos e sesquiterpenos são produzidos e liberados somente após o inseto ter iniciado a ingestão da planta. Tais substâncias repelem herbívoros oviposidores e atraem inimigos naturais, incluindo insetos herbívoros e, assim, minimizam danos adicionais. A capacidade das plantas em atrair inimigos naturais de insetos herbívoros sugere uma nova alternativa ecológica para o controle de pragas (Taiz & Zeiger, 2009). Hammer et al. (1999) asseguram que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é conhecida há muitos anos e Carson & Riley (1995) complementaram que os óleos essenciais de plantas apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos.

Bastos & Albuquerque (2004) relataram que com a restrição ao uso de fungicidas, devido à fitotoxicidade, efeitos residuais, espectro de ação e resistência pelo patógeno, tem-se procurado métodos alternativos de controle tais como uso de biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais. Diversos estudos comprovam o potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas, o que torna os efeitos de óleos essenciais, fungicidas naturais que inibem a atividade fúngica (Schwan-Estrada et al., 1997; Stangarlin et al., 1999; Chao & Young, 2000). O entendimento das propriedades antimicrobianas e/ou elicitoras dos compostos secundários presentes em plantas medicinais podem contribuir para a aquisição de novas técnicas de controle de doenças em cultivos (Bonaldo et al., 2004).

Os óleos essenciais extraídos de orégano, tomilho, canela, entre outros, afirmaram Santurio et al.(2007), têm potencial antimicrobiano significativo para bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos.

Hitokoto et al. (1980), reportados por Pereira et al. (1998), testaram 29 condimentos e observaram inibição completa de três espécies toxigênicas de *Aspergillus* por extratos de cravo, semente de anis e pimenta, enquanto que os outros condimentos foram eficientes somente na

inibição da aflatoxina. Os mesmos autores relataram que Benjilali et al. (1984) estudaram o efeito de seis óleos essenciais em 39 espécies de fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e outros, sendo o óleo de tomilho o mais eficiente, seguido de 3 outros, a saber: estragão, alecrim e eucalipto.

Estanislau et al. (2001) empregando a bibliografia especializada referiram que o gênero *Eucalyptus* apresenta como propriedades terapêuticas ação antifúngica, antisséptica, adstringente, antiinflamatória, antibacteriana, cicatrizante e é um desinfetante de grande potencialidade. A eficiência dos monoterpenos citral, citronelal e dos óleos essenciais das plantas de *Eucalyptus citriodora* Hooker M. no controle *in vitro*, na germinação de conídios e do crescimento micelial de *Colletotricum musae* foi comprovada (Alves et al., 2002; 2003).

Ao avaliarem o efeito *in vitro* de óleos essenciais dos condimentos, alho, canela, cravo e tomilho, sobre o desenvolvimento micelial dos fungos *Rhizopus* sp, *Penicillium* sp, *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*, Chalfoun et al. (2004) constataram que o óleo de canela inibiu totalmente os fungos testados. Os óleos de tomilho e alho apresentaram o mesmo efeito nas concentrações mais altas e o cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos a partir da concentração 600 mg mL⁻¹, exceto o fungo *Penicillium* spp onde a concentração efetiva foi de 800 mg mL⁻¹. Ji et al. (2005) reportaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de tomilho, enquanto Juven et al. (2004) afirmaram sobre sua ação antibactericida.

Estrella (1995) citado por Leite (1998) relatou que o óleo de copaíba é utilizado como anti-séptico e Bandeira et al. (1999a,b) referiram que ele é amplamente utilizado na medicina popular, principalmente na Região Norte e Nordeste, devido suas propriedades medicinais como antiinflamatório e antibacteriano.

2.5. Meio de cultura

Uma das características do gênero *Cercospora* é o crescimento lento e a escassez de esporulação em meios artificiais (Brunelli et al., 2006). Os autores verificaram que agentes físicos são capazes de induzir ou inibir os desenvolvimentos vegetativo e reprodutivo da maioria dos fungos, sendo os mais importantes a temperatura e a luminosidade. Montarroyos et al. (2007) reportando 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. Isto foi confirmado por Dhingra & Sinclair (1995) citado por Hanada (2002) 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 os meios V8 e farinha aveia-água

(FAA) foram os melhores para a esporulação de *Cercospora sojina*. Hanada et al. (2002a) em comprovaram a eficiência do meio de cultura V8, bem como o meio batata dextrose ágar (BDA) na esporulação de *M. fijiensis*, mas Veiga & Kimati (1974) advogaram que o meio FAA pode substituir o meio V8 sem prejuízos e comentaram ainda que, por esse ser um meio importado torna-se de difícil aquisição em algumas regiões.

O regime luminoso que mais influencia no crescimento micelial do gênero *Cercospora* é o de escuro contínuo, sendo a temperatura adequada para a mesma finalidade de 25°–28°C (Hanada et al., 2002a; Brunelli et al., 2006).

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, principalmente, pelo uso de híbridos resistentes. Para isso 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 as condições ótimas para o crescimento micelial e produção de esporos.

CAPITULO I

Óleos essenciais de andiroba e copaíba no controle de sigatoka-negra de bananeiras

Bianca Regina da Hora, Selma Dzimidas Rodrigues & Elizabeth Orika Ono

Abstract

A banana é um dos frutos mais consumidos no mundo, sendo cultivado na maioria dos países tropicais, sendo considerado alimento base para a maioria da população destes países. Desenvolvida geralmente por pequenos produtores, a bananicultura está sempre muito suscetível a inúmeras doenças. Atualmente, o patógeno que mais tem causado prejuízos ao seu cultivo é a sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Hoje suas formas de controle são feitas com o uso de defensivos agrícolas e híbridos resistentes. Visando um controle orgânico dessa cultura, o que favorece a exportação desse fruto, este trabalho utilizou óleos de *Carapa guianensis* (andiroba) e *Copaifera officinalis* (copaíba) no controle de *M. fijiensis*. Para isso, isolaram-se ascósporos de folhas infectadas em meio batata dextrose ágar (BDA), pelo método indireto e preparou-se suspensão de 7.000 conídios, da qual uma alíquota foi colocada em placas de 6cm de diâmetro, juntamente com 0,3 ou 0,1mL do respectivo óleo essencial diluído em óleo vegetal inerte. Cada tratamento consistiu de 4 repetições, colocadas em BDO por 2 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Verificou-se a normalidade dos dados de cada tratamento através do teste de Shapiro-Wilk (teste W), procedendo-se em seguida a análise de variância não-paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis/Dunn, com chance de erro de 5%. Todas as soluções de óleos essenciais inibiram significativamente a germinação de conídios. De acordo com os resultados observados os óleos em ambas as diluições empregadas podem ser utilizados no controle de *M. fijiensis*. Este é o primeiro relato desses óleos no controle *in vitro* desse patógeno.

Key-words: *Carapa guianensis*, *Copaifera officinalis*, secondary metabolism, *Mycosphaerella fijiensis*

INTRODUÇÃO

Borges & Souza (2004) relataram a importância da banana por ser um dos frutos mais consumidos no mundo, cultivada na maioria dos países tropicais, podendo ser comercializada por dúzia, quilo e até mesmo unidade, consumida crua ou processada, verde ou madura. INIBAP (1994) afirmou que as bananas e os plátanos são alimentos primários para milhões de pessoas em algumas áreas do mundo, incluindo a África Central, o Sudeste Asiático, Caribe e as Américas Central e do Sul.

Somente 10%, 68 milhões de toneladas, da produção mundial de banana é voltada para a exportação anualmente, sendo os outros 90% produzidos para a subsistência. Assim a bananicultura apresenta grande importância econômica e social, sendo cultivada numa extensa região tropical, geralmente por pequenos agricultores (Fullerton & Olsen, 1995; Ploetz, 2000). Os autores ainda complementaram relatando que cerca de 98% da produção mundial ocorre em países em desenvolvimento, sendo o destino da exportação os países desenvolvidos.

Mascarenhas (1997) relatou que o Brasil é um dos maiores mercados mundiais para esse fruto, pois a banana é a segunda fruta mais consumida no Brasil, logo atrás da laranja; o consumo per capita nacional está em torno de 25 kg (Borges & Souza, 2004). Cultivada de Norte a Sul desde a faixa litorânea até os planaltos interioranos, sendo 99% da produção voltada para o consumo interno. No entanto, o IBGE (2004) afirmou que a cultura da banana apresenta baixa produtividade no Brasil, cerca de 1.200 cachos por hectare ao ano, equivalente a 12,11 t/ha/ano, enquanto a Costa Rica produz 42,03 t/ha/ano, praticamente três vezes e meia a produtividade brasileira, além do México, Índia e Colômbia com 24,09; 24,72 e 31,15 t/ha/ano, respectivamente.

As regiões mais produtivas no Brasil são a Sudeste e a Nordeste, relatam Borges & Souza (2004), e juntas representam 66% da produção nacional (6.422.855 toneladas). São Paulo é o maior produtor com 1.003.414 toneladas (AGRIANUAL, 2005).

Uma desvantagem da produção de banana é que ela está sempre sofrendo com as condições ambientais, pestes e patógenos de acordo com a variedade e cultivar (Marín et al., 2003), sendo uma planta muito suscetível a patógenos que causam grandes prejuízos à cultura.

A doença foliar mais prejudicial atualmente, no mundo, é a sigatoka-negra, que afeta a qualidade e quantidade de produção dos bananais (Cavalcante et al., 2004; Castro et al., 2005). Este patógeno foi descrito pela primeira vez em 1964 na região de Fiji, sudoeste de Viti levu, a 60 km do Vale de Sigatoka (Carlier et al., 1994; Marín et al., 2003).

Constatada no Brasil em 1998, expandiu-se rapidamente pelo país, causando prejuízos

elevados e deixando produtores e técnicos bastante preocupados, tendo em vista a alta capacidade de destruição que apresenta, adquirindo grande importância social e econômica (Gasparotto et al., 2006), sendo que o que foi descrito por Rhodes em 1964 como raia negra (Black Leaf Streak), ficaria conhecida como mal da sigatoka-negra (Crous et al., 2001).

Cordeiro et al. (2004) reportaram que o esporo assexual de *Pseudocercospora fijiensis* (conídio) está presente durante as fases de estrias ou manchas jovens da doença, onde se observam conidióforos (estrutura de produção dos conídios) saindo sozinho ou em pequeno número dos estômatos localizados na face abaxial da folha. Quanto à fase sexuada, esta é considerada mais importante no aumento da doença, sendo a forma mais comum de inoculação, uma vez que grande número de ascósporos (esporos sexuados) é produzido nos pseudotécios, que se formam, principalmente, na face superior da folha, durante as fases de pico da doença e em períodos de alta umidade e temperatura favorável (Jacome & Schuh, 1992a; Cordeiro et al., 2004).

