***Mycosphaerella musicola*: PRODUÇÃO DE CONÍDIOS *IN VITRO*;
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM MUDAS DE
CULTIVARES DE BANANEIRA (*Musa spp*).**

PAULO SÉRGIO BEVILAQUA DE ALBUQUERQUE

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Novembro - 1993

Albuquerque, Paulo Sérgio Bevilaqua

A345m *Mycosphaerella musicola*: produção de conídios
"in vitro"; sensibilidade a fungicidas e avaliação
da resistência em mudas de cultivares de bananeira
(*Musa* spp.). Piracicaba, 1993.
94p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Banana - Resistência à doença 2. Cercosporiose
da banana - Controle químico 3. Fungicida em banana
4. Fungo fitopatogênico - Conídio - Produção "in vitro"
I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Pi-
racicaba

CDD 634.772

Mycosphaerella musicola: PRODUÇÃO DE CONÍDIOS *IN VITRO*;
SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS E AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA EM MUDAS DE
CULTIVARES DE BANANEIRA (*Musa spp*).

PAULO SÉRGIO BEVILAQUA DE ALBUQUERQUE

Aprovado em: 12.11.1993

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati	ESALQ/USP
Prof. Dr. Tasso Leo Krugner	ESALQ/USP
Prof. Dr. Beatriz Madalena Januzzi Mendes	CENA/USP

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

Orientador

Aos meus pais

Fernando e Yolanda

pelo amor e ensinamentos,

minha homenagem.

À minha esposa Natália

e minha filha Camila,

pelo amor e compreensão

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Hiroshi Kimati, pela orientação, apoio e incentivo durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Clélio Lima Salgado, pelo apoio durante o curso de pós-graduação.

Aos funcionários do Deptº de Fitopatologia da ESALQ, em especial a Pedro Silva, Marina Pavan e Edivaldo Buriola, pelo apoio durante a realização do nosso curso.

Aos colegas de curso, pela amizade e companheirismo, em especial a Amauri Sivieiro, Maria Nemauro, Rosa Maria, Fernando Soares, Marco Galli, Roberto Carvalho e Roberto Castro.

A Drª Beatriz Mendes e aos funcionários do Deptº de Radiogenética do CENA, Wlamir e Inês, pelo apoio durante a execução de experimentos nesta instituição.

A CEPLAC, pela oportunidade de realização deste curso.

A CAPES, pelo auxílio financeiro.

Ao Dr. José Aires Ventura e a colega Erna
Bach, pelas sugestões apresentadas.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XII
SUMMARY	XV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Produção <i>in vitro</i> de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i>	5
2.2. Inoculação de mudas de bananeira com <i>Mycosphaerella musicola</i> em condição de casa-de-vegetação	10
2.3. Controle químico das cercosporioses da bananeira	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1. Local e época de realização dos experimentos ..	24
3.2. Obtenção dos isolados de <i>Mycosphaerella musicola</i>	24
3.3. Produção <i>in vitro</i> de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> em diferentes meios de cultura	25
3.4. Esporulação <i>in vitro</i> de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> sob diferentes regimes de luz ..	27
3.5. Produção <i>in vitro</i> de conídios de diferentes isolados de <i>Mycosphaerella musicola</i>	28
3.6. Sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>M. musicola</i> aos fungicidas propiconazole, triadimenol	

e benomyl	29
3.7. Detecção <i>in vitro</i> de mutantes de <i>Mycosphaerella musicola</i> resistentes a fungicidas	31
3.8. Desenvolvimento de linhagens de <i>Mycosphaerella musicola</i> resistentes a triadimenol e propiconazole em diferentes concentrações destes fungicidas	32
3.9. Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Mycosphaerella musicola</i>	33
3.10. Efeito de diferentes concentrações de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> sobre o desenvolvimento da doença mal-de-Sigatoka	35
3.11. Efeito da concentração do inóculo de <i>Mycosphaerella musicola</i> no desenvolvimento da doença mal-de-Sigatoka em mudas de bananeiras com diferentes idades.....	36
3.12. Comportamento de cultivares de bananeiras com relação ao mal-de-Sigatoka, em condição de casa-de-vegetação	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Produção <i>in vitro</i> de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i>	39
4.2. Esporulação <i>in vitro</i> de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> em diferentes meios de cultura	41
4.3. Esporulação <i>in vitro</i> de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> sob diferentes regimes de luz ..	44

4.4. Produção <i>in vitro</i> de conídios de diferentes isolados de <i>Mycosphaerella musicola</i>	44
4.5. Sensibilidade <i>in vitro</i> de isolados de <i>M. musicola</i> aos fungicidas propiconazole, triadimenol e benomyl	46
4.6. Detecção <i>in vitro</i> de mutantes de <i>Mycosphaerella musicola</i> resistentes a fungicidas	49
4.7. Desenvolvimento de linhagens de <i>Mycosphaerella musicola</i> resistentes a triadimenol e propiconazole em diferentes concentrações destes fungicidas	55
4.8. Teste de patogenicidade dos isolados de <i>Mycosphaerella musicola</i>	55
4.9. Efeito de diferentes concentrações de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> sobre o desenvolvimento da doença mal-de-Sigatoka	57
4.10. Efeito da concentração do inóculo de <i>Mycosphaerella musicola</i> no desenvolvimento da doença mal-de-Sigatoka em mudas de bananeiras com diferentes idades.....	62
4.11. Comportamento de cultivares de bananeiras com relação ao mal-de-Sigatoka, em condição de casa-de-vegetação	68
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Colônias de <i>Mycosphaerella musicola</i> com produção de conídios (A); colônias, de <i>M. musicola</i> originadas de setores estéreis sem produção de conídios (B)	40
Figura 2. Produção <i>in vitro</i> de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> em diferentes meios de cultura .	43
Figura 3. Produção <i>in vitro</i> de conídios de diferentes isolados de <i>Mycosphaerella musicola</i>	48
Figura 4. Efeito de diferentes concentrações de propiconazole sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Mycosphaerella musicola</i>	51
Figura 5. Colônias de <i>Mycosphaerella musicola</i> em meio de soja com 60 dias de idade. Mutante resistente a propiconazole (Esquerda); Isolado Registro, sensível a fungicidas (Direita) ...	54
Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de suspensões de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> sobre o período de incubação do mal-de-Sigatoka	58
Figura 7. Efeito de diferentes concentrações de suspensões de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> sobre o período de latência do mal-de-Sigatoka	59

Figura 8. Influência da concentração de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> sobre o período de incubação do mal-de-Sigatoka em mudas de bananeira com 3 e 6 meses de idade	64
Figura 9. Influência da concentração de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> sobre o período de latência do mal-de-Sigatoka em mudas de bananeira com 3 meses de idade	65
Figura 10. Influência da concentração de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> sobre o período de latência do mal-de-Sigatoka em mudas de bananeira com 6 meses de idade	66
Figura 11. Folhas de mudas de bananeira com 3 (A) e 6 (B) meses de idade inoculadas com suspensões de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> nas concentrações de 10^6 , 10^4 e 10^2 conídios/ml..	67
Figura 12. Folhas das cultivares mysore, prata e nanicão (da esquerda para direita) inoculadas com suspensões de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i>	70

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Fungicidas testados <i>in vitro</i> contra <i>Mycosphaerella musicola</i>	30
Tabela 2. Influência do meio de cultura e período de incubação na produção de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i>	42
Tabela 3. Influência do regime de luz sobre a esporulação <i>in vitro</i> de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i>	45
Tabela 4. Esporulação <i>in vitro</i> de conídios de isolados de <i>Mycosphaerella musicola</i> em diferentes períodos de incubação	47
Tabela 5. Efeito dos fungicidas triadimenol, benomyl e propiconazole sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Mycosphaerella musicola</i>	50
Tabela 6. Frequência de mutantes de <i>Mycosphaerella musicola</i> resistentes a 3 fungicidas	53
Tabela 7. Sensibilidade das linhagens de <i>Mycosphaerella musicola</i> aos fungicidas triadimenol e propiconazole	56
Tabela 8. Efeito da concentração da suspensão de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> sobre o desenvolvimento da doença mal-de-Sigatoka ...	61
Tabela 9. Influência da idade da muda de bananeira e	

concentração da suspensão de conídios de <i>Mycosphaerella musicola</i> no período de incuba- ção do mal-de-Sigatoka	63
--	----

Tabela 10.Comportamento de cultivares de bananeira com relação ao mal-de-Sigatoka	69
--	----

***Mycosphaerella musicola*: Produção de conídios *in vitro*;
sensibilidade a fungicidas e avaliação da resistência em
mudas de cultivares de bananeira (*Musa spp.*).**

Autor: Paulo Sérgio Bevilaqua de Albuquerque

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Kimati

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram desenvolver técnicas que permitissem a produção *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola*, verificar *in vitro* a sensibilidade de isolados de *M. musicola* a fungicidas e avaliar, em condição de casa-de-vegetação, a resistência de cultivares de banana ao mal-de-Sigatoka.

Foram utilizados isolados de *M. musicola* procedentes do estado de São Paulo. Os isolamentos foram feitos a partir de conídios, sendo em seguida realizadas várias sub-culturas, para se obter colônias do fungo com produção estável de conídios.

Alta produção *in vitro* de conídios de *M. musicola* foi obtida quando se utilizou meio V8 (com 14, 21 e 28 dias de incubação) e meio de soja (com 14 dias de incubação), sob regime de luz contínua e 25°C. Diferentes capacidades de produção *in vitro* de conídios, foi verificada entre os isolados de *M. musicola*, sendo que o isolado de Piracicaba foi superior aos demais.