A temperatura e a umidade relativa interferem na epidemiologia da sigatoka-negra, e Jacome & Schuh (1992a) em seus estudos comprovaram que uma média entre as observações *in vitro* e *in vivo*, de temperatura, indica que o melhor crescimento e produção de conídios estão entre 25-28°C, sendo a temperatura ótima de 26,8°C. Nessa ocorre 100% de germinação, com um período de incubação de 14-18 dias em folhas velhas ou novas. Jacome & Schuh (1992b) afirmaram que a agressividade e a virulência da doença variam de acordo com as diferenças climáticas e diferenças genéticas da população do patógeno.

A infecção ocorre nas folhas mais novas da planta, da segunda para a quarta folha, com os sintomas inicialmente observados na face abaxial, de 14 a 20 dias após a infecção, predominantemente na extremidade lateral do limbo, nas folhas 1 e 2, através de pontuações claras ou áreas despigmentadas. Essas pontuações tornam-se estrias de cor marrom com 1-2mm de largura, podendo ser vistas também na face adaxial da folha. A partir desta fase as estrias alongam-se radialmente e apresentam coloração marrom-escura na face abaxial, assumindo assim, a forma de manchas irregulares. Estas por sua vez, tornam-se negras, dando à folha aspecto enegrecido, o que caracteriza o nome da doença. Em estádios mais avançados das manchas negras, inicia-se o processo de morte prematura de todo o limbo foliar, a partir da borda; estas necroses advêm das lesões iniciais. Geralmente, devido à alta taxa de infecções o coalescimento deste patógeno ocorre ainda na fase de estria, o que pode impossibilitar a formação de um halo amarelo ao redor das lesões, o que provoca confusão com a sigatoka-amarela. Após a morte foliar, com coloração cinza-palha podem ser observadas na face adaxial pontuações escuras representadas pelos peritécios. A infecção das folhas da bananeira por

conídios de sigatoka-negra é observada em três períodos durante a inoculação. Em geral, as estrias marrons são observadas primeiramente de 14-21 dias depois da inoculação e após 28 dias, verificam-se manchas (Jacome & Schuh, 1992a; Mourichon et al., 1997; Marín et al., 2003; Cordeiro et al., 2004; Gasparotto et al., 2006). Hoss et al. (2000) relataram que a estabilização do patógeno ocorre de 3 a 4 semanas em folhas de cultivares suscetíveis, após a penetração no estômato até os sintomas de necrose aparecerem.

Fouré (1994) referiu que as lesões nas folhas atacadas evoluem para necroses fazendo com que haja queda na produção fotossintética, pois há morte do tecido fotossintetizante, o que demonstra a severidade da doença. Cordeiro et al. (2004) relataram que isto ocorre devido à rápida destruição da área foliar e são sentidos na redução da capacidade produtiva do bananal (Jacome & Schuh, 1992c; Fouré, 1994; Martín et al., 2003; Jimenez et al., 2007). Que é comprovado quando Vicente (1998), Balint-Kurti et al. (2001) e Calvacante et al. (2004) referiram que a necrose causada pela sigatoka-negra resulta em perda estimada de 33 - 50% na produção, por causar morte precoce das folhas.

No Acre, a produção do subgrupo Terra (AAB) é severamente atacada (Cavalcante et al., 2004), enquanto que no Estado de Minas Gerais a doença é mais agressiva para as cultivares Prata, Prata Anã e Cavendish (Ploetz, 2000; Cordeiro et al., 2004). Cavalcante et al. (1999) relataram que a sigatoka-negra causa grandes problemas nos cultivos das cultivares Maçã, Prata e D'angola (Comprida subgrupo Terra), todas suscetíveis à doença.

Cavalcante et al. (2004) afirmaram que em dois anos (1997-1999) o volume de produção em cacho cresceu 61% nos mercados do Amazonas, Rondônia, Mato Grosso e Goiás, no entanto, o período de 2000-2001 foi marcado por declínio de 42% na produção do estado, provavelmente devido à sigatoka-negra.

De acordo com Burt (2002) pode-se utilizar fungicidas para o controle de sigatoka-negra, mas isto mesmo pode onerar os custos dos pequenos produtores e causar prejuízos ao meio ambiente. Ploetz (2000) reportou que em Camarões ocorrem de 10 a 14 aplicações anuais, mas para a América Tropical esse número pode variar de 35-45 vezes. O mesmo autor advogou que sem o uso freqüente de fungicidas não se pode ter um controle da sigatoka-negra o que acarreta perda de qualidade dos frutos e menor preço de mercado. Bastos & Albuquerque (2004) relataram que a restrição ao uso de fungicidas, devido à fitotoxicidade, efeitos residuais, espectro de ação e resistência pelo patógeno, tem levado à procura de métodos alternativos de controle tais como: uso de biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais. Diversos estudos comprovam o potencial de plantas medicinais no controle de fitopatógenos tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela

capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas, o que torna os óleos essenciais, fungicidas naturais.

Assim, este trabalho teve como objetivo a aplicação de óleos essenciais de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e copaíba (*Copaifera officinalis* L.) como alternativa para o controle de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (agente etiológico da sigatoka-negra) de banana.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos laboratórios do Campus Experimental do Litoral Paulista – Unidade São Vicente, UNESP.

Obtenção do patógeno

O método de incubação do patógeno utilizado foi o de Hanada et al. (2002), modificado. Foram utilizadas folhas de bananeiras, apresentando sintomas da doença, provenientes da área de Registro (SP). Pelo método indireto as estruturas reprodutivas do patógeno foram transferidas para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) e cloranfenicol a 250 mg L⁻¹. Culturas de *M. fijiensis*, crescidas em placa de Petri contendo meio de BDA, com 15 dias de incubação a 25°C ± 2°C no escuro, foram empregadas para multiplicação do inóculo.

Obtenção do óleo vegetal

Os óleos empregados nestes ensaios foram o de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e copaíba (*Copaifera officinalis* L.), provenientes da Phytoterápica (CNPJ: 68.244.839/001-09).

Montagem do Experimento

Empregou-se os óleos essenciais de *Carapa guianensis* Aubl. e *Copaifera officinalis* L. para a avaliação de controle *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet em diluições de 0,1 e 0,3 mL em óleo vegetal. De acordo com Pereira et al. (2006) o método utilizado foi o bioanalítico *in vitro* observando-se o desenvolvimento ou inibição dos microorganismos em diferentes concentrações dos óleos, usando-se o meio de cultura BDA, apropriado para o desenvolvimento desse fungo. Preparou-se uma suspensão de 7.000 conídios mL⁻¹ a partir dos fungos já isolados, que foi filtrada em camada dupla de gaze para retenção de fragmentos miceliais e de meio de cultura. Uma alíquota de 1,0 mL da suspensão foi colocada em cada placa de Petri, com 6 cm de diâmetro, contendo 5 mL de meio de cultura BDA e o respectivo óleo em suas devidas diluições. As placas foram colocadas em regime de luz continua a 25°C ± 2°C por duas horas em estufa de demanda biológica de oxigênio (BDO).

Medidas realizadas

Os conídios foram observados após 2 horas em BDO, com o auxílio de microscópio de luz.

Dividiu-se cada placa em quatro quadrantes e contou-se 25 conídios entre germinados e não germinados de modo a totalizar 100 conídios por placa, casualizadamente.

Delineamento Experimental

O experimento foi montado num esquema inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 4 repetições. Verificou-se a normalidade dos dados de cada tratamento através do teste de Shapiro-Wilk (teste W), procedendo-se em seguida a análise de variância não-paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis/Dunn, com chance de erro de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 indica a percentagem de conídios não germinados nos diferentes tratamentos.

Tabela 1. Porcentagem de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet não germinados em meio contendo óleos essenciais de andiroba e copaíba.

Testemunha	Andiroba 0,1 mL	Andiroba 0,3 mL	Copaíba 0,1 mL	Copaíba 0,3 mL
5,67%	93%	87,7%	83,3%	81%

Verificou-se pela normalidade dos dados de cada tratamento pelo teste Shapiro-Wilk (teste W) que as amostras da Testemunha, Andiroba 0,1 mL e Copaíba 0,1 mL eram não paramétricas. Deste modo, procedeu-se à análise de variância não-paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis/Dunn, cujos resultados estão representados na Figura 1.

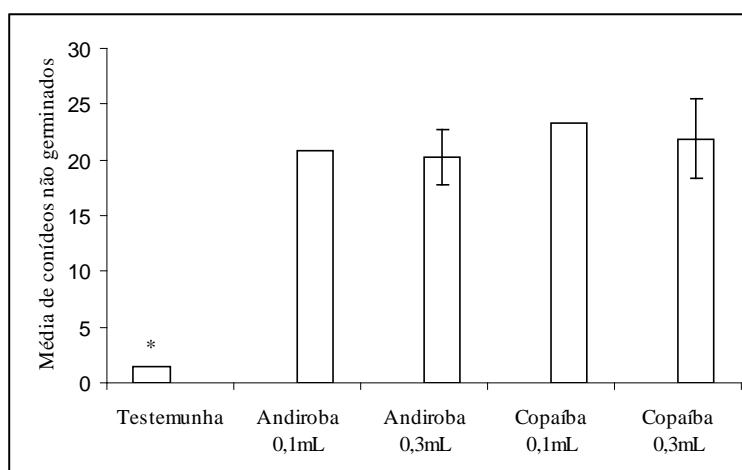


Figura 1. Número médio de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet não germinados em meio contendo óleos essenciais de andiroba e copaíba.

Pode-se observar que todas as soluções de óleos essenciais inibiram significativamente a germinação de conídios, não apresentando diferença significativa entre os tipos de óleos essenciais utilizados.

Singh et al. (1980) relataram que os óleos essenciais tem apresentado bons componentes antifúngicos, o que foi comprovado por Wilson et al. (1997) quando referiram que extratos de plantas e óleos essenciais mostraram atividade antifúngica em uma grande variedade de fungos.

O óleo essencial de andiroba apresenta em sua composição, segundo o fabricante, oleína, palmitina e glicerina. Ambrozin et al. (2006) constataram em seus estudos que esse óleo é composto por sete diferentes limonóides. Os autores ainda relataram que a toxicidade observada em extratos de sementes de andiroba não estaria relacionada com a presença dos limonóides. Na literatura encontram-se diversas referências sobre a ação inseticida e/ou repelente de *Carapa guinensis* (Miot et al., 2004; Ambrozin et al., 2006; Coitinho et al., 2006; Freire et al., 2006). Parcker & Luz (2007) ao referirem que apesar das referências na literatura, em seus ensaios os resultados encontrados não foram satisfatórios para as cepas por eles empregadas. Os mesmos resultados foram encontrados quando os autores testaram os óleos de copaíba e alho.