Todos os isolados de *M. musicola* apresentaram sensibilidade *in vitro* aos fungicidas propiconazole, triadimenol e benomyl. Nos isolados de Piracicaba e São Simão, foram detectados mutantes do fungo resistentes aos fungicidas propiconazole e triadimenol. Entretanto, estes mutantes não foram patogênicos.

Inoculações realizadas em mudas de bananeira cv nanicão, sob condições de casa-de-vegetação, demonstraram que as concentrações de conídios de *M. musicola* exerceram influência sobre o período de incubação, latência e severidade do mal-de-Sigatoka. Mudas da cv nanicão com 3 e 6 meses de idade, apresentaram reações semelhantes para período de incubação e severidade do mal-de-Sigatoka. No entanto, o período de latência da doença foi maior nas mudas mais velhas.

Foi possível determinar os níveis de resistência ao mal-de-Sigatoka, das cv de banana mysore (resistente), prata (susceptível) e nanicaço (susceptível), quando se inocularam mudas de 4 meses de idade com suspensões de conídios (5×10^5 conídios /ml) sob condições de casa-de-vegetação. Como parâmetros para as avaliações foram utilizados o número de lesões, área foliar infectada, período de incubação e latência da doença.

***Mycosphaerella musicola*: In vitro conidial production; sensibility to fungicides and resistance evaluation in young plants of banana (*Musa spp.*) cultivars.**

Author: Paulo Sérgio Bevilaqua de Albuquerque

Advisor: Dr. Hiroshi Kimati

ABSTRACT

The objectives of this study were: to develop techniques for the *in vitro* production of *Mycosphaerella musicola* conidia; to observe the *in vitro* sensibility of *M. musicola* isolates to fungicides and to evaluate, under greenhouse conditions, the resistance of banana cultivars to the black Sigatoka disease.

Four isolates of *M. musicola* from different localities in the state of São Paulo were used in the study. The isolations were made from conidia, followed by several sub-cultures to obtain colonies with stable conidial production.

Higher production of *M. musicola* conidia were obtained when V8-agar (with 14, 21 and 28 incubation days)

and soybean-agar (with 14 incubation days) were used, under continuous fluorescent light at 25°C. Different capacity of conidial production was verified *in vitro* among the *M. musicola* isolates, the Piracicaba isolate being the most productive one.

All *M. musicola* isolates showed sensibility *in vitro* to the fungicides propiconazole, triadimenol and benomyl. Resistant mutants were detected in the Piracicaba and São Simão isolates to the fungicides propiconazole and triadimenol. These mutants however, were not pathogenic.

Inoculations of young banana plants of cultivar nanicão [Musa (AAA; subgroup Cavendish)], under greenhouse conditions, showed that the conidial concentrations of *M. musicola* exerted influence upon the incubation and latent periods, and severity of black Sigatoka. Young plants of cultivar nanicão with 3 and 6 months of age, showed similar reactions with respect to the incubation period and severity of black Sigatoka. However, the disease latent period was bigger in plants with 6 months of age.

It was possible to determine the reactions of cultivated bananas to *M. musicola* [the banana mysore

cultivar (resistant, AAB), prata cultivar (susceptible, AAB) and nanica₀ (susceptible, AAA)] when young plants of 4 months of age were inoculated with conidial suspension (5×10^5 conidia / ml) under greenhouse conditions. The parameters for the evaluations were the number of lesions, infected leaf area and incubation and latent periods.

1. INTRODUÇÃO

Bananas (*Musa acuminata*) e plátanos (*Musa balbisiana* x *Musa acuminata*) constituem-se em fontes de alimento básico e produto de exportação de vários países (CRONAUER & KRIKORION, 1986). A banana, comercializada como fruta de consumo fresco, é fonte de divisas para diversos países da América do Sul, sendo que em alguns, como a Colômbia, Venezuela e Panamá, o plantio de cultivares do grupo AAB, sub-grupo terra, é base fundamental na alimentação da população, com consumo *per capita* de 162 Kg/ano (GALINDO ALVAREZ, 1991).

O Brasil é o 2º produtor mundial de bananas (*Musa spp*), sendo que em 1991 foram produzidas 5.552 mil toneladas da fruta, com 99% da produção destinada ao mercado interno e apenas 1% exportado para Argentina e Uruguai (BANANA: PANORAMA INTERNACIONAL , 1991).

Dentre as doenças que afetam a cultura da bananeira, as cercosporioses são as mais prejudiciais, podendo acarretar perdas na produção de até 50% . A Sigatoka negra, causada pelo fungo *Mycosphaerella fijiensis* var.

difformis, e a doença estrias negras da folha causada por *Mycosphaerella fijiensis*, não ocorrem no Brasil, mas constituem-se em sérias ameaças, pois já foram constatadas em vários países da América do Sul. A doença mal-de-Sigatoka ou Sigatoka amarela, está presente em todas as regiões produtoras de banana do Brasil. O agente causal desta doença é a *Mycosphaerella musicola* (LEACH) MULDER, sendo *Pseudocercospora musae* (ZIN) DEIGHTON, o seu estágio anamórfico (MEREDITH, 1970; STOVER, 1972; DEIGHTON, 1976).

A produção de inóculo *in vitro* em grande quantidade é indispensável para o estudo da maioria dos fungos fitopatogênicos. No caso de *M. musicola*, é importante possuir grande quantidade de esporos viáveis do fungo a fim de que seja possível a realização de pesquisas sobre o mal-de-Sigatoka em condições controladas. Atualmente porém, o inóculo de *Mycosphaerella spp* produzido *in vitro* consiste basicamente de hifas e uns poucos conídios. As culturas devem ser constantemente renovadas, pois a agressividade dos isolados declina com o tempo de cultivo (STOVER, 1987).

Muitos trabalhos sobre resistência de variedades de bananeira a *Mycosphaerella spp* foram realizados, desde o primeiro estudo detalhado sobre o assunto feito por Vakili em 1968 (STOVER, 1987). No entanto, todos estes trabalhos foram baseados em taxas de doença e níveis de

resistência observadas em plantas adultas sob inoculação natural em condições de campo. Com o renovado interesse internacional em melhoramento de bananeira e a larga ocorrência de variação somaclonal em plantas de bananeiras produzidas *in vitro*, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos de inoculação de um grande número de mudas, produzidas de maneira convencional ou de cultura *in vitro*, que permitam a seleção para resistência às cercosporioses (STOVER, 1987).

O emprego de fungicidas para o controle das cercosporioses da bananeira, tem sido abordado por diversos autores (FOURÉ, 1984; MELIM, 1973; STOVER, 1992). Tal preocupação se justifica, pelo fato de que em geral, variedades de bananeira comumente empregadas comercialmente se comportam como susceptíveis a *Mycosphaerella spp.* No Estado de São Paulo, por exemplo, 95% da produção comercial de bananas é da cultivar nanicão (Sub-grupo cavendish, AAA), que é susceptível às cercosporioses (COMPANHIA DE ENTREPÓS-TOS E ARMAZENS GERAIS DE SÃO PAULO (CEAGESP), 1990).

Os fungicidas atualmente utilizados no controle do mal-de-Sigatoka, são sistêmicos pertencentes ao grupo dos triazóis e benzimidazóis. (RAMSEY et alii, 1987; FOURÉ & GRISONIM, 1984; FOURÉ, 1984; STOVER, 1992). Embora fungicidas como triadimenol, propiconazole e benomyl proporcionem um controle eficiente das cercosporioses, o uso

continuo destes pode ocasionar o aparecimento de linhagens de *Mycosphaerella spp* resistentes a estes fungicidas. A fim de contornar este problema, faz-se necessário o monitoramento das áreas onde o controle químico de *Mycosphaerella spp* é utilizado, com o objetivo de se detectar a presença de linhagens resistentes destes fungos aos fungicidas empregados.

O presente trabalho tem os seguintes objetivos: desenvolver técnicas que proporcionem a esporulação *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola*, aperfeiçoar metodologia de inoculação que permita a realização de *screening* de resistência a *M. musicola* em mudas de bananeira em condição de casa-de-vegetação e testar *in vitro*, os efeitos dos fungicidas propiconazole, triadimenol e benomyl sobre isolados de *M. musicola*.

2- Revisão de Literatura.

2.1- Produção *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella* *spp.*

Segundo MEREDITH (1970), manchas foliares de bananeiras provocadas pelo Mal-de-Sigatoka, apresentam 3 estruturas bem definidas do fungo *Mycosphaerella musicola*. Estes são o espermagônio, o esporodóquio e o peritécio. Os peritécios são em forma de frasco com uma espessa parede marrom escura e ostíolo bem definido que emerge do estômato. O tamanho médio do peritécio é de 65 x 54 μm . Os ascosporos são bi-celulares, com tamanho variando de 13-14 x 4-6 μm . O esporodóquio localiza-se na câmara sub-estomática. Formam estromas de coloração marrom escuro ou preto, dos quais desenvolvem-se grupos de conidióforos curtos que emergem através da abertura dos estômatos. Os esporodóquios possuem comprimento médio de 50 a 64 μm . Os conídios formados sobre os esporodóquios, são cilíndricos e curvados de coloração pálida e oliváceos. Possuem 0-6 septos e tamanho de 20-109 x 2,5-6 μm . Os espermagônios possuem forma de frasco e são menores que os peritécios (50 x 77 μm).