O óleo essencial de copaíba tem como princípios ativos o ácido copaívico, α -cubeno, β -cariofileno e α -humuleno, segundo o fabricante. De acordo com Veiga Júnior & Pinto (2002) o óleo de *Copaifera officinalis* é composto por sesquiterpeno, o ácido copálico. Sant' Anna et al. (2007) reportaram que esse óleo ainda contém δ -cadineno (1,9%), δ -cadinol (0,9%), óxido de cariofileno (0,2%), (Z)- α -santalol (0,2%), α -cadinol (0,1%) e τ -muurolol. Veiga Júnior & Pinto (2002) referiram que na região Amazônica o uso do óleo de copaíba é extensivo sendo utilizada por toda a população, podendo ser encontrada em mercados populares. Fleury (1997) citado por Veiga Júnior & Pinto (2002), afirmaram a atividade desse óleo contra psoríase, leishmaniose e como cicatrizante e antiinflamatório e Coitinho et al. (2006) comprovaram que esse óleo tem ação larvicida/ovicida sobre *Sitophilus zeamais*, um coleóptera, enquanto Freire et al. (2006) comentaram sobre sua atividade em forídeo.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os óleos essenciais de andiroba e copaíba, em suas diluições, aplicados sobre conídios de *M. fijiensis* inibem sua germinação, portanto, pode-se optar pelo uso destes, com custo menor, na época da aplicação, em sua menor diluição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL (2003) Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos. pp 229-232.

Ambrozin ARP, Leite AC, Bueno FC, Vieira PC, Fernandes JB, Bueno OC, Silva MFGF, Pagnocca FC, Hebling MJA, Bacci JR M (2006) Limoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. J. Braz. Chem. Soc. 17: 542-547.

Balint-Kurti PJ, May GD, Churchill ACL (2001) Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. FEMS Microbiology Letters. 195: 9-15.

Bastos CN, Albuquerque PSB (2004) Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. Fitopatol. bras. 29: 555-557.

Borges AL, Souza LS (2004) O cultivo da bananeira. 1º ed. Embrapa, Cruz das Almas.

Burt PJA, Rosenberg, LJ, Rutter GJ, Ramirez F, Gonzales H (2002) Forecasting the airborne spread of *Mycosphaerella fijiensis*, a cause of black Sigatoka disease on banana: estimations of numbers of perithecia and ascospores. Ann. Appl. Biol. 135: 369-377.

Calvacante MJB, Sá CP, Gomes FCR, Godim TMS, Cordeiro ZJM, Hessel JL (2004) Distribuição e impacto da sigatoka-negra na bananicultura do Estado do Acre. Fitopatol. Bras. 29: 544-548.

Carlier J, Mourichon X, Gonzáles-de-Léon D, Zapater MF, Lebrun MH (1994) DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. Phytopathology. 84: 751-756.

Castro MEA, Pereira JCR, Gasparotto L (2005) Primeiro relato de ocorrência da sigatoka-negra em Minas Gerais. Fitopatol. Bras. 30: 668-668.

Coitinho RLBC, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Câmara CAG (2006) Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. Rev. Caatinga. 19: 176-182.

Cordeiro ZJM, Matos AP, Meissner Filho PE (2004) Doenças de métodos de controle. In: Borges AL, Souza LS (eds), O cultivo da bananeira, pp. 146-182. Embrapa, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Crous PW, Kang JC (2001) A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on its rDNA sequence and morphology. Mycologia. 93: 1081-1101.

Fullerton RA, Olsen TL (1995) Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. New Zealand J. Crop Hortic. Scic. 23: 39-48.

Fouré E (1994) Leaf spot diseases of banana and plantain caused by *Mycosphaerella musicula* and *M. fijiensis*. Annals: International Network for the Improvement of Banana and Plantain. 1: 37-46.

Freire DCB, Brito-Filha CRC, Carvalho-Zilse GA (2006) Efeito dos óleos vegetais de andiroba

(*Carapa* sp.) e copíba (*Copaiifera* sp.) sobre forídeo, pragas de colméias, (Dipetera Pharidae) na Amazônia central. Acta Amazonica. 36: 365-368.

Gasparotto L, Pereira JCR, Hanada RE, Montarroyos AVV (2006) Sigatoka-negra da banana. 1º ed. Embrapa, Manaus.

Hanada RE, Gasparotto L, Pereira JC (2002) Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. Fitopato. Bras. 27: 170-173.

Hoss R, Helbig J, Bochow H (2000) Function of host and fungal metabolites in response of banana and plantain in the black sigatoka disease pathosystem (Imusa Ispp. - *Mycosphaerella fijiensis*). Phytopathology. 148: 387-394.

IBGE (2004) Produção Agrícola Municipal. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acessado em: 15 nov. 2008.

INIBAP (1994) The improvement and testing of Musa: a global partnership. Parc Scientifique Agropolis. Honduras.

Jacome LH, Schuh W (1992a) Effect of temperature on growth and conidial production *in vitro*, and comparison of infection and aggressiveness *in vivo* among isolates of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Trop. Agric. 70: 51-59.

Jacome LH, Schuh W (1992b) Spore production and artificial inoculation techniques for *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Trop. Agric. 70: 33-38.

Jacome LH, Schuh W (1992c) Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Phytopathology. 80: 515-520.

Jimenez M, Veken LV, Neiryck H, Rodríguez H, Ruiz O, Swennen R (2007) Organic banana production in Ecuador: its implications on black sigatoka development and plant-soil nutritional status. Renew. agricul. food syst. 22: 297-306.

Marín DH, Romero RA, Guzmán M, Sutton TB (2003) Black sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. Plant Dis. 87: 208-222.

Miot HA, Bastistella RF, Batista KA, Volpato DEC, Augusto LST, Madeira NG, Haddad V, Miot LDB (2004) Comparative study of the topical effectiveness of the andiroba oil (*Carapa guianensis*) and deet 50% as repellent for *Aedes* sp. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 46: 253-256.

Mourichon X, Carlier J, Fouré E (1997) Sigatoka leaf spot diseases. Annals: International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Parc Scientifique Agropolis II. France, pp.4.

Packer JF, Luz MMS (2007) Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. Rev. bras. farmacogn. 17: 102-107.

- Pereira MC, Vilela GR, Costa LMAS, Silvia RF, Fernandes AF, Fonseca EW, Picoli RH (2006) Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. Cien. Agrotec. 30: 731-738.
- Ploetz R (2000) Black sigatoka. Pesticide outlook. 1: 19-23.
- Sant' Anna, BMP, Fontes SP, Pinto AC, Rezende CM (2007) Characterization of wood odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). Journal Brazilian Chemical Society 18: 984-989.
- Singh AK, Dickshit A, Sharma ML, Dixit SN (1980) Fungitoxic activity of some essential oils. Econ. Bot. 34: 186-190.
- Veiga Junior VF, Pinto AC (2002) O gênero *Copaifera* L. Quim. Nova. 25: 273-286.
- Vicente LP (1998) Black sigatoka disease control in banana and plantain plantations in Cuba. InfoMusa. 7: 27-30.
- Wilson CL, Solar JM, Ghaouth AEL, Wisniewski ME (1997) Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 81: 2004-210.

CAPITULO II

Óleos essenciais de cravo, eucalipto e tomilho no controle de sigatoka-negra de bananeira

Bianca Regina da Hora, Elizabeth Orika Ono & Selma Dzimidas Rodrigues

Resumo

O Brasil é um dos maiores mercados produtores de banana, a segunda fruta mais consumida no país e o quarto alimento mais importante do mundo. Sua produção tem sido drasticamente prejudicada, principalmente, devido ao patógeno *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente etiológico da sigatoka-negra. O controle atual deste fungo emprega grandes quantidades de agroquímicos, o que onera a produção, contamina o meio ambiente, lesa a saúde do aplicador e dificulta a exportação. A aplicação de óleos essenciais no combate de patógenos tem apresentado resultados positivos em outras culturas e é uma alternativa desejável para o cultivo do fruto, sendo de baixo custo e utiliza compostos biodegradáveis. Este trabalho aplicou óleos essenciais de cravo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry), eucalipto (*Eucalypto globulus* Labill.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em diluições de 1 mL com 10 ou 30% de óleo essencial em óleo vegetal inerte para avaliar o potencial de inibir a germinação de conídios *in vitro*. Para tanto, prepararam-se suspensão de 7000 conídios mL⁻¹, da qual alíquotas de 1mL foram aplicadas em placas de Petri com meio BDA, juntamente com as respectivas diluições de óleos essenciais ou 1mL de óleo vegetal para a testemunha. Utilizaram-se quatro repetições por tratamento e contou-se aleatoriamente 100 conídios por placa, entre germinados e não germinados. Os tratamentos com óleos de cravo e de eucalipto mostraram-se igualmente eficazes, em ambas as diluições, na inibição da germinação dos conídios. Este trabalho é o primeiro na utilização desses óleos na inibição da germinação de *M. fijiensis*.

Palavras-chave adicionais: *Thymus vulgaris*, *Eucalypto globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Mycosphaerella fijiensis*, controle orgânico, fungicida.

Abstract

Brazil is one of the biggest banana producer, the second most consumed fruit in this country and the fourth most important food worldwide. Its production has been drastically harmed mainly because of the *Mycosphaerella fijiensis* Morelet pathogen, the causal agent of black Sigatoka disease. The current control of this fungus applies great amounts of agrochemicals witch burdens the production, contaminates the environment, injures the applicator's health and makes the

product difficult to export. The application of essential oils against the pathogens has presented positive results in other cultures and is a desirable alternative for the culture of this fruit for being cheap and biodegradable. This work applied essential oils of clove (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry), eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) in 1,0mL dilutions with 10 or 30% of essential oil in inert vegetable oil to evaluate the conidial inhibition potential *in vitro*. So, 7000 conidia/mL suspension was prepared, taking 1mL aliquots of essential oils dilutions or 1mL of vegetable oil for control were placed in PDA media. Three repetitions of each treatment were made and 100 conidia per plate were randomly counted considering germinated and not germinated ones. The results of clove and eucalyptus oils revealed to be equally efficient, in both dilutions, to inhibit conidial germination. This is the first report on fungicidal activity of this essential oils against *M. fijiensis*.

Key-words: *Thymus vulgaris*, *Eucalypto globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Mycosphaerella fijiensis*, organic control

Introdução

Devido aos seus teores energéticos a bananeira é cultivada em todas as regiões tropicais do mundo, sendo a banana a fruta de maior produção e comercialização mundial (Gasparotto et al., 2006).