CALPOUZOS (1955) estudando a esporulação *in vitro* de diferentes isolados de *M. musicola*, procedentes da América do Sul e Central, verificou que colônias do fungo produziam conídios em meio de "mycophil-ágar" somente nos primeiros 3-4 dias de idade das colônias, quando então a esporulação era interrompida. Em alguns isolados porém, setores com conídios foram observados em colônias com 4 semanas de idade. A falta de estabilidade na esporulação *in vitro* de *M. musicola*, segundo o autor, estaria relacionado com o fato destas colônias apresentarem uma "mistura" de micélios, os quais foram classificados como estéreis ou esporulantes.

Os micélios estéreis seriam mais adaptados aos meios de cultura, desenvolvendo-se mais rápido que os esporulantes, consequentemente interrompendo a esporulação de conídios nos primeiros dias de idade das colônias.

Através de sub-culturas dos setores esporulantes, CALPOUZOS (1955) obteve colônias de *M. musicola* com formação estável de conídios por um período de 4-5 semanas, em meio de "mycophil-ágar", sob regime de luz alternada de 12 horas, à 26°C. Dos 6 isolados testados (todos obtidos a partir de conídios), 3 apresentaram estabilidade de esporulação após 9 subculturas consecutivas de setores esporulantes, sendo que apenas 1 foi patogênico à bananeira.

Dentre os meios testados para esporulação de *M. musicola*, CALPOUZOS (1955) destacou "mycophyl-ágar", meio de milho e BDA, como sendo os meios mais eficientes. Das faixas de temperatura avaliadas pelo autor, a de 20-25°C foi a que proporcionou uma maior esporulação, não ocorrendo esporulação abaixo de 15°C. Conídios formados em meio de cultura, apresentaram tamanho e forma iguais aos obtidos de folhas de bananeira no campo.

STOVER (1976) analisando isolados de *Mycosphaerella spp* de diferentes países da América do Sul, Central e Ásia, observou a presença de diferentes setores em colônias dos fungos cultivados em meio de "mycophyl-ágar", sob temperatura e luz ambiente. Setores com esporulação estável de conídios foram encontrados em colônias de *M. musicola* com 10-14 dias de idade. Colônias de *M. fijiensis* e *M. fijiensis var. difformis* apresentaram formação de conídios somente nos primeiros dias após as inoculações dos meios.

Segundo MEREDITH & LAWRENCE (1970) isolados de *M. musicola* procedentes das Filipinas, quando cultivados em BDA, apresentaram desenvolvimento lento, formando colônias visíveis somente após o 3º dia de incubação. As colônias, inicialmente de coloração pálida e cinza, tornaram-se verde-escuras após 5 dias de incubação. O crescimento das colônias foi limitado, atingindo um diâmetro máximo de 1,2

cm após 32 dias de incubação à 26°C. Não foi observada a formação de esporodóquios, porém conidióforos com conídios foram produzidos com 2-3 dias de incubação. Os conídios foram, em geral, maiores (média de 72,0 µm) e mais estreitos (média de 3,0 µm) do que os produzidos *in vivo* (média de 56,0 x 3,4 µm). A esporulação foi interrompida 2-3 dias após ter sido iniciada.

Em meio V8, MEREDITH & LAWRENCE (1970) observaram que as colônias de *M. musicola* apresentaram coloração pálida e cinza, com grande quantidade de micélio aéreo e ausência de esporulação. Em todos os meios testados, os autores notaram a formação de corpos com formato de frascos após 7-10 dias de incubação, os quais foram associados a possíveis protoperitécios. Espermogônias e setores com esporulação estável de conídios não foram observadas.

FOURÉ & LECOST (1988) relatam a produção *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella spp* patogênicos à banana. Suspensões de conídios na concentração de $1,1 \times 10^4$ conídios/ml foram obtidas de colônias dos fungos isoladas a partir de ascósporos e cultivadas em meio V8 por 14 dias.

MOURICHON et alii (1987) conseguiram suspensões de conídios de *Mycosphaerella fijiensis* na concentração de 4×10^4 conídios/ml a partir de colônias do fungo cultivadas por 10 dias, em meio V8 modificado sob regime de

luz contínua a 25°C. Resultados semelhantes foram encontrados por JACOME et alii (1991) e JACOME & SCHUH (1992), os quais conseguiram esporulação de conídios de isolados de *M. fijiensis var difformis*, procedentes de Honduras, cultivados em meio de "mycophil-agar" e suco V8, por 14-21 dias, a 20°C, sob regime de luz contínua.

NATURAL (1989) relata a produção de conídios de *M. musicola* a partir de isolados do fungo cultivados em meio de BDA, glucose + água de coco + extrato de levedura (CGYEA), extrato de levedura + Czapek (CzYEA), extrato de levedura + glucose (SmGYEA) e V8-ágar, após 14-21 dias de incubação, a 22 e 25°C, sob regime de luz contínua.

JACOME & SCHUH (1993b) observaram que a luminosidade foi um fator importante para esporulação *in vitro* de conídios de *M. fijiensis var difformis*: culturas do fungo, quando mantidas sob regime de luz contínua (luz fluorescente), apresentaram esporulação em grande quantidade, ao contrário das submetidas ao regime de luz alternada (12 horas luz), onde apenas poucos conídios foram observados, colônias de *M. fijiensis var difformis*, cultivadas em condições de escuro contínuo, não apresentaram esporulação. Verificaram também, o efeito da temperatura na produção *in vitro* de conídios de 6 isolados de *M. fijiensis var difformis*, cultivados em meio de "mycophyl-ágar" sob luz contínua: a esporulação foi maior a 20°C ($0,23-2,23 \times 10^3$ conídios/placa/dia), decrescendo substancialmente a 25°C ($0,04-$

1,43 x 10³ conídios/placa/dia) e a 30°C (0,004-0,59 x 10³ conídios/placa/dia); a 35°C não houve esporulação do fungo. Encontraram ainda, diferenças significativas entre a quantidade de esporulação dos isolados dentro de uma mesma faixa de temperatura.

2.2- Inoculação de mudas de bananeiras com *Mycosphaerella spp* em condições de casa-de-vegetação.

A infecção de folhas de bananeiras por *Mycosphaerella spp* é fortemente influenciada pelos fatores climáticos (temperatura, chuva, umidade relativa do ar), susceptibilidade da variedade de bananeira, idade da folha inoculada e concentração de inóculo.

A germinação de conídios e ascósporos de *Mycosphaerella spp* patogênicos a bananeira, se dá em uma faixa de temperatura que vai de 15 a 35°C e umidade relativa de 92 a 100%. O ótimo da germinação de conídios de *M. musicola* é obtido à 25-29°C e 98-100% de U.R. Nestas condições, conídios de *M. musicola* levam de 2-3 horas para iniciarem a germinação, sendo que os tubos germinativos surgem inicialmente das células localizadas nas extremidades dos conídios (MEREDITH,1970).

JACOME et alii (1991) verificaram que para

esporos (conídios e ascosporos) de *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*, o ótimo para esporulação ocorreu a 26,5°C em condição de água livre. Umidade relativa de 92-100% foi favorável para germinação de conídios, enquanto que ascosporos só germinaram em condição de U.R. igual ou superior a 98%. Em condições ótimas, conídios de *M. fijiensis* var. *difformis* possuem taxa de germinação de 90%, após 16 horas de incubação.

No campo, há evidências de que a maioria das infecções de *M. musicola* ocorre na primeira folha da bananeira (folha tipo "vela" que encontra-se enrolada), com os esporos sendo depositados na superfície inferior da mesma. A susceptibilidade das folhas de bananeira a *M. musicola* decresce com o aumento da idade . Folhas de número 1 a 3, contadas do ápice para a base do pseudocaule, são mais susceptíveis que as demais (MEREDITH,1970).

Os tubos germinativos dos conídios de *Mycosphaerella musicola* possuem desenvolvimento epifítico na superfície da folha de bananeira, por 4-6 dias, até que ocorra a penetração através dos estômatos. Em condições de campo, o crescimento ocorre na presença de água livre ou em condição de umidade relativa próximo a 100%. Nas estações de seca, o tubo germinativo desenvolve-se somente à noite, quando existe a formação de orvalho e as temperaturas são

mais amenas. Durante as horas mais quentes e secas do dia o crescimento é paralizado (MEREDITH,1970; STOVER,1972). Em condições adversas para germinação, conídios de *M. musicola* podem sobreviver de 3-4 semanas nas superfícies das folhas de bananeiras (STOVER, 1970).

O período de incubação do mal-de-Sigatoka é influenciado pela temperatura, chuva e umidade relativa. Nas épocas mais quentes e chuvosas do ano, o período de incubação da doença tende a ser mais curto quando comparado com os das épocas mais frias e secas (MEREDITH, 1970; STOVER, 1972; MARTINEZ,1973; GALINDO AVAREZ,1991).

JACOME & SCHUH (1992) verificaram que o período de incubação da Sigatoka negra, em mudas de bananeiras inoculadas com conídios e ascospores de *M. fijiensis var difformis*, era diretamente relacionado com o número de horas de molhamento das folhas após a inoculação . Plantas, submetidas a um período de molhamento de 18 horas (o mais longo), apresentaram período de incubação de 14 dias, 7-14 dias mais curto que os obtidos com os menores períodos de molhamento. Segundo estes autores, a severidade da doença foi influenciada pela umidade relativa do ambiente onde as plantas permaneceram após a inoculação. Plantas inoculadas, que permaneceram em ambientes com U.R. $\leq$ 90%, não desenvolveram sintomas da doença.