Mascarenhas (1997) relatou que o Brasil é um dos maiores mercados mundiais desse fruto, pois a banana é o segundo fruto mais consumida no Brasil, logo atrás da laranja, estando o consumo per capita nacional em torno de 25 kg (Borges & Souza, 2004). Cultivada de Norte a Sul do país, totalizando uma área de 503 mil hectares em 2002, compreendida da faixa litorânea até os planaltos interioranos, 99% da produção está voltada para o consumo interno. Borges & Souza (2004) apontaram que as regiões mais produtivas no Brasil são a Sudeste e a Nordeste, que juntas representam 66% da produção nacional (6.422.855 toneladas). São Paulo é o maior produtor com 1.003.414 toneladas, seguido da Bahia, com 625.933 toneladas, Pará, com 567.084 toneladas e Minas Gerais com 541.101 toneladas (AGRIANUAL, 2005). O responsável pela maior produção no Estado de São Paulo é o Vale do Ribeira.

Uma desvantagem da produção de banana, relatam Marín et al. (2003) é que ela está sempre sofrendo com as condições ambientais, pestes e patógenos de acordo com a variedade ou cultivar. Prova disso foi a forte queda na produção brasileira ocorrida em 2000, devido às doenças foliares. A doença foliar considerada, atualmente, a mais prejudicial à cultura, causando problemas à produção comercial de banana em todos os continentes, é a sigatoka-negra (Orozco-Santos & Farias-Larios, 2002), que foi constatada no Brasil em 1998 no Estado do Amazonas (Cordeiro et al., 1998), sendo disseminada para outros estados em menos de 10 anos, pois em 2006 já estava presente em quase todo o território brasileiro a saber: Amazonas, Pará, Roraima, Amapá, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Gasparotto et al., 2006).

A sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, tendo como forma anamórfica *Pseudocercospora fijiensis* Deighton, apresenta como fatores chaves para a inoculação e rápido desenvolvimento a temperatura, bem como a frequência de chuva (Porrás & Pérez, 1997). 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 chuva. Os principais sintomas da doença, segundo Gasparotto et al. (2006), são: (1) descoloração ou pontos despigmentados na face abaxial das folhas 1 e 2; (2) estrias marrom-claras, de 2 a 3 mm de comprimento; (3) expansão radial e longitudinal das estrias que se tornam visíveis nas duas faces da folha; (4) a estria adquire

coloração marrom-escura e aspecto de manchas de formato irregular; (5) as manchas adquirem coloração marrom-escura a negra e (6) as manchas coalescem induzindo a morte prematura do limbo.

A forma principal de disseminação de *M. fijiensis* é pelo vento (Craenen & Ortiz, 1997), no entanto Hanada et al. (2002a) advogaram que além do vento as mudas doentes e as folhas infectadas, utilizadas para a proteção do fruto enquanto é transportado, também constituem uma forma de dispersão. Os autores afirmaram, ainda, que os esporos do patógeno permanecem viáveis nas folhas e tecidos de algodão por 60 dias, em papelão, madeira, plástico e pneu por 30 dias e 18 dias em frutos maduros.

Cavalcante et al. (2004) relataram que em dois anos (1997-1999) o volume de produção em cacho cresceu 61% nos mercados do Amazonas, Rondônia, Mato Grosso e Goiás, no entanto, o período de 2000-2001 foi marcado por declínio de 42% na produção do estado, provavelmente devido à sigatoka-negra. Faturete et al. (2007) referiram que estudos são necessários para guiarem as novas descobertas e atividades de desenvolvimento para que a produção de bananas aumente, diminuindo assim, queda na produção.

Com a restrição ao uso de fungicidas, devido à fitotoxicidade, efeitos residuais, espectro de ação e resistência ao patógeno, Bastos & Albuquerque (2004) relataram que aumentou a procura de métodos alternativos de controle, tais como uso de biofungicidas, extratos vegetais e óleos essenciais. Diversos estudos comprovam o potencial das plantas medicinais no controle de fitopatógenos tanto por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, quanto pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas (Stangarlin et al., 1999). O entendimento das propriedades antimicrobianas e/ou elicitoras dos compostos secundários presentes em plantas medicinais podem contribuir para a aquisição de novas técnicas de controle de doenças de plantas (Bonaldo et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi verificar a ação dos óleos de *Eucalyptus globulus* Labill. (eucalipto), *Eugenia caryophyllus* Spreng. (cravo) e *Thymus vulgaris* L.(tomilho) *in vitro* no controle de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nos laboratórios do Campus Experimental do Litoral Paulista - Unidade São Vicente, UNESP.

Obtenção do patógeno

Utilizou-se o método de Hanada (2002b), modificado, para incubação do patógeno. Obteveram-se folhas de bananeiras, proveniente dos municípios de São Vicente (SP), apresentando sintomas da doença. Pelo método indireto as estruturas reprodutivas do patógeno foram transferidas para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) e cloranfenicol 250 mg L⁻¹. Culturas de *M. fijiensis*, crescidas em placa de Petri contendo meio BDA com 15 dias de incubação a 25°C ± 2°C no escuro, foram utilizadas para a multiplicação de inóculo.

Obtenção do óleo vegetal

Os óleos empregados nestes ensaios foram *Eucalyptus globulus* Labill. (eucalipto), *Eugenia caryophyllus* Spreng. (cravo) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho) provenientes da empresa By Samia (CNPJ: 61.610.515/0001-06).

Montagem do Experimento

Empregou-se os óleos essenciais de eucalipto, cravo e tomilho para avaliação do controle *in vitro* de *M. fijiensis* Morelet em diluições de 0,1 e 0,3 mL de óleo essencial por 0,9 e 0,7 mL de óleo vegetal inerte, respectivamente.

De acordo com Pereira et al. (2006) o método utilizado foi o bioanalítico *in vitro* observando o desenvolvimento ou inibição dos microorganismos em diferentes concentrações dos óleos usando o meio de cultura BDA, apropriado para o desenvolvimento desses fungos. Preparou-se suspensão de 7.000 conídios mL⁻¹ a partir dos fungos já isolados, que foi filtrada em camada dupla de gaze para retenção de fragmentos miceliais e restos de meio de cultura. Da suspensão, uma alíquota de 1,0 mL foi colocada em cada placa de Petri, com 6 cm de diâmetro, contendo 5 mL meio de cultura BDA e o respectivo óleo, de acordo com o tratamento. A testemunha foi identificada por Te e os tratamentos foram codificados com as iniciais, Cr, Eu ou To, dos óleos essenciais empregados seguidos pela sua quantidade em mL na diluição em óleo vegetal (0,1 ou 0,3). As placas foram colocadas em regime de luz contínua a 25°C ± 2°C por duas horas em estufa de demanda biológica de oxigênio (BDO).

Medidas realizadas

Os conídios foram observados após 2 horas em BDO, de acordo com o descrito acima, com o auxílio de microscópio de luz. Cada placa foi dividida em quatro quadrantes e contou-se 25 conídios entre germinados e não germinados de modo a totalizar 100 conídios por placa, casualizadamente.

Delineamento Experimental

O experimento foi montado num esquema inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 4 repetições. Verificou-se a normalidade dos dados de cada tratamento através do teste de Shapiro-Wilk (teste W), procedendo-se em seguida a análise de variância não-paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis/Dunn, com chance de erro de 5%.

Resultados

A Tabela 1 indica a porcentagem de conídios não germinados nos diferentes tratamentos.

TABELA 1- Porcentagem de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet não germinados em meio contendo óleos essenciais de cravo (Cr), eucalipto (Eu) e tomilho (To).

	Cr 0,1		Eu 0,1				
Testemunha	mL	Cr 0,3 mL	mL	Eu 0,3 mL	To 0,1 mL	To 0,3 mL	
	5,67%	92,67%	91,67%	92,67%	90,33%	86,33%	85%

Verificando-se a normalidade dos dados de cada tratamento pelo teste Shapiro-Wilk (teste W) constatou-se que apenas o tratamento com o óleo essencial de cravo a 0,3 mL era paramétrica. Desse modo, procedeu-se a análise de variância não-paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis/Dunn, cujos resultados estão representados na Figura 1.

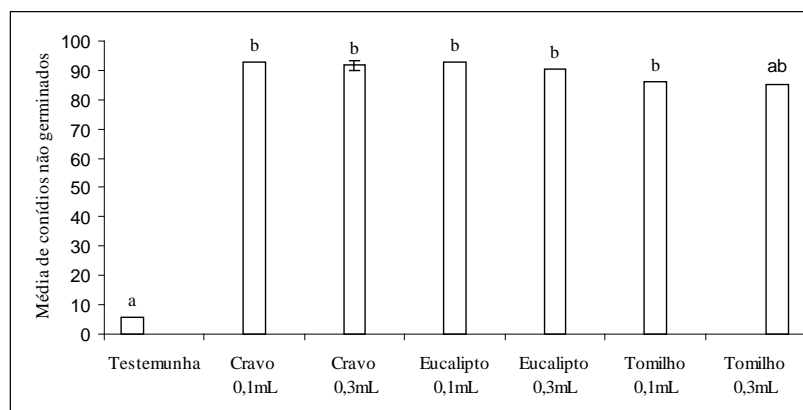


Figura 1. Número médio de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet não germinados em meio contendo óleos essenciais de cravo, eucalipto e tomilho.

As soluções de óleos essenciais testadas, exceto tomilho a 0,3 mL, inibiram significativamente a germinação de conídios. Não foi verificada diferença significativa entre os diferentes óleos essenciais testados e a diluição no potencial de inibição da germinação de conídios.

Apenas, o tratamento com o óleo essencial de tomilho a 0,3 mL não levou à inibição na germinação de conídios de *M. fijiensis* Morelet, o que indica uma possível ação dose-dependente, cuja avaliação necessita de futuras investigações, sendo imperativa para determinar o potencial desse óleo no controle desse fitopatógeno.

Discussão

Cosentino et al. (1999) constataram que os principais componentes do óleo essencial de *Thymus* são monoterpênicos e monoterpênicos fenólicos apresentando atividade antimicrobiana comprovada, bem como timol como afirma o fabricante. Wilson et al. (1997) relataram que o óleo de *T. vulgaris* apresentou ação antifúngica no controle de esporos de *Botrytis cinerea* e Ji et al. (2005) utilizaram em seus experimentos concentrações de 0,7% de tomilho no controle de *Ralstonia solanacearum* em tomate, encontrando resultados favoráveis, semelhantes aos obtidos por Medice et al. (2007) quando empregaram concentrações de 0,3%, além do murchamento de uridiniósporos de *Phakopsora pachyrhizi*.

Os óleos de eucalipto e cravo, nas suas duas diluições empregadas mostraram-se igualmente eficazes. Segundo o fabricante, o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* tem como composto principal o cineol (70-80%), bem como pineno, limoneno, globulol, citronelal, fencheno e felandreno. Estanislau et al. (2001) confirmaram que esses compostos estão presentes no gênero *Eucalyptus* e que algumas espécies mostraram atividade antimicrobiana em seus experimentos. Fior et al. (2000) comprovaram que o óleo inibiu o crescimento de *Didymella bryoniae*, enquanto Salgado et al. (2003) avaliaram a atividade antifúngica em *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana* encontrando resultados positivos. Crous et al. (2006) observaram os mesmos resultados ao aplicarem sobre os fungos *Cladriella eucalypti* e *Fulvoflamma eucalypti*.