Brun citado por STOVER (1972), classificou o desenvolvimento das lesões do mal-de-Sigatoka em 5 estádios: estágio I— Pintas amareladas com menos de 1 mm de comprimento aparecem na superfície das folhas; estágio II— As pintas evoluem para estrias de coloração amarelada, com comprimento de 3-4 mm e 1 mm de largura; estágio III— As estrias tornam-se mais largas e mais compridas. As margens não são bem definidas e misturam-se com a coloração normal das folhas. Ao final deste estágio, as lesões passam a ter coloração marrom; estágio IV— As manchas apresentam contorno bem definido com o centro marrom e halo amarelo ao redor das lesões. Inicia-se a diferenciação de esporodóquios. Conídios podem estar presentes nas lesões; estágio V— Manchas completamente desenvolvidas. O centro das lesões torna-se cinza e as bordas apresentam coloração escura ou preta. Em alguns casos, existe a formação de halo clorótico entre a lesão e o tecido normal da folha.

O formato das manchas foliares provocadas por *M. musicola* varia de acordo com a idade da planta de banana. Em folhas de plantas jovens, as lesões possuem formato elíptico e são maiores e mais largas que as das plantas adultas, que possuem formato linear (McGAHAN & FULTON, 1965).

Sob condições normais, os primeiros sintomas das cercosporioses, manifestam-se na 3ª e 4ª folhas da

bananeira, contando-se do ápice para base. A evolução do sintoma estrias para manchas, pode variar de 12 a 50 dias, dependendo das condições ambientais, idade da folha inoculada e resistência da planta (STOVER, 1972; FOURÉ, 1985).

Variedades de bananeiras susceptíveis a *M. musicola* e *M. fijiensis* apresentam menor período de incubação e maior número de manchas e esporulação nas folhas do que variedades resistentes. Com o aumento do nível de resistência, aumenta também o tempo de transição entre os estádios de evolução da doença. Em algumas variedades resistentes, a evolução dos sintomas é interrompida nos seus primeiros estádios (STOVER, 1972; MEREDITH, 1970; FOURÉ, 1985; FOURÉ et alii, 1990).

VINCENTE (1983) observou que a concentração de inóculo (conídios e ascosporos) exerce influência sobre o período de incubação do mal-de-Sigatoka. Altas concentrações de suspensões de conídios de *M. musicola* reduziram em até 50 % o período de incubação da doença, quando comparado com as concentrações de inóculo mais baixas. Observações semelhantes foram feitas por STOVER (1972).

JACOME & SCHUH (1993a) encontram vários níveis de severidade de Sigatoka negra para diferentes isolados de *M. fijiensis* var. *difformis*. A variabilidade da agressividade estaria relacionada com diferente capacidade

de produção de fitotoxinas entre os isolados. Diferença de agressividade entre isolados de *M. musicola*, foi observada por FOURÉ & LECOST (1988). Os autores descrevem severos danos na variedade "Pome" de bananeira (Sub-grupo AAB), provocados por um isolado atípico do fungo.

Estudos, realizados por MOURICHON et alii (1987), comprovaram que cultivares de bananeira com diferentes graus de susceptibilidade a *M. fijiensis*, em condição de infecção natural no campo, podem apresentar a mesma reação diferenciada quando inoculadas sob condições controladas em casa-de-vegetação. A avaliação precoce do nível de resistência a *M. fijiensis*, foi realizada em mudas de bananeiras, com 6-8 semanas de idade, das cultivares nanicaço (Susceptível, sub-grupo AAA), Fougamou (Resistente, sub-grupo ABB) e Yangambi Km5 (Resistente, Sub-grupo AAA). Como inóculo os autores utilizaram suspensão de conídios a $1,5 \times 10^5$ conídios/ml e suspensão de micélio à 0,3 g micélio/ml, aplicados na superfície inferior das folhas. Técnica semelhante de inoculação, foi utilizada por FOURÉ (1984 ; 1985).

Os parâmetros normalmente empregados, para avaliação da susceptibilidade de cultivares de bananeiras a *M. fijiensis*, são o período de incubação, evolução dos sintomas, intensidade da esporulação sexuada e assexuada, germinação de esporos e eficiência de penetração (FOURÉ et alii 1990; MOURICHON et alii, 1987).

Os parâmetros acima citados, foram utilizados por LAVILLE (1983) para selecionar variedades de bananeiras resistentes a *M. musicola*.

2.3- Controle químico das cercosporioses da bananeira.

Segundo STOVER (1972), o controle químico do mal-de-Sigatoka pode ser dividido em quatro fases: emprego de calda bordalesa (1934-1958); óleo de petróleo (1956); emulsões de óleo e água com fungicidas ditiocarbamatos (1958-1973) e emulsões de óleo + água com fungicidas sistêmicos (1970).

Atualmente, o controle das cercosporioses da bananeira é feito quase que exclusivamente com o emprego de fungicidas sistêmicos dos grupos dos benzimidazóis e dos inibidores da biossíntese do ergosterol.

Benomyl e thiabendazole, veiculados em óleo, foram os primeiros fungicidas sistêmicos a controlar eficientemente o mal-de-Sigatoka sem causar fitotoxidez à bananeira (STOVER,1972).

MELIN (1973) comparou com o benomyl, o efeito dos fungicidas cypendazol, carbendazin e HOE 17411 (benzimidazol + carbamato), sobre o mal-de-Sigatoka. Obser-

vou que o fungicida cypendazol, nas doses empregadas, foi superior ao benomyl. Carbendazin teve a mesma eficácia do benomyl, e os resultados com HOE 17411 foram comparáveis aos do cypendazol. Em outro experimento o autor utilizou os fungicidas peltis (Metil-tiofanato 1.2 bis benzeno) e tecto-flow (Thiabendazol 1) e os comparou novamente com o benlate (Benomyl). Os produtos foram veiculados em óleo mineral (14 l/ha), nas doses de 150 g i.a. de benlate/ha; 300 g de i.a. de peltis/ha e 300 g de i.a. de tecto-flow/ha. Não foram constatadas diferenças entre as eficácias dos produtos testados.

Os benzimidazóis, quando veiculados em óleo, apresentam uma translocação desuniforme da superfície superior para a inferior da folha, permitindo a infecção do mal-de-Sigatoka em áreas onde a translocação não ocorre (STOVER, 1980).

Os produtos mais utilizados e aprovados para o controle das cercosporioses da bananeira, pertencentes ao grupo dos benzimidazóis, são o benomyl (Benlate), carbendazin (Derosal, bavistan, delsene), e thiabendazole (Tecto) (GARLINDO ALVAREZ, 1991). No Brasil, dos fungicidas sistêmicos citados, estão aprovados para bananeira, o benlate e o tecto 450 (ANDREI ,1990).

A partir de 1984, inicia-se a aplicação de

fungicidas inibidores da biossíntese do ergosterol como forma de controlar as cercosporioses da bananeira (BELLAI-RE, 1990).

FOURÉ & GRISONI (1984) e FOURÉ (1984) compararam o efeito dos fungicidas do grupo dos triazóis sobre *Mycosphaerella fijiensis*. Foram testados, entre outros, os fungicidas propiconazole, triadimenol e triadimefon, aplicados sobre bananeiras (*Musa acuminata*) do grupo cavendish e plátanos (*Musa balbisiana* x *Musa acuminata*). Segundo os autores, triadimenol e triadimefon apresentaram um controle efetivo da doença, tanto em plátanos quanto em bananeiras, quando aplicados no solo ao redor dos pseudocaules na dose de 0,25 g de i.a./planta. Propiconazole, aplicado nas folhas das bananeiras, na dosagem de 100 e 200 g de i.a./ha, foi mais eficiente para o controle da doença que o fungicida triadimenol no solo à 0,25 g i.a./planta. Em "plantains", triadimenol (0,5 g i.a./planta), aplicado via solo, apresentou maior eficiência de controle que o propiconazole (100 e 200 g de i.a./ha) pulverizado nas folhas. Resultados semelhantes foram obtidos por PEFOURA & FOURÉ (1988).

Para controle da Sigatoka negra (*M. fijiensis* var. *difformis*), VÁZQUEZ (1986) aplicou propiconazole sobre um plantio comercial de banana na América Central. O fungicida foi aplicado na dosagem de 100 g de i.a./ha, sendo veiculado em água, água + citrolina e água + óleo. Os três tratamentos mostraram eficiência semelhante, diminu-

indo gradualmente a incidência e severidade da doença, sem causar fitotoxidez às bananeiras.

Os fungicidas propiconazole, benomyl e triadimenol, entre outros, foram utilizados por RAMSEY et alii (1987) para controlar o mal-de-Sigatoka em "Queensland", na Austrália. Os autores observaram que todos os fungicidas foram eficientes no controle da doença. Propiconazole na dosagem de 50 g de i.a./ha + óleo mineral e 100 g de i.a./ha, foram os únicos tratamentos que eliminaram por completo, o problema de amadurecimento precoce dos frutos de banana provocado pela doença.

BELLAIRE (1990) propõe a aplicação alternada de tridemorphe, propiconazole e benomyl para controlar o mal-de-Sigatoka. Segundo o autor, aplicações destes 3 fungicidas com diferentes sítios de atuação sobre o patógeno, dificultariam o surgimento de isolados de *M. musicola* resistentes a estes produtos.

No Brasil, VENTURA et alii (1988) avaliaram o efeito do triadimenol sobre o mal-de-Sigatoka em plantas de bananeira da cv prata (AAB), nas doses de 1,0 e 2,0 g de i.a./touceira. Os resultados evidenciaram o controle da doença com o fungicida em relação a testemunha, não havendo em certas épocas do ano diferença significativa entre as doses testadas. GALINDO ALVAREZ (1991) observou que três

aplicações, via solo, do fungicida triadimenol (0,75 g i.a./touceira), reduziram significativamente as lesões nas folhas das bananeiras provocadas pelo Mal-de-Sigatoka e aumentaram o peso dos cachos e número de pencas comerciais, quando comparado com a testemunha sem tratamento.

ZAMBOLIM & CHAVES (1991) afirmam que a ação dos fungicidas sistêmicos sobre o fungo é muito específica, limitando-se geralmente à inibição da síntese de compostos essenciais ao metabolismo do patógeno, sendo uma das razões principais pelas quais estes produtos exercem uma marcada influência no desenvolvimento do fenômeno de resistência dos patógenos a fungicidas, quando são usados com frequência.

O aparecimento de isolados de fungos resistentes a fungicidas sistêmicos, tem sido descrito por diversos autores para diferentes patossistemas. MARIOTTO (1985) relata o aparecimento de isolados de *Cercosporidium personatum* (BERK & CURT) DEIGHTON, resistente a benzimidazóis em áreas onde o controle da doença Pinta-Preta do amendoim era feita com benomyl e carbendazim. Testes realizados *in vitro*, mostraram que o isolado resistente desenvolveu em meio com 100 ppm de benomyl enquanto que os sensíveis foram inibidos a 1 ppm do produto.

WEBBER et alii (1986) e WEBBER (1988) observaram *in vitro* isolados mutantes de *Ophiostoma ulmi*

resistentes ao fungicida methyl benzimidazole-2-ylcarbamate (MBC). Os isolados resistentes foram menos agressivos e tiveram menor capacidade de colonização do meio de cultura, quando comparado com os sensíveis. Isolados de *Venturia inaequalis* (CKE) WINT, resistentes a benomyl e dodine, foram encontrados por SHOLBERG et alii (1989), em várias regiões produtoras de maçã do Canadá, onde o controle da sarna da macieira era realizado com estes fungicidas. WICKS et alii (1987) relatam o surgimento de isolados de *Mycosphaerella brassicicola* resistentes a carbendazim em áreas de cultivo de repolho no sul da Austrália.

FOURCADE & LAVILLE (1973) relataram a obtenção *in vitro* de mutantes de *Mycosphaerella musicola* resistentes a benomyl. Conídios destes isolados, foram capazes de germinar em meio com até 1000 ppm de benomyl. Os autores estimaram em $1/10^6$ a taxa de frequência de isolados de *M. musicola* resistentes ao fungicida.

STOVER (1977; 1978 e 1979) detectou isolados de *M. musicola* e *M. fijiensis* var. *difformis*, resistentes a benomyl e não patogênicos à bananeira em áreas de cultivos comerciais, onde este fungicida era empregado. Conídios destes isolados resistentes germinaram e desenvolveram-se normalmente em meio de ágar-água com até 700 ppm de benomyl, sendo que os ascósporos só germinaram em meio com

até 200 ppm do fungicida.

JOYA (1982) observou uma maior frequência de isolados resistentes a benomyl em *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* do que em *M. musicola*, em plantações comerciais de banana onde este produto era empregado no controle destas cercosporioses.

Segundo FULLERTONE & TRACEY (1984), o aparecimento de isolados de *Mycosphaerella fijiensis*, resistentes a benomyl e carbendazim, provocou uma baixa eficiência do controle da doença estrias negras da folha, em plantações de banana de algumas ilhas do Pacífico. Sintomas típicos da doença foram observados pelos autores, 11 semanas após mudas de bananeiras terem sido inoculadas com um isolado de *M. fijiensis* resistente a carbendazim.

O amplo uso de benomyl no período de 1974-1977 para o controle da Sigatoka negra em Honduras, provocou o aparecimento de isolados de *Micosphaerella fijiensis* var. *difformis* tolerantes ao fungicida, a doses superiores a 300 ppm, tendo como consequência perda de controle da doença (WOODS at all, 1982). Segundo estes autores, a suspensão da aplicação de benomyl por 2 anos, reduziu o nível de tolerância dos isolados para 10 ppm. Com a reintrodução das aplicações de benomyl, alternadas com mancozeb + óleo mineral, em um período de um mês, o nível de tolerância dos isolados à

benomyl foi elevado para 200 ppm.

Em Guadalupe, BELLAVAIRE (1990) realizou monitoramento em áreas de plantio comercial de banana, para avaliar a sensibilidade de diferentes isolados de *Mycosphaerella musicola* aos fungicidas benomyl, tridemorph e propiconazole, que eram utilizados alternadamente no programa de controle do Mal-de-Sigatoka. Foram detectados isolados do fungo resistentes a benomyl, capazes de germinarem e desenvolverem em meios com até 50 ppm deste produto. Não foram observados isolados de *M. musicola* resistentes a propiconazole e tridemorph.

Segundo este autor, a ED₅₀ (dose do fungicida capaz de reduzir em 50 % o crescimento do tubo germinativo) do propiconazole para os isolados avaliados foi em torno de 0,005 ppm, enquanto que a ED₉₀ (dose do fungicida capaz de reduzir em 90 % o crescimento do tubo germinativo) variou de 5 a 100 ppm. Para tridemorph, a ED₅₀ foi de 3 ppm e a ED₉₀ variou de 24 a 29 ppm.

STOVER (1992) avaliou a sensibilidade à tridemorph de isolados de *Mycosphaerella fijiensis* obtidos em plantações de banana que receberam em média 4 a 6 aplicações anuais do fungicida. Não foi constatado a presença de isolados resistentes ao produto. A ED₅₀ e ED₉₀ de tridemorph para o fungo foi de 1 e 10 ppm respectivamente.

3- MATERIAL E MÉTODOS.

3.1- Local e época de realização dos experimentos.

Os experimentos foram realizados nos laboratórios e na casa-de-vegetação do Departamento de Fitopatologia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", no período de março de 1991 a dezembro de 1992.

3.2- Obtenção dos isolados *Mycosphaerella musicola*.

Os isolados de *Mycosphaerella musicola* foram coletados de janeiro de 1991 a julho de 1992, em plantações comerciais de banana localizadas no Estado de São Paulo, nos municípios de Ubatuba, Registro, São Simão e Piracicaba.

Pedaços de folhas de banananeiras com lesões da doença mal-de-Sigatoka, no estágio 4 da escala de Brun, descrita por STOVER(1972), foram desinfectadas em solução

de hipoclorito à 5%, sendo em seguida colocados em câmara úmida por 48 horas. Conídios de *Mycosphaerella musicola* formados nos esporodóquios das lesões, na superfície abaxial das folhas, foram transferidos para placas de Petri contendo meio V8 (100 ml de suco V8, 900 ml de água + 0,03 g de estreptomicina), e incubadas por 20 dias, a 23°C sob regime de luz contínua (luz fluorescente). Após a incubação, selecionaram-se os setores das colônias do fungo com maior capacidade de esporulação, sendo em seguida repicados para novas placas de Petri contendo meio V8.

Realizaram-se sucessivas seleções de setores esporulantes das colônias, até a obtenção de culturas de *Mycosphaerella musicola* com alta capacidade de esporulação de conídios.

Após a realização dos experimentos, os isolados foram conservados em tubos de ensaio contendo BDA + óleo mineral.

3.3- Produção *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola* em diferentes meios de cultura.

A produção *in vitro* de conídios de *M. musicola* foi avaliada nos meios de cultura V8 (100 ml de

suco V8; 15 g de agar; 2 g de CaCO_3 ; 900 ml de água destilada), BDA (200 g de batata; 20 g de dextrose; 20 g de agar; 1000 ml de água destilada) e meio de soja (20 g de farinha de soja; 20 g de agar, 20 g de dextrose; 1000 ml de água destilada).

No experimento utilizou-se uma suspensão de conídios de *M. musicola* do isolado de Piracicaba. Esta suspensão foi obtida a partir de colônias do fungo, cultivadas em meio de soja por 15 dias a 25°C e regime de luz contínua. Após a incubação, depositou-se 10 ml de água destilada esterilizada por placa, e com auxílio de um pincel, esfregou-se a superfície das mesmas. Utilizando-se um hemocitômetro, calibrou-se a concentração da suspensão para $3,6 \times 10^5$ conídios/ml.

Placas de Petri contendo aproximadamente 20 ml dos meios BDA, V8 e meio de soja, foram semeadas com 0,2 ml da suspensão conídios/placa, que foi homogeneizada por toda a superfície do meio com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas semeadas, foram mantidas sob incubação a 25°C sob regime de luz contínua (Câmara ambiental Biotronette Mark III, provida de 4 lampadas de luz fluorescente Phillips— luz do dia, 40 w a uma altura de 38 cm).

A avaliação, feita com base no número de conídios/placa, foi realizada em 5 períodos de incubação:

7, 14, 21, 28 e 35 dias. Suspensões de conídios foram obtidas separadamente de cada placa, conforme metodologia descrita anteriormente, e com auxílio de um hemocitômetro, determinaram-se as concentrações de conídios destas suspensões.