Já o óleo essencial de cravo, de acordo com o fabricante, é composto por eugenol, cariofileno, acetato de eugenil, pineno, acetato de eugenila, salicato de metila, furfurool e chavical, sendo que Bowers & Locke (2000; 2004) investigando um método de controle para *Fusarium oxysporum* e *Phytophthora nicotianae* constataram que esse óleo é uma estratégia no controle desses patógenos, causando redução de quase 100% no segundo. Chalfoun et al. (2004) verificaram que o óleo de cravo inibiu totalmente o desenvolvimento micelial de *Rhizophus* sp,

Penicillium sp, *Eurotium repens* e *Aspergillus niger*.

O único componente presente em mais de um dos óleos essenciais aqui estudados é o pineno, encontrado em cravo e eucalipto, cuja ação larvicida é referida por Prates et al. (1998). Desse modo, é bastante provável que efeitos inibitórios comprovados neste trabalho devam-se à ação semelhante de compostos orgânicos distintos.

Para se obter o controle na disseminação do patógeno, ambos os óleos, de cravo ou eucalipto, provavelmente apresentarão igual eficiência, podendo-se optar por aquele que for mais acessível. A aplicação desses óleos em culturas de bananeiras exige ainda testes para comprovação da eficiência *in vivo*. Este trabalho é o primeiro na utilização desses óleos na inibição da germinação de conídios de *M. fijiensis*.

Referências Bibliográficas

- AGRIANUAL. Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos. 2003. pp229-232.
- BASTOS, C.N. & ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de Piper aduncum no controle em pós-colheita de Colletotricum musae em banana. **Fitopatologia Brasileira** 29:555-557. 2004.
- BONALDO, S.M., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, TESSMANN, D.J. & SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra Colletotrichum lagenarium, pelo extrato aquoso de Eucalyptus citriodora. **Fitopatologia Brasileira** 29:129-134. 2004.
- BORGES, A.L. & SOUZA, L.S. (Eds.) O cultivo da bananeira. 1º. Ed. Embrapa, Cruz das Almas. 2004.
- BOWERS, J.H. & LOCKE, J.C. Effect of botanical extracts on the population density of Fusarium oxysporum in soil and control of Fusarium wilt in the greenhouse. **Plant Disease** 84:300-305. 2000.
- BOWERS, J.H. & LOCKER, J.C. Effect of formulated plant extracts and oils on population density of Phytophthora nicotianae in soil and control of phytophthora blight in the greenhouse. **Plant Disease** 88:11-16. 2004.
- CALVACANTE, M.J.B., Sá, C.P., GOMES, F.C.R., GODIM, T.M.S., CORDEIRO, Z.J.M. & HESSEL, J.L. Distribuição e impacto da sigatoka-negra na bananicultura do Estado do Acre. **Fitopatologia Brasileira** 29:544-548. 2004.
- CHALFOUN, S.M., PEREIRA, M.C., RESENDE, M.L., LANGÉLICO, C.L. & SILVA, R.A. Efeito de tratamentos com condimentos em pó sobre o crescimento micelial, esporulação e produção de aflatoxinas por fungos toxigênicos. **Ciência Agrotécnica** 28:856-862. 2004.

- CONSENTINO, S., TUBEROSO, C.I.G., PISANO, B., SATTA, M., MASCIA, V., ARZEDI, E. & PALMAS, F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology** 29:130-135. 1999.
- CRAENEN, K. & ORTIZ, R. Effect of the *bs1* gene in plantain-banana hybrids on response to black sigatoka. **Theoretical Applied Genetics** 95:497-505. 1997.
- CROUS, P.W., VERKLEY, G.J.M. & GROENEWALD, J.Z. Eucalyptus microfungi known from culture. 1. Cladoriella and Fulvoflamma genera nova, with notes on some other poorly known taxa. **Studies in Mycology** 55:53-63. 2006.
- ESTANISLAU, A.A., BARROS, F.A.S., PEÑA, A.P., SANTOS, S.C., FERRI, P.H. & PAULA, J.R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de Eucalyptus cultivadas em Goiás. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 11:95-100. 2001.
- FATUROTE, B.O., MADUKWE, M.C., TENKOUANO, A. & AGWU, A.E. A review of policy acts and initiatives in plantain and banana innovation system in Nigeria. **African Journal of Biotechnology** 6:2297-2302. 2007.
- FIOR, A.C.G., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., VIDA, J.B., SCAPIM, C.A., CRUZ, M.E.S. & PASCHOLATI, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. **Journal Phytopathology** 148:483-487. 2000.
- FLORI, J.E., RESENDE, G.M. & PAIVA, L.E. Produção de bananeira 'Grande Naine' superadensada e irrigada no Vale do São Francisco. **Ciência e Agrotecnologia** 28:1060-1065. 1995.
- GASPAROTTO, L., PEREIRA, J.C.R., HANADA, R.E. & MONTARRYOS, A.V.V. Sigatoka-negra da banana. 1º. Ed. Embrapa. Manaus. 2006.
- GONÇALVES V.D. Interplântio de variedades de bananeira com prática de controle de sigatoka. Dissertação de Mestrado. Jaboticabal SP. Universidade Estadual Paulista. 2006.
- HANADA, R.E., GASPAROTTO, L. & PEREIRA, J.C. Sobrevivência de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes materiais. **Fitopatologia Brasileira** 27:408-411. 2002a.
- HANADA, R.E., GASPAROTTO, L. & PEREIRA, J.C. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. **Fitopatologia Brasileira** 27:170-173 2002b.
- JI, P., MOMOL, M.T., OLSON, S.M. & PRADHANANG, P.M. Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. **Plant Disease** 89:497-500. 2005.
- MARÍM, D.H., ROMERO, R.A., GUZMÁN, M. & SUTTON, T.B. Black sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. **Plant Disease** 87:208-222. 2003.

MASCARENHAS, G. Análise do mercado brasileiro da banana; Preços agrícolas 1:4-15. 1997.

MEDICE, R., ALVES, E., ASSIS, R.T., MAGNO JÚNIOR, R.G., LOPES, E.A.G, MASCARANHAS L. Óleos essenciais no controle de ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. **Ciência Agrotécnica** 31:83-90. 2007.

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.

OROZCO-SANTOS, M. y FARÍAS-LARIOS, J. Efecto del Pyraclostrobin sobre el control de sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Memorias de la XV Reunión ACORBAT 2002. Cartagena de Indias, Colombia. p. 243-248.

PEREIRA, M.C., VILELA, G.R., COSTA, L.M.A.S, SILVIA, R.F., FERNANDES, A.F., FONSECA, E.W. & PICOLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências Agrotécnica** 30:731-738. 2006.

PLOETZ, R. Black sigatoka. **Pesticide outlook** 1:19-23. 2000.

PORRAS, A. & PÉREZ, L. The role of temper ature in the growth of the germ tubes of ascospores of *Mycosphaerella fijiensis* spp., responsible for leaf spot diseases of banana. Estimation of their rate of development for diagnosis and treatment using daily minimum and maximum temperatures in Cuba. **INFO- MUSA** 6:27-32. 1997.

PRATES, H.T., LEITE, R.C., CRAVEIRO, A.A. & OLIVEIRA, A.B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal Brazilian Chemical Society** 9:193-197. 1998.

ROMERO, R.A., & SUTTON, T.B. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black sigatoka of banana, in Costa Rica. **Plant Disease** 82:931-934. 1998.

SALGADO, A.P.S.P., CARDOSO, M.G., SOUZA, P.E., SOUZA, J.A., ABREU, C.M. & PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folha de Eucalyptus sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência Agrotécnica** 27:249-254. 2003.

STANGARLIN, J.R., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., CRUZ, M.E.S. & NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 11:16-21. 1999.

WILSON, C.L., SOLAR, J.M., EL GHAOUTH, A. & WISNIEWSKI, M.E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease** 81:204-210. 1997.

CAPITULO III

Influência do meio de cultura no crescimento micelial de

Mycosphaerella fijiensis Morelet

Bianca Regina da Hora, Selma Dzimidas Rodrigues & Elizabeth Orika Ono

Resumo

A bananicultura apresenta certa desvantagem em seu cultivo, pois está sempre sofrendo com condições ambientais, pestes e patógenos de acordo com a variedade ou cultivar. Dentre elas a que mais vem causando grandes prejuízos no mundo é a sigatoka-negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Estudos visando encontrar o melhor meio de cultura para o crescimento micelial e esporulação de fungos são essenciais para estudos do controle de patógenos e assim este trabalho objetivou estudar meios alternativos para o crescimento micelial de *M. fijiensis*. Para isso utilizou-se o método indireto de inoculação, em placas de Petri contendo meio batata dextrose Agar (BDA) e cloranfenicol, a partir de folhas com sintomas da doença. Das colônias provenientes dessa inoculação transferiram-se fragmentos para placas contendo meio farinha de aveia-sacarose (FAS), farinha de aveia-ágar (FAA) e BDA, cada experimento constando de 10 repetições que foram mantidos em BDO por 10 dias sobre regime luminoso de escuro contínuo a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os resultados mostraram que o crescimento de micélios foi semelhante entre o meio BDA e o meio FAS, entretanto, o crescimento em BDA e FAA como entre FAS e FAA apresentou diferenças, observando-se que os melhores meios para o crescimento micelial de *M. fijiensis* foram BDA e FAS.

Palavras-chave adicionais: Sigatoka-negra, banana, *Musa* sp, meio de cultura.

Abstract

The banana is one of the most consumed fruits in the world, been cultivated in the majority of the tropical countries and a primary food for millions of people in some areas of the world. The banana's culture have certain disadvantage because is always suffering environmental stress, plagues and pathogens in according to the variety or cultivate. Among the diverse pathogens that damages the fruit, black-sigatoka, caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet fungus, is the worst worldwide. Studies aiming to find the optimum culture media for micelial growth and esporulation of fungus are essential to study the control of fungus patoghens. So, the objective of this work was to verify optimun culture media for micelial growth of *M. fijiensis*. For this the

indirect method of inoculation in petri dishes containing potato dextrose agar (BDA) media and cloranfenicol was applied from leaves with the illness symptoms. From the colonies provinients of this innoculation fragments was transfered to the dishes with oats-sacarose flour (FAS) media, oats-agar flour (FAA) media and BDA. Each experiment consisted of 10 replications and were kept in BDO per 10 days in continuous dark at $26^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$. With error probability of 5% there were statistic evidence that the micelial growth was the same between PDA and FAS medias. However, the growth between PDA and FAA as werw different proved by statistical methods, which verified thet the best media for the micelial growth of *M. fijiensis* are BDA and FAS.

Key-words: Black Sigatoka, banana, *Musa* sp, half of culture

Introdução

A banana é uma das frutas mais consumidas no mundo, cultivada na maioria dos países tropicais, podendo ser comercializada por dúzia, quilo e até mesmo unidade, sendo à base da alimentação nos países tropicais (Borges & Souza, 2004; Gonçalves, 2006). INIBAP (1994) relatou que a banana é um alimento primário para milhões de pessoas em algumas áreas do mundo, incluindo a África Central, o Sudeste Asiático, a América Central e do Sul e o Caribe. Constituindo uma importante fonte de alimento, podendo ser utilizada verde ou madura, crua ou processada (Borges & Souza, 2004). Fullerton & Olsen (1995) relataram que somente 10%, 68 milhões de toneladas, da produção mundial de banana é voltada para a exportação, sendo os outros 90% são produzidos para a subsistência, isto porque a bananicultura possui grande importância econômica e social, geralmente por pequenos agricultores (Ploetz, 2000; Gonçalves, 2006). Os autores ainda afirmaram que, aproximadamente 98% da produção mundial, ocorre em países em desenvolvimento, sendo os países desenvolvidos o destino da exportação.

Para Marín et al. (2003) uma desvantagem na produção de banana é que ela está sempre sofrendo com as condições ambientais, pestes e patógenos de acordo com a variedade ou cultivar. A sigatoka-negra, atualmente, é considerada o maior problema da produção comercial de banana em todos os continentes (Orozco-Santos & Farias-Larios, 2002; Castro et al., 2005). Constatada no Brasil em 1998 no Estado do Amazonas, tem-se expandido rapidamente pelo país, causando prejuízos elevados e deixando produtores e técnicos bastante preocupados, tendo em vista a grande capacidade de destruição que apresenta, adquirindo contornos de problema social e econômico (Cordeiro et al., 1998; Borges & Souza, 2004; Gasparotto et al., 2006). Como o patógeno se dispersa rapidamente, em 2006 a doença já estava presente nos Estados do Amazonas, Pará, Roraima, Amapá, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Gasparotto et al., 2006). A doença é causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, tendo como forma anamórfica *Pseudocercospora fijiensis* Deighton, que foi descrito pela primeira vez em 1964 na região de Fiji, sudoeste de Viti levu, a 60 km do Vale de Sigatoka (Carlier et al., 1994; Marín et al., 2003).

De acordo com Brunelli et al. (2006), uma das características do gênero *Cercospora* é o crescimento lento e a escassez de esporulação em meios artificiais, sendo que agentes físicos seriam capazes de induzir ou inibir o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo, estando entre os mais importantes a temperatura e a luminosidade. Montarroyos et al. (2007) reportando a literatura afirmaram que a composição do meio de cultura, as fontes de carbono e nitrogênio, o pH do meio de cultura e os regimes de luminosidade seriam os principais interferentes na

obtenção de culturas *in vitro* de diversos fungos fitopatogênicos. Tal fato foi confirmado por Hanada et al. (2002a), que reportando a bibliografia especializada, relataram que a composição do meio de cultura determina a quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação dos fitopatógenos.

Os meios V8 e farinha aveia-ágar (FAA) são os melhores para a esporulação de *Cercospora sojina* (Veiga & Kimati, 1974). Hanada et al. (2002a) comprovaram a eficiência do meio de cultura V8, bem como o meio batata dextrose ágar (BDA) na esporulação de *M. fijiensis*, no entanto, Veiga & Kimati (1974) advogaram que o meio FAA pode substituir o meio V8 sem prejuízos, e comentaram ainda, que por esse ser um meio importado torna-se de difícil aquisição em algumas regiões.

O regime luminoso que mais influencia o crescimento micelial do gênero *Cercospora* é o de escuro contínuo, sendo a temperatura adequada para a mesma finalidade de 25°–28°C (Hanada et al., 2002b; Brunelli et al., 2006).

Como o controle da doença é realizado, principalmente, pelo uso de híbridos resistentes, a determinação de condições ótimas para o crescimento micelial e produção de esporos *in vitro* é muito importante para trabalhos que utilizem inoculação artificial para identificar genótipos resistentes ao patógeno.

Assim, este trabalho objetivou a avaliação de diferentes meios de cultura no crescimento micelial *M. fijiensis in vitro*.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido nos laboratórios do Campus Experimental do Litoral Paulista - Unidade São Vicente, UNESP.

O método de incubação do patógeno utilizado foi o preconizado por Hanada (2002a) modificado. Foram obtidas folhas de bananeiras apresentando sintomas da doença, provenientes do município de São Vicente (SP). Pelo método indireto as estruturas reprodutivas do patógeno foram transferidas para placas de Petri contendo meio batata dextrose ágar (BDA) e cloranfenicol a 250 mg L⁻¹. Culturas de *M. fijiensis* crescidas em placa de Petri contendo meio BDA, com 15 dias de incubação a 25°C ± 2°C no escuro foram utilizadas para multiplicação do inóculo.

Dessas colônias, previamente isoladas, retirou-se pequenos fragmentos para serem inoculados em placas de Petri contendo 15 mL dos respectivos meios de cultura: batata dextrose ágar (BDA), farinha de aveia-ágar [FAA (50 gramas de farinha de aveia e 15 gramas de ágar em

1 litro de água destilada)] e farinha de aveia-sacarose [FAS (10 gramas de sacarose e 30 gramas de farinha de aveia em 1 litro de água destilada)], empregando-se 4 fragmentos por placa, que foram colocadas em BDO por 10 dias sobre regime luminoso de escuro contínuo a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Romero & Sutton, 1997; Hanada et al., 2002a).

O crescimento micelial foi obtido por meio de medição do diâmetro, em mm, das colônias, em dois sentidos diametricamente opostos. O percentual de crescimento micelial (PIC) foi utilizado para obter-se a taxa de crescimento do micélio.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 3 tratamentos e 10 repetições em cada um. Verificou-se a normalidade dos dados de cada tratamento através do teste de Shapiro-Wilk (teste W), procedendo-se em seguida a análise de variância não-paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis/Dunn, com chance de erro de 5%.

Resultados

A Tabela 1 indica o crescimento micelial médio do fungo *Mycosphaerella fijiensis* nos diferentes meios de cultura e a Tabela 2 indica o PIC para os meios Aveia-Ágar e Aveia-Sacarose.

TABELA 1- Crescimento micelial médio (mm) do fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet em diferentes meios de cultura.

BDA	FAA	FAS
18,86	16,41	20,22

TABELA 2- Percentual de crescimento micelial (PIC) do fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet em diferentes meios de cultura.

FAA	FAS
13,01639062	-7,221256089

Os resultados para o PIC indicam tendência do meio aveia-sacarose (FAS) em promover o crescimento, assim como do meio aveia-ágar (FAA) inibi-lo, em comparação com o meio controle (BDA).

Verificando-se a normalidade dos dados de cada tratamento pelo teste Shapiro-Wilk (teste W), constatou-se que os dados não se distribuíram de maneira paramétrica. Desse modo, procedeu-se a análise de variância não-paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis/Dunn, cujos resultados estão representados na Figura 1.

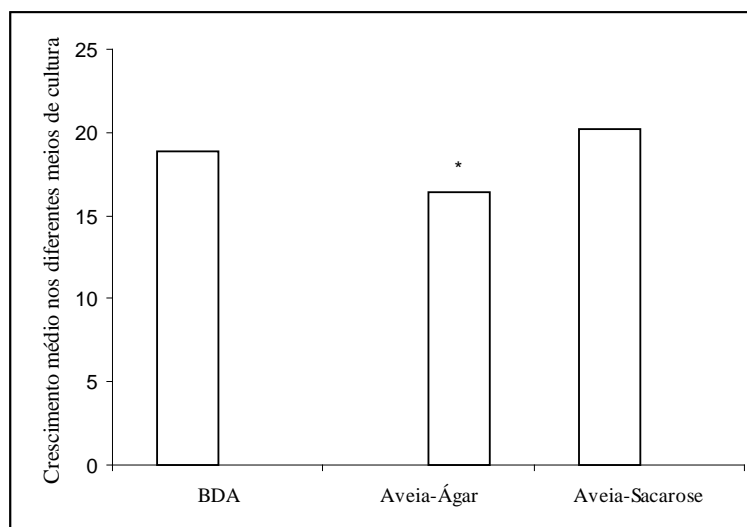


FIG. 1 – Crescimento micelial médio (mm) do fungo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet em diferentes meios de cultura.

Há evidência estatística para se afirmar que o crescimento de micélios foi o melhor nos meios BDA e FAS não havendo diferença significativa entre eles, embora pelos resultados sem análise, o meio FAS leva a um maior crescimento. Tanto os resultados para BDA e FAA, como aquele entre os dois meios à base de aveia, foram estatisticamente diferentes.

Discussão

O meio BDA é recomendado para o crescimento micelial e esporulação do gênero *Cercospora* (Hanada et al., 2002a; Brunelli et al., 2006). Montarroyos et al. (2007) afirmaram que a dextrose e a sacarose são fonte de carbono e que juntamente com as de nitrogênio afetam o crescimento micelial de *Mycosphaerella musicula*. Rosa & Menezes (2001) comprovaram em seus estudos com *Pseudocercospora musae* que os meios BDA e aveia-sacarose-ágar induzem maior média para o crescimento micelial, precedidos pelo meio de leite de coco.

O meio FAA em comparação com os outros meios mostrou-se menos eficiente, o que contraria os resultados encontrados por Veiga & Kimati (1974) que advogaram que seu uso poderia substituir o V8 sem prejuízos para os experimentos.

Ávila & Pitelli (2004) relataram que o crescimento micelial e a esporulação de *Cercospora piaropi* são consideravelmente influenciados pela composição do meio de cultura e período de cultivo. Romero & Sutton (1997) obtiveram 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.

Para futuros estudos e obtenções de colônias do fungo *M. fijiensis* recomenda-se a utilização de meios contendo batata dextrose ágar (BDA) ou farinha de aveia-sacarose (FAS).