O delineamento experimental utilizado, foi blocos ao acaso em esquema fatorial com 5 repetições por tratamento. Cada repetição foi representada por uma placa.

3.4- Esporulação *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola* sob diferentes regimes de luz.

Dois experimentos foram realizados a fim de se verificar a influência da luminosidade na esporulação de *M. musicola*.

Nos ensaios foram avaliados os seguintes regimes de luz: luz contínua (luz fluorescente), luz alternada (12 horas luz fluorescente) e escuro contínuo.

Placas de Petri com aproximadamente 20 ml do meio de soja, foram semeadas com 0,2 ml de uma suspensão de conídios do isolado Piracicaba de *M. musicola*, na concentração de $3,4 \times 10^5$ conídios/ml. Após os semeios, as

placas foram mantidas sob incubação a 25°C nos diferentes regimes de luz citados anteriormente, por um período de 15 dias. A avaliação do experimento, teve por base o número médio de conídios obtidos nos tratamentos, Conforme metodologia descrita no item 3.3.

O delineamento experimental utilizado, foi o inteiramente ao acaso com 5 repetições/tratamento. Cada repetição foi representada por 1 placa de Petri.

3.5- Produção *in vitro* de conídios de diferentes isolados de *Mycosphaerella musicola*.

Avaliaram-se *in vitro*, as capacidades de produção de conídios dos isolados Piracicaba, São Simão, Ubatuba de *M. musicola*. Placas de Petri contendo aproximadamente 20 ml de meio de soja, foram semeadas com 0,2 ml das suspensões dos isolados, na concentração de $2,0 \times 10^5$ conídios/ml (Conforme item 3.3). Após os semeios, as placas foram mantidas a 25°C e regime de luz contínua.

As esporulações dos isolados foram quantificadas aos 8, 16, 24 e 32 dias de incubação. A avaliação teve por base, o número médio de conídios produzidos em cada tratamento, estimado conforme metodologia descrita no item 3.3.

O delineamento experimental empregado foi o inteiramente ao acaso em esquema fatorial. Cada tratamento teve 4 repetições, representada por uma placa.

3.6- Sensibilidade *in vitro* de isolados de *M. musicola* aos fungicidas propiconazole, triadimenol e benomyl.

Neste ensaio foram testadas as sensibilidades dos isolados Piracicaba, São Simão e Ubatuba de *M. musicola*, frente aos fungicidas benomyl, triadimenol e propiconazole (Tabela 1).

Placas de Petri contendo 20 ml de meio de soja, foram semeadas com suspensões de conídios dos referidos isolados na concentração de $2,0 \times 10^5$ conídios/ml, conforme metodologia descrita no item 3.3.

Discos de papel de filtro com 1,27 cm de diâmetro, foram embebidos nas soluções de fungicidas nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 ppm de ingrediente ativo e depositados nas placas previamente inoculadas. Em cada placa, depositaram-se 3 discos de papel embebidos com diferentes fungicidas, mas com a mesma concentração.

TABELA 1 - Fungicidas testados *in vitro* contra *Mycospha-
erella musicola*.

NOME TÉCNICO	PRODUTO COMERCIAL	FORMULAÇÃO
BENOMYL	BENLATE 500	PM
PROPICONAZOLE	TILT	CE
TRIADIMENOL	BAYFIDAN	CE

Após a montagem do experimento, as placas foram mantidas sob incubação por 10 dias, à temperatura de 25°C com fotoperíodo de 12 horas luz.

A avaliação, realizada após a incubação, teve por base o diâmetro médio dos halos de inibição provocados pelos fungicidas, subtraídos do diâmetro do papel.

No ensaio utilizou-se o delineamento experimental inteiramente ao acaso, em esquema fatorial com 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por um papel de filtro.

3.7- Detecção *in vitro* de mutantes de *Mycosphaerella musicola* resistentes a fungicidas.

Placas de Petri contendo aproximadamente 20 ml de meio de soja na concentração de 100 PPM dos fungicidas propiconazole, triadimenol e benomyl (Tabela 1), foram semeados com 0.2 ml de suspensões de conídios (4×10^5 conídios/ml) dos isolados Piracicaba, Ubatuba e São Simão de *M. musicola*, conforme metodologia descrita no item 3.3. O preparo do meio de cultura com fungicida, foi realizado através da incorporação de soluções estoques dos fungicidas diretamente no meio de soja após sua esterilização.

Realizadas os semeios, as placas permaneceram sob incubação por 30 dias, à temperatura de 25°C e regime de luz contínua (fluorescente).

A avaliação teve por base, o número de colônias de *M. musicola* formados em cada tratamento. Foram realizadas 4 repetições (Placa) por tratamento.

3.8- Desenvolvimento de linhagens de *Mycosphaerella musicola* resistentes a triadimenol e propiconazole em diferentes concentrações destes fungicidas.

As linhagens de *M. musicola* resistentes aos fungicidas propiconazole e triadimenol, obtidos no experimento 3.7., foram submetidos aos seguintes tratamentos:

Tratamento 1: Linhagem resistente a propiconazole cultivada em meio de soja mais 0; 1; 10; 100 e 1000 ppm de propiconazole.

Tratamento 2- Linhagem resistente a propiconazole cultivada em 0; 1; 10; 100 e 1000 ppm de triadimenol.

Tratamento 3- Linhagem resistente a triadimenol cultivada em 0; 1; 10; 100 e 1000 ppm de triadimenol.

Tratamento 4- Linhagem resistente a triadimenol cultivada em 0; 1; 10; 100 e 1000 ppm de propiconazole.

Tratamento 5- Isolado Registro, cultivado em 0; 1; 10; 100 e 1000 ppm de triadimenol.

Tratamento 6- Isolado Registro, cultivado em 0; 1; 10; 100 e 1000 ppm de propiconazole.

Suspensões de conídios na concentração de 2×10^2 conídios/ml do isolado Registro de *M. musicola* (Sensível aos

fungicidas) e das linhagens resistentes a triadimenol e propiconazole, foram obtidas de acordo com a metodologia descrita no item 3.3. Cada placa dos tratamentos recebeu 0,2 ml da suspensão de conídios, que foi distribuída uniformemente na superfície do meio com auxílio de uma alça de Drigalski. Após as inoculações, as placas foram incubadas à 25°C em regime de luz alternada (12 horas luz), por um período de 20 dias.

Cada tratamento contou com 3 repetições (Placa). A avaliação foi realizada após o período de incubação e teve por base o registro do aparecimento ou não de colônias de *M. musicola* nas repetições.

3.9- Teste de patogenicidade dos isolados de *Mycosphaerella musicola*.

Testaram-se a patogenicidade dos isolados Piracicaba, Ubatuba e São Simão de *M. musicola* e das linhagens de *M. musicola* resistentes aos fungicidas triadimenol e propiconazole.

Suspensões de conídios dos isolados na concentração de $3,5 \times 10^5$ conídios/ml, foram obtidas conforme metodologia descrita no item 3.3.

As mudas de bananeira cv nanica₀ com 4 meses de idade, obtidas através de cultura de tecido, foram inoculadas em condição de casa-de-vegetação. Com auxílio de um pulverizador manual, distribuíram-se as suspensões de conídios dos isolados do fungo, na superfície abaxial da primeira folha aberta das plantas, contando-se no sentido do ápice para base. Realizadas as inoculações, as plantas foram mantidas sob água livre por 72 horas. Após este período, as plantas foram irrigadas por 10 horas diariamente através de um sistema de aspersão. Inocularam-se 3 plantas por isolado, distribuídas inteiramente ao acaso na casa-de-vegetação. As plantas foram avaliadas diariamente a fim de se observar a aparição dos primeiros sintomas. Para se avaliar a evolução da doença, utilizou-se a escala desenvolvida por Brun descrita por STOVER (1972).

A temperatura e umidade relativa no interior da casa-de-vegetação, foram monitoradas através de um termohigrógrafo.

3.10- Efeito de diferentes concentrações de conídios de *Mycosphaerella musicola* sobre o desenvolvimento da doença mal-de-Sigatoka.

Como hospedeiros, utilizaram-se mudas de bananeira cv nanicão com 3 meses de idade. As mudas foram cultivadas em casa-de-vegetação em sacos plásticos (40 X 20 cm), contendo terra + esterco de gado como substrato.

Para as inoculações, foram utilizadas suspensões de conídios do isolado Ubatuba de *M.musicola* , nas concentrações de 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios/ml. As suspensões foram obtidas a partir de colônias do fungo com 16 dias de idade, cultivadas em meio V8, a 26°C, em regime de luz contínua.

As inoculações procederam conforme metodologia descrita no item 3.9. Após as inoculações, as mudas foram mantidas por 72 horas sob água livre. Decorrido este período, as plantas foram regadas por 10 horas diariamente através de aspersores.

O acompanhamento do desenvolvimento da doença, foi realizado com base na escala de Brun descrita por STOVER (1972). As avaliações foram feitas através de observações diárias das folhas inoculadas, iniciadas a partir do surgimento dos

primeiros sintomas e prolongando-se por 70 dias após as inoculações.

Nas avaliações observaram-se os seguintes parâmetros: Número de lesões/folha; porcentagem de área foliar infectada; período de incubação (dias); período de latência (dias).

A porcentagem de área foliar infectada, foi estimada através da pesagem de pedaços sacos plásticos transparentes com o mesmo tamanho e formato da área foliar total e área foliar infectada.

Cada tratamento contou com 5 repetições, sendo que cada repetição foi representada por 1 muda. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado.

3.11- Efeito da concentração do inóculo de *Mycosphaerella musicola* no desenvolvimento da doença mal-de-Sigatoka em mudas de bananeiras com diferentes idades.

Mudas de bananeira cv nanicão com 6 e 3 meses de idade, foram inoculadas com suspensões de conídios do isolado Ubatuba de *M. musicola*, nas concentrações de 10^0 , 10^2 , 10^4 e 10^6 conídios/ml. Após as inoculações, que procederam de acordo com a metodologia descrita no item 3.9, as mudas

foram matidas sob água livre por 72 horas, sendo em seguida regadas diariamente por um período de 10 horas.

As avaliações foram iniciadas com o surgimento dos primeiros sintomas, prolongando-se por 70 dias após as inoculações. Os parâmetros avaliados foram o período de incubação, período de latência e comparação visual da severidade da doença nos diferentes tratamentos.

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo que o número de repetições variou entre os tratamentos. Para os tratamentos que utilizaram mudas de 6 meses, foram realizadas 3 repetições. Nos tratamentos com mudas de 3 meses, realizaram-se 4 repetições. Cada repetição foi representada por 1 muda.

3.12- Comportamento de cultivares de bananeiras com relação ao mal-de-Sigatoka, em condição de casa-de-vegetação.

Avaliaram-se em condição de casa-de-vegetação, o comportamento das cultivares nanicação (AAA) susceptível, Prata (AAB) susceptível e Mysore (AAB) resistente, com relação à doença mal-de-Sigatoka.

Mudas das cultivares com 4 meses de idade, foram inocula-

das conforme metodologia descrita no item 3.9. Como inóculo, utilizou-se suspensão de conídios do isolado Registro de *M. musicola*, na concentração de 5×10^8 conídios/ml. Os tratamentos foram distribuídos ao acaso na casa-de-vegetação. Cada tratamento contou com 3 repetições, sendo cada repetição constituída por uma muda.

Os parâmetros utilizados para avaliação das cultivares, foram os períodos de incubação e latência, número de lesões e área foliar infectada (Obtida conforme o item 3.10) das folhas inoculadas, determinada 70 dias após as inoculações.

4- RESULTADOS.

4.1- Produção *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola*.

Todos isolados de *Mycosphaerella musicola*, produziram conídios em meio V8. As colônias esporulantes do fungo apresentaram desenvolvimento lento e localizado, com micélio liso de coloração negra (Figura 1). As hifas destas colônias apresentaram forma característica de " sino " e os conidióforos eram simples e septados, com tamanho médio de 28,62 X 4,10 μ m, formando de 3-4 conídios em suas extremidades. Não foram observadas cicatrizes nos conidióforos.

Os conídios de *Mycosphaerella musicola*, produzidos *in vitro*, possuíam coloração pálida e formato cilíndrico alongado, com 2-7 septos e tamanho médio de 53,59 X 3,77 μ m.

Formação de setores estéreis (sem produção de conídios), foi observada nas colônias dos isolados de *M. musicola*, após 40 dias de incubação. Em geral, estes setores apresentaram

Figura 1- Colônias de *Mycosphaerella musicola* com produção de conídios (A); colônias de *M. musicola* originadas de setores estéreis sem produção de conídios (B).

micélio cotonoso de coloração cinza, branca ou rosa. Colônias oriundas destes setores, possuíam crescimento localizado e a mesma coloração dos micélios que as originaram (Figura 1). Não foram encontradas esporulações de conídios nas colônias de *M. musicola* obtidas a partir de setores estéreis.

4.2- Esporulação *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola* em diferentes meios de cultura.

Verificou-se uma interação significativa entre os meios de cultura e períodos de incubação, para produção *in vitro* de conídios de *M. musicola*. Dentre os meios testados, o V8 foi o que proporcionou maior esporulação do fungo aos 7, 21 e 28 dias de incubação (101,4; 179,1 e 187,1 $\times 10^5$ conídios/placa, respectivamente), não diferindo estatisticamente do meio de soja aos 14 e 35 dias (Tabela 2). Em meio de soja, as esporulações aos 14, 21 e 28 dias (187,5; 126,3 e 95,0 $\times 10^5$ conídios/placa, respectivamente), foram superiores as obtidas em meio de BDA. Aos 7 e 35 dias de incubação, as produções de conídios em BDA e meio de soja não diferiram estatisticamente pelo teste Tukey ao nível de 5%.

As esporulações de conídios de *Mycosphaerella musicola* em meio V8, foram maiores aos 14, 21 e 28 dias de incubação (Tabela 2 e Figura 2), enquanto que em meio de soja, a maior

TABELA 2- Influência do meio de cultura e período de incubação na produção de conídios de *Mycosphaerella musicola*.

	<u>Nº de conídios (X10⁵)/placa* com incubação (em dias) de</u>				
	7	14	21	28	35
VB	101,4 Ba	169,7 Aa	179,1 Aa	187,1 Aa	114,2 Ba
M. SOJA	35,0 Cb	187,5 Aa	126,3 Bb	95,0 Bb	81,4 BCab
BDA	34,4 Ab	48,2 Ab	52,2 Ac	30,8 Ac	42,0 Ab

C.V.= 28,01%

* Médias de 5 repetições; médias com as mesmas letras (Maiúscula na linha e minúscula na coluna), não diferiram estatisticamente ao nível de 5% (Tukey).

Figura 2- Produção *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola* em diferentes meios de cultura.

quantidade de conídios foi obtida aos 14 dias. Acentuada queda na produção de conídios foi verificada aos 35 dias de incubação em meio V8 e aos 21 dias em meio de soja (Figura 2). Em meio de BDA, não houve diferenças significativas de produções de conídios de *M. musicola* entre os períodos de incubação observados.

4.3- Esporulação *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola* sob diferentes regimes de luz.

Dentre os tratamentos avaliados, o regime de luz contínua foi o que proporcionou uma maior esporulação de *Mycosphaerella musicola*, tanto no Experimento I (170.90×10^5 conídios/placa) quanto no Experimento II (245.20×10^5 conídios/placa) (Tabela 3). As esporulações de conídios em culturas de *M. musicola*, mantidas sob regime de luz alternada, foram superiores às obtidas em regime de escuro contínuo. Entretanto, os dois tratamentos não diferiram estatisticamente ao nível de 5%.

4.4- Produção *in vitro* de conídios de diferentes isolados de *Mycosphaerella musicola*.

Observou-se, entre os isolados de *Mycosphaerella musicola*

Tabela 3- Influência do regime de luz sobre a esporulação *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola*.

REGIME DE LUZ	Nº de conídios (X10 ⁵)/placa*	
	EXPERIMENTO I	EXPERIMENTO II
LUZ CONTÍNUA	170,90 A	245,20 A
LUZ ALTERNADA**	17,81 B	9,75 B
ESCURO CONTÍNUO	6,00 B	0,50 B
C.V.=	20,00%	30,06%

* Médias de 5 repetições; Médias com as mesmas letras, na coluna, não diferiram estatisticamente ao nível de 5% (Tukey).

** Regime de 12 horas luz.

avaliados, uma diferença significativa na capacidade de produção *in vitro* de conídios. O isolado Piracicaba foi o que mostrou maior capacidade de esporulação de conídios, sendo superior aos isolados Ubatuba e São Simão aos 16, 24 e 32 dias de incubação (131.2; 381.2 e 172.5 X 10⁵ conídios/placa respectivamente), não diferindo estatisticamente dos mesmos aos 8 dias (Tabela 4). Não houve diferença estatística entre as produções de conídios dos isolados São Simão e Ubatuba. Aos 24 dias de incubação, foi observada a maior produção de conídios do isolado Piracicaba, tendo reduzido drasticamente sua produção aos 32 dias (Figura 3 e Tabela 4). As maiores produções de conídios do isolado São Simão foram observadas aos 24 e 32 dias de incubação.

Não foram encontradas variações estatisticamente significativas nas produções de conídios nos diferentes períodos de incubação do isolado Ubatuba.

4.5- Sensibilidade *in vitro* de isolados de *Mycosphaerella musicola* aos fungicidas propiconazole, triadimenol e benomyl.

Não houve interação entre isolados de *Mycosphaerella musicola* e os fungicidas testados.

TABELA 4- Esporulação *in vitro* de conídios de isolados de *Mycosphaerella musicola* em diferentes períodos de incubação.

	Nº de conídios ($\times 10^3$)/placa* com incubação (em dias) de			
	8	16	24	32
PIRACICABA	35,4 Ca	131,2 Ba	381,2 Aa	172,5 Ba
S. SIMÃO	8,5 Ba	12,4 ABb	55,7 Ab	46,1 Ab
UBATUBA	3,8 Aa	13,8 Ab	26,7 Ab	11,1 Ab

C.V. = 30,91%

* Médias de 4 repetições; médias com as mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferiram estatisticamente ao nível de 5% (Tukey).

Figura 3- Produção *in vitro* de conídios de diferentes isolados de *Mycosphaerella musicola*.