Referências Bibliográficas

- ÁVILA, Z.R. & PITELLI, R.A. Crescimento, esporulação e virulência do inoculo de *Cercospora piaropi*, agente de biocontrole do aguapé. **Fitopatologia Brasileira** 29:189-192. 2004.
- BORGES, A.L & SOUZA, L.S (Eds.) O cultivo da bananeira. 1º. Ed. Embrapa, Cruz das Almas. 2004.
- 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 Phytopathol** 32:92-94. 2006.
- CARLIER, J., MOURICHON, X., GONZÁLES-DE-LÉON, D., ZAPATER, M.F. & LEBRUN, M.H. DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. **The American Phytopathological Society** 84:751-757. 1994.
- CASTRO, M.E.A., PEREIRA, J.C.R. & GASPAROTTO, L. Primeiro relato de ocorrência da sigatoka-negra em Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira** 30:668. 2005.
- CORDEIRO, Z.J.M., MATOS, A.P. & MEISSNER FILHO, P.E. Doenças de métodos de controle. In: Borges AL & Souza LS (Eds.). O cultivo da bananeira. Embrapa, Cruz das Almas, Bahia, Brasil. 2004. pp. 146-182.
- FULLERTON, R.A. & OLSEN, T.L. Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science** 23:39-48. 1995.
- GASPAROTTO, L., PEREIRA, J.C.R., HANADA, R.E. & MONTARRYOS, A.V.V. Sigatoka-negra da banana. 1º. Ed. Embrapa. Manaus. 2006.
- GONÇALVES, V.D. Interplântio de variedades de bananeira com prática de controle de sigatoka. Dissertação de Mestrado. Jaboticabal SP. Universidade Estadual Paulista. 2006.
- HANADA, R.E., GASPAROTTO, L. & PEREIRA, J.C. Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura **Fitopatologia Brasileira** 27:170-173. 2002a.
- HANADA, R.E., GASPAROTTO, L. & PEREIRA, J.C. Sobrevivência de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes materiais. **Fitopatologia Brasileira** 27:408-411. 2002b.
- INIBAP The improvement and testing of Musa: a global partnership. Parc Scientifique Agropolis.

Honduras. 1994.

MARÍM, D.H., ROMERO, R.A., GUZMÁN, M. & SUTTON, T.B. Black sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. **Plant Disease**. 87:208-222. 2003.

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*. 1ª. Ed. Brasília. EMPRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2004.

MONTARROYOS, A.V.V., COELHO, R.S.B., FERRAZ, G.M.G., SANTOS, R., SANTOS, V.F. & ANDRADE, P.P. Efeito de meio de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento de *C. musicula*. **Summa Phytopathol** 33:86-89. 2007.

OROZCO-SANTOS, M.Y. & FARIÁS-LARIOS, J. Efecto del Pyraclostrobin sobre el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Memorias de la XV Reunión ACORBAT 2002. Cartagena de Indias, Colombia. 2002. pp. 243-248.

PLOETZ, R. Black sigatoka. **Pesticide outlook** 1:19-23.2000.

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.

ROSA, R.C.T. & MENEZES, M. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de *Pseudocercospora musae*. **Fitopatologia Brasileira** 26:141-147. 2001.

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.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Extratos vegetais aquosos e óleos essenciais tem se apresentado como bons antifúngicos e estão sendo utilizados em uma grande variedade de doenças. Os óleos essenciais empregados neste trabalho comprovaram essa atividade já difundida no controle de outros patógenos.

Os óleos essenciais aqui empregados: *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba); *Copaifera officinalis* L. (copaíba); *Eugenia caryophyllus* Spreng. (cravo); *Eucalyptus globulus* Labill. (eucalipto) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho), apresentaram resultados satisfatórios atuando como fungicidas com bom controle deste patógeno, sendo a primeira vez utilizados no controle de *M. fijiensis*.

Considerando os de andiroba e copaíba, estes foram escolhidos por serem plantas nativas e por apresentarem diferentes ações, entre elas inseticida, repelente e antifúngica, enquanto que os óleos de cravo, eucalipto e tomilho foram escolhidos por tradicionalmente apresentarem atividade antifúngica e serem de fácil obtenção.

Os óleos que em média apresentaram melhor eficiência foram os de andiroba e cravo, na diluição de 0,3 e 0,1 mL, respectivamente. No entanto, significativamente não diferiram dos demais, o que possibilita ao produtor escolher livremente, de acordo com a disponibilidade e custo. Qualquer um dos óleos essenciais aplicados em sua menor diluição apresentará um menor custo à produção, proporcionando melhor qualidade e fácil comercialização da banana, tanto no mercado interno quanto no externo. No entanto, deve-se salientar que este estudo foi feito *in vitro*, sendo necessários estudos da aplicação *in vivo*.

Para atingir maiores e melhores resultados no controle de doenças que acometem os diferentes cultivos são necessários estudos, nos quais se obtenha informações suficientes para o manejo do patógeno. Esses estudos dependem primariamente da obtenção de colônias *in vitro*, e para isso são necessárias metodologias práticas que permitam tais investigações. Os resultados encontrados neste trabalho mostram que o meio BDA, já muito utilizado para a obtenção de colônias de *M. fijiensis*, aqui usado como meio padrão, não apresentou diferença na obtenção das colônias ao se empregar meio farinha aveia-sacarose (FAS), podendo esse ser utilizado sem prejuízos para essa finalidade. Já o meio farinha aveia-ágar (FAA) apresentou resultados menos favoráveis para essa prática.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados obtidos no presente estudo e nas condições dos experimentos pode-se concluir que os óleos essenciais de *Carapa guianensis* (andiroba), *Copaifera officinalis* (copaíba) *Syzygium aromaticum* (L). Merr. & L. M. Perry (cravo), *Eucalypto globulus* Labill. (eucalipto) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho), na diluição de 1mL utilizados neste trabalho apresentaram atividade de inibição da germinação de conidíolos de *Mycosphaerella fijiensis*. Para futuros estudos e obtenções de colônias do fungo *Mycosphaerella fijiensis* recomenda-se a utilização de meios contendo batata dextrose ágar (BDA) ou farinha de aveia-sacarose (FAS).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIANUAL. Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos. 2003. pp.229-232.
- Alves ESS, Santos MP, Ventura JÁ, Fernandes PMB (2002) Eficiência de óleos essenciais no controle *in vitro* da germinação de conídios e do crescimento micelial de *Colletotrichum musae*. *Fitopatologia Brasileira* 27: 75.
- Alves ESS, Puro MS, Marques SS, Ilches TTB, Santos RB, Ventura JA, Fernandes MPM (2003) Avaliação de óleos essenciais na inibição do crescimento de fungos de fruteiras. *Fitopatologia Brasileira* 28: 343.
- Archibold OW (1995) *Ecology of world vegetation*. 1° ed. Chapman & Hall, London.
- Balint-Kurti PJ, May GD, Churchill ACL (2001) Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. *FEMS Microbiology Letters*. 195: 9-15.
- Bandeira MFCL, Oliveira MRB, Pizzolitto AC, Benatti Neto C (1999a) Estudo preliminar da atividade antibacteriana do óleo essencial e da resina da *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba), associados ao óxido de zinco e ao hidróxido de cálcio. *Jornal Brasileiro de Clínica e Estética em Odontologia* 3: 46-51.
- Bandeira MFCL, Oliveira MRB, Pizzolitto AC, Benatti Neto C, Jorge Neto J (1999b) Estudo farmacológico preliminar de *Copaifera multijuga* (óleo de copaíba) *Jornal Brasileiro de Clínica e Estética em Odontologia* 3: 39-41.
- Bastos CN, Albuquerque PSB (2004) Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. *Fitopatologia Brasileira*. 29: 555-557.
- Beveraggi A, Mourichon X, Sallé G (1995) Etude comparée des premières étapes de l'infection chez des bananiers sensibles et résistants infectés par *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*), agent responsable de la maladie des raies noires. *Canada Journal Botanical* 73: 1328-1337.
- Bonaldo SM, Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Tessmano DJ, Scapin CA (2004) Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira*. 29: 128-134.
- Borges AL, Souza LS (2004) *O cultivo da bananeira*. 1° ed. Embrapa, Cruz das Almas.
- Borges AL, Silva SO, Caldas RC, Ledo CAS (2006) Teores foliares de nutrientes em genótipos de bananeira. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28: 314-318.
- Brunelli KR, Fazza AC, Athayde Sobrinho C, Camargo LEA (2006) Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de *Cercospora zeae-maydis*. *Summa Phytopathol* 32: 92-94.

Burt PJA, Rosenberg, LJ, Rutter GJ, Ramirez F, Gonzales H (2002) Forecasting the airborne spread of *Mycosphaerella fijiensis*, a cause of black Sigatoka disease on banana: estimations of numbers of perithecia and ascospores. *Ann. Appl. Biol.* 135: 369-377.

Cavalcante MJB, Gondim TMS, Cordeiro ZJM, Matos AP (1999) Avaliação do comportamento de genótipos de bananeira à Sigatoka negra no Estado do Acre. *Fitopatologia Brasileira* 24: 175.

Calvacante MJB, Sá CP, Gomes FCR, Godim TMS, Cordeiro ZJM, Hessel JL (2004) Distribuição e impacto da sigatoka-negra na bananicultura do Estado do Acre. *Fitopatol. Bras.* 29: 544-548.

Carlier J, Mourichon X, Gonzáles-de-Léon D, Zapater MF, Lebrun MH (1994) DNA restriction fragment length polymorphisms in *Mycosphaerella* species that cause banana leaf spot diseases. *Phytopathology.* 84: 751-756.

Carson CF, Riley TV (1995) Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of applied bacteriology.* 78: 264-269.

Castro MEA, Pereira JCR, Gasparotto L (2005) Primeiro relato de ocorrência da sigatoka-negra em Minas Gerais. *Fitopatol. bras.* 30: 668.

Chalfoun SM, Pereira MC, Resende ML, Landélico CL, Silva RA (2004) Efeito de tratamentos com condimentos em pó sobre o crescimento micelial, esporulação e produção de aflatoxinas por fungos toxigênicos. *Ciência Agrotécnica* 28: 856-862.

Coitinho RLBC, Oliveira JV, Gondim Junior MGC, Câmara CAG (2006) Atividade inseticida de óleos vegetais sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. *Rev. Caatinga.* 19: 176-182.

Cordeiro ZJM, Matos AP, Silva SO (1998) Black sigatoka confirmed in Brazil. *InfoMusa* 7: 31-32.

Cordeiro ZJM, Matos AP, Meissner Filho PE (2004) Doenças de métodos de controle. In: Borges AL, Souza LS (eds), *O cultivo da bananeira*, pp. 146-182. Embrapa, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

Craenen K, Ortiz R (1997) Effect of the *bs1* gene in plantain-banana hybrids on response to black sigatoka. *Theoretical Applied Genetics* 95:497-505.

Crous PW, Kang JC (2001) A phylogenetic redefinition of anamorph genera in *Mycosphaerella* based on its rDNA sequence and morphology. *Mycologia.* 93: 1081-1101.

Crous PW, Groenewald JZ, Aptroot A, Braun U, Mourichon X, Calier J (2002) Integrating morphological and molecular data sets on *Mycosphaerella* with specific reference to species occurring on *Musa*. *IMBAP* 1: 43-56.

Estanislau AA, Barros FAS, Peña AP, Santos SC, Ferri PH, Paula JR (2001) Composição

química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 11: 95-100.

Faturete BO, Madukwe MC, Tenkouano A, Agwu AE (2007) A review of policy acts and initiatives in plantain and banana innovation system in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 6: 2297-2302.

Flori JE, Resende GM, Paiva LE (1995) Produção de bananeira 'Grande Naine' superadensada e irrigada no Vale do São Francisco. *Ciência e Agrotecnologia* 28: 1060-1065.

Fouré E (1994) Leaf spot diseases of banana and plantain caused by *Mycosphaerella musicula* and *M. fijiensis*. *Annals: International Network for the Improvement of Banana and Plantain*. 1: 37-46.

Fritz RS, Simms EL (1992) Plant resistance to herbivores and pathogens: ecology, evolution, and genetics.

Fullerton RA, Olsen TL (1995) Pathogenic variability in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. *New Zealand J. Crop Hortic. Scic.* 23: 39-48.

Gasparotto L, Pereira JCR, Trindade DR (2001) Situação atual da Sigatoka negra da bananeira no Brasil. *Fitopatologia Brasileira* 26: 449.

Gasparotto L, Pereira JCR, Hanada RE, Montarroyos AVV (2006) Sigatoka-negra da banana. 1º ed. Embrapa, Manaus.

Gasparotto L, Pereira JCR, Falbertino SM, Pereira MCN (2008) Plantio adensado não controla a sigatoka-negra da bananeira. *Acta Amazonica* 38: 189-192.

Gomes P (1978) *Fruticultura Brasileira*. 4º ed. Nobel, São Paulo.

Gonçalves VD (2006) Interplantio de variedades de bananeira com prática de controle de sigatoka. Dissertação de Mestrado. Jaboticabal SP. Universidade Estadual Paulista.

González, M (1999) Metodología para la manipulación y cultivo *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*. *Manejo integrado de Plagas* 53: i-iv.

Hanada RE, Gasparotto L, Pereira JC (2002a) Esporulação de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes meios de cultura. *Fitopato. Bras.* 27: 170-173.

Hanada RE, Gasparotto L, Pereira JC (2002b) Sobrevivência de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes materiais. *Fitopatologia Brasileira* 27: 408-411.

Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1999) Antimicrobial activity of essential oil and other plant extracts. *Journal of applied microbiology*. 86:985-990.

Harelimana G, Lepoivre P, Jijaki H, Mourichon X (1997) Use of *Mycosphaerella fijiensis* toxins for the selection of banana cultivars resistant to Black streak. *Euphytica* 96: 125-128.

Harold AM, Winnwe WE, Pell EJ (1991) Response of plants to multiple stresses. *Academic*

Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego.

Harper JL (1977) Population biology of plant. 9^o impressão. Academic Press Limited, London.

Heldt HW (2005) Plant Biochemistry. 3^o ed. Elsevier Inc.

Hoss R, Helbig J, Bochow H (2000) Function of host and fungal metabolites in response of banana and plantain in the black sigatoka disease pathosystem (Musa spp. - *Mycosphaerella fijiensis*). Journal Phytopathology. 148: 387-394.

INIBAP (1994) The improvement and testing of Musa: a global partnership. Parc Scientifique Agropolis. Honduras.

Jacome LH, Schuh W (1992a) Effect of temperature on growth and conidial production *in vitro*, and comparison of infection and aggressiveness *in vivo* among isolates of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Trop. Agric. 70: 51-59.

Jacome LH, Schuh W (1992b) Effects of leaf wetness duration and temperature on development of black sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Phytopathology. 80: 515-520.

Jacome LH, Schuh W (1992c) Spore production and artificial inoculation techniques for *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Trop. Agric. 70: 33-38.

Jeger MJ, Eden-Green S, Thresh JM, Johanson A, Waller JM, Brown AE (1995). Banana diseases, in: Gowen, S. (Ed.), Bananas and Plantains. Chapman & Hall, London, UK., 317-381.

Jenny C, Tomekpé K, Bakry F, Escalant JV (2002) Conventional breeding of bananas. INIBAP 1: 199-208.

Ji P, Momol MT, Olson SM, Prahana HG PM (2005) Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. Plant Disease 89: 497-500.

Jimenez M, Veken LV, Neiryck H, Rodríguez H, Ruiz O, Swennen R (2007) Organic banana production in Ecuador: its implications on black sigatoka development and plant-soil nutritional status. Renew. agricul. food syst. 22: 297-306.

Johanson A, Crowhurst RN, Rikkerik EHA, Fullerton RA, Templeton MD (1994) The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of sigatoka disease of banana. Plant Pathology 43: 701-707.

Jones DR (1984) Failure of the black Sigatoka eradication program in the Torres Strait region. Australasian Plant Pathology 13: 57-58.

Jones DR (2002) The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. INIBAP 1: 25-41.

Jorge PE, Polanco T (2002) Spread and management of Black leaf streak disease in the

Dominican Republic. INIBAP 1: 277-285.

Júnior RV, Júnior WCJ, Cecílio RA (2007) Influência das mudanças climáticas na distribuição espacial da *Mycosphaerella fijiensis* no mundo. Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto – INPE – Florianópolis. 443-447p.

Juven BJ, Kanner J, Schved F, Weisslowicz H (1994) factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*. 46: 626-631.

Kozłowski TT, Kraner PJ, Pallardy SG (1991) *The physiological ecology of woody plants*. 1° ed. Editora Board, Toronto.

Lancher W (2000) *Ecofisiologia vegetal*. 1° ed. Rima Artes e Textos, São Carlos.

Lepoivre P, Busogoro JP, Etame JJ, El Hadrami A, Carlier J, Harelimana G, Mourichon X, Panis B, Riveros AS, Sallés G, Strosse H, Swennen R (2002) Banana – *Mycosphaerella fijiensis* interactions. INIBAP- May. 151-159.

Marín DH, Romero RA, Guzman M, Sutton TB (2003) Black sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87: 208-222.

Martínez G, Pargas R, Manzanilla E, Mu D (1998) Report on black sigatoka status in Venezuela in 1997. *InfoMusa* 7:31-32.

Mascarenhas G (1997) Análise do mercado brasileiro da banana; *Preços agrícolas* 1: 4-15.

Mobambo KN, Pasberg C, Gauhl F, Zuofa K (1996) Host response to black sigatoka in *Musa* germplasm of different ages under natural inoculation conditions. *Elsevier* 16: 359-363.

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.

Mourichon X, Fullerton R A (1990) Geographical distribution of the species *Mycosphaerella musicola* Leach (*Cercospora musae*) and *M. fijiensis* Morelet (*C.fijiensis*), respectively agents of Sigatoka Disease and Black Leaf Streak Disease in bananas and plantains. *Fruits* 45: 213-218.

Mourichon X, Carlier J, Fouré E (1997) Sigatoka leaf spot diseases. *Annals: International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Parc Scientifique Agropolis II. France*, pp.4.

Mourichon X (2002) Overview of progress and results since the first international workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana in 1989. INIBAP 1:11-18.

Orozco-Santos MY, Farias-Larios J (2002) Efecto del Pyraclostrobin sobre el control de sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. *Memorias de la XV Reunión ACORBAT 2002. Cartagena de Indias, Colombia*. p. 243-248.

Perea-Dallos M (1993) Contribution to the study of banana anther culture. INIBAP 1: 159-162.

Pereira JCR, Gasparotto L, Coelho AFS, Urban A (1998) Ocorrência da sigatoka-negra no Brasil. Fitopatologia Brasileira 23: 295.

Pérez L, Hernández A, Abreu E, Mauri FF, Porras A. (1993) Epidemiología de la Sigatoka negra. Informe final. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ministerio de Agricultura, Cuba.

Pérez L, Hernández A, Hernández L, Pérez M (2002) Effect of trifloxystrobin and azoxystrobin on the control of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on banana and plantain. Crop Protection. 21: 17-23.

Ploetz R (2000) Black sigatoka. Pesticide outlook. 1: 19-23.

Porras A, Pérez L (1997) The role of temperature in the growth of the germ tubes of ascospores of *Mycosphaerella fijiensis* spp., responsible for leaf spot diseases of banana. Estimation of their rate of development for diagnosis and treatment using daily minimum and maximum temperatures in Cuba. INFO- MUSA 6: 27-32.

Raven PH (2007) Biologia Vegetal. 7° ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Ritzinger CHSP, Ritzinger R, Cordeiro ZJM, Cavalcante MJB (1999) Ocorrência de Sigatoka negra da Bananeira em Rio Branco, Ac, Brasil. Fitopatologia Brasileira 24 :450.

Riveros AS, Giraldo CI, Gamboa A (2002) Microbiological control of Black leaf streak disease. INIBAP 1: 287-296.

Romero RA, Sutton TB (1997) Reaction of four Musa Genotypes at three temperatures to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. Plant Disease 81: 1139-1142.

Romero RA, Sutton TB (1998) Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black sigatoka of banana, in Costa Rica. Plant Disease 82: 931-934.

Roux N, Toloza A, Busogoro JP, Panis B, Strosse H, Lepoivre P, Swennen R, Zapata-Arias FJ (2002) Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. INIBAP 1: 239-250.

Rutter J, Burt PJA, Ramirez F (1998) Movement of *Mycosphaerella fijiensis* spores and sigatoka disease development on plantain close to an in-culture source. Aerobiologia 14: 201-208.

Salisbury FB, Ross CW (1991) Plant Physiology. 4° ed. Wadsworth Publishing Company, California.

Sant' Anna, BMP, Fontes SP, Pinto AC, Rezende CM (2007) Characterization of wood odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). Journal Brazilian Chemical Society 18: 984-989.

Santurio JM, Santurio DF, Pozzatti P, Moraes C, Franchin PR, Alves SH (2007) Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* entérica de origem avícola. *Ciência Rural*. 37: 803-808.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (2000) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2º ed. Editora da UFSC / Editora da Universidade, Porto Alegre.

Souza VC, Lorenzi H (2005) *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias da Angiospermas da flora brasileira, baseado no APG II*. 1º ed. Nova Odessa, São Paulo.

Stover RH (1980) Sigatoka leaf spot of banana and plantains *Plant Disease* 64: 750-755.

Strobel GA, Stierle AA, Upadhyay R, Hershenhorn J, Molina G (1993) The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black sigatoka disease, and their potential use in screening for disease resistance. *INIBAP* 1: 93-103.

Taiz L, Zeiger E (2009) *Fisiologia Vegetal*. 5º ed. Artmed, Porto Alegre.

Veiga P, Kimati H (1974) Influência de meios de cultura e regime luminoso na esporulação de *Cercospora sojina* Hara. *Revista Centro Ciências Rurais* 4: 159-164.

Vicente LP (1998) Black sigatoka disease control in banana and plantain plantations in Cuba. *InfoMusa*. 7: 27-30.