Dentre os fungicidas utilizados, propiconazole foi o que proporcionou maiores halos de inibição no desenvolvimento de *M. musicola*, nas doses de 1 e 10 ppm, não diferindo dos demais tratamentos a 100 ppm (Tabela 5). O fungicida triadimenol foi superior ao benomyl a 10 ppm, não havendo diferenças significativas entre estes na dosagem de 1 ppm.

Nenhum dos fungicidas testados provocou halos de inibição em *M. musicola* na dosagem de 0.1 ppm. O fungicida benomyl, ao contrário do triadimenol e propiconazole, só inibiu o desenvolvimento *in vitro* de *M. musicola* na concentração de 100 ppm (Tabela 5).

O desenvolvimento do halo de inibição de *M. musicola* proporcionado por diferentes concentrações do fungicida propiconazole, pode ser observado na figura 4. Verifica-se um aumento gradativo do halo de inibição em função do aumento da concentração do fungicida.

4.6- Detecção *in vitro* de mutantes de *Mycosphaerella musicola* resistentes a fungicidas.

Foram detectadas mutantes de *M. musicola* resistentes aos fungicidas propiconazole e triadimenol, o mesmo não ocorrendo para benomyl.

TABELA 5- Efeito dos fungicidas triadimenol, benomyl e propiconazole sobre o desenvolvimento *in vitro* de *Mycosphaerella musicola*.

	Halos de inibição (cm)*, nas concentrações (em ppm) de			
	0,1	1	10	100
PROPICONAZOLE	0,0 A	1,36 A	2,51 A	3,29 A
TRIADIMENOL	0,0 A	0,07 B	0,43 B	3,27 A
BENOMYL	0,0 A	0,00 B	0,00 C	3,22 A

C.V. = 25,90%

* Médias referentes a 12 repetições; Médias com as mesmas letras, na coluna, não diferiram estatisticamente ao nível de 5% (Tukey).

Figura 4- Efeito de diferentes concentrações de propiconazole sobre o desenvolvimento *in vitro* de *Mycosphaerella musicola*.

As frequências dos mutantes resistentes ao propiconazole nos isolados Piracicaba e São Simão de *M. musicola*, foram de 1 e 10 colônias/ $3,2 \times 10^5$ conídios respectivamente. Mutantes resistentes ao triadimenol, foram encontrados apenas no isolado São Simão, a uma frequência de 3 colônias/ $3,28 \times 10^5$ conídios (Tabela 6). O isolado Ubatuba não apresentou mutantes resistentes aos fungicidas testados.

Colônias de mutantes de *M. musicola* resistentes ao propiconazole e triadimenol, apresentaram crescimento lento com micélios cotonoso de coloração cinza (Figura 5). Hifas com células em forma de "sino", características de *M. musicola* patogênica à bananeira, não foram observadas nas mutantes resistentes a fungicidas. Os conidióforos sem cicatrizes, septados e não ramificados, apresentaram coloração pálida e tamanho médio de $17,02 \times 1,84 \mu\text{m}$, formando 3-4 conídios em sua extremidade. Os conídios de pigmentação amarelada, possuíam formato cilíndrico alongado com 0-4 septos e tamanho médio de $19.78 \times 2.48 \mu\text{m}$.

Ao contrário do que ocorreu nas colônias do isolados de *M. musicola*, não foi observada a formação de setores nas colônias dos mutantes de *M. musicola* resistentes ao triadimenol e propiconazole mesmo após 60 dias de incubação (Figura 5).

TABELA 6- Frequência de mutantes de *Micosphaerella musicola* resistentes a 3 fungicidas.

	<u>Nº de colônias/3,2X10⁸ conídios* dos isolados de</u>		
	<u>UBATUBA</u>	<u>PIRACICABA</u>	<u>S. SIMÃO</u>
BENOMYL	0	0	0
PROPICONAZOLE	0	1	10
TRIADIMENOL	0	0	3

* Em 4 placas de Petri contendo meio de soja com 100 ppm do fungicida.

Figura 5- Colônias de *Mycosphaerella musicola* em meio de soja com 60 dias de idade. Mutante resistente a propiconazole (Esquerda); Isolado Registro, sensível a fungicidas (Direita).

4.7- Sensibilidade *in vitro* de linhagens de *Mycosphaerella musicola* resistentes ao triadimenol e propiconazole em diferentes concentrações destes fungicidas.

Conforme observa-se na tabela 7, a linhagem de *Mycosphaerella musicola* resistente ao propiconazole, foi capaz de se desenvolver em todas as concentrações testadas deste fungicida e em triadimenol somente até a dose de 100 ppm.

A linhagem de *M. musicola* resistente ao triadimenol, desenvolveu-se em meio com propiconazole e triadimenol até a concentração de 100 ppm, sendo inibida por ambos os fungicidas a 1000 ppm.

O isolado Registro, foi sensível a todas as concentrações de propiconazole. Em meio com triadimenol, só houve desenvolvimento deste isolado na dose de 1 ppm do fungicida.

4.8- Teste de patogenicidade dos isolados de *M. musicola*.

Todos isolados de *M. musicola* foram patogênicos a bananeira. Folhas de bananeiras inoculadas com suspensões de conídios, apresentaram um período médio de incubação de 25 dias. Os primeiros sintomas visíveis do mal-de-Sigatoka,

TABELA 7- Sensibilidade das linhagens de *Mycosphaerella musicola* aos fungicidas triadimenol e propiconazole.

		Desenvolvimento* de <i>M. musicola</i> nas concentrações (ppm) de				
LINHAGEM	FUNGICIDA	0	1	10	100	1000
RP	PROPICONAZOLE	+	+	+	+	+
	TRIADIMENOL	+	+	+	+	-
RT	PROPICONAZOLE	+	+	+	+	-
	TRIADIMENOL	+	+	+	+	-
S	PROPICONAZOLE	+	-	-	-	-
	TRIADIMENOL	+	+	-	-	-

RP= Resistente a propiconazole; RT= Resist. a triadimenol.

S= Selvagem.

* Em 3 placas de Petri/tratamento, contendo meio + fungicida;

(+) Desenvolvimento de colônias; (-) Sem desenvolvimento de colônias.

foram as estrias amareladas (Estádio II na escala de Brun), aparecendo inicialmente na superfície superior das folhas. A evolução dos sintomas tipo estrias amarelas para estrias marrons (Estádio III na escala de Brun), demorou em média 6 dias. Aos 36 dias após as inoculações, foram observadas as primeiras manchas marrons (Estádio IV), com presença de esporodóquios e conídios de *M. musicola* na superfície destas lesões. Manchas negras com centro cinza e halos cloráticos (Estádio V), só foram observadas 48 dias após as plantas terem sido inoculadas. Não foram observadas diferenças de agressividade entre os isolados de *M. musicola*.

Mudas de bananeira inoculadas com linhagens de *M. musicola* resistentes ao triadimenol e propiconazole não apresentaram sintomas do mal-de-Sigatoka.

4.9- Efeito de diferentes concentrações de inóculo de *Mycosphaerella musicola* sobre o desenvolvimento da doença mal-de-Sigatoka.

O desenvolvimento da doença mal-de-Sigatoka foi altamente influenciado pela concentração das suspensões de conídios de *M. musicola*. Observou-se uma redução gradativa dos períodos de incubação e latência do mal-de-Sigatoka, a medida que se aumentou a concentração de inóculo (Figuras 6 e 7). Nas

Figura 6- Efeito de diferentes concentrações de suspensões de conídios de *Mycosphaerella musicola* sobre o período de incubação do mal-de-Sigatoka.

Figura 7- Efeito de diferentes concentrações de suspensões de conídios de *Mycosphaerella musicola* sobre o período de latência do mal-de-Sigatoka.

concentrações de 10^1 , 10^2 , 10^3 conídios/ml, os períodos de incubações e latências foram significativamente maiores que os encontrados nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios/ml (Tabela 8). Suspensão de conídios de *M. musicola* na concentração de 10^6 conídios/ml proporcionou as menores médias para os períodos de incubação e latência do mal-de-Sigatoka.

O número médio de lesões provocadas pelo mal-de-Sigatoka nas folhas inoculadas, foi maior para a suspensão de conídios de *M. musicola* na concentração de 10^6 conídios/ml, não diferindo estatisticamente da concentração 10^5 conídios/ml (Tabela 8). As concentrações 10^1 , 10^2 e 10^3 conídios/ml provocaram um número reduzido de lesões.

A área foliar infectada pelo mal-de-Sigatoka foi maior nas mudas de bananeiras inoculadas com suspensão de conídios de *M. musicola* na concentração de 10^6 conídios/ml quando comparado com as concentrações 10^4 e 10^5 conídios/ml. Folhas inoculadas com suspensões de conídios de *M. musicola* nas concentrações de 10^1 , 10^2 e 10^3 conídios/ml apresentaram área foliar infectada com valores insignificantes (Tabela 8).

Áreas necrosadas, provocadas pelo coalescimento entre as lesões do mal-de-Sigatoka, foram observadas em algumas folhas inoculadas com suspensões de *M. musicola* nas concen-

TABELA 8- Efeito da concentração da suspensão de conídios de *Mycosphaerella musicola* sobre o desenvolvimento da doença Mal-de-Sigatoka.

CONÍDIOS/ml	CARACTERES*				
	PERÍODO INCUBAÇÃO**	PERÍODO LATÊNCIA**	Nº LESÕES /FOLHA		% ÁREA FOLIAR INFECTADA
			(X)	LOG(X)	
10 ¹	58,60 ab	64,20 a	1,80	0,22 c	nd***
10 ²	59,20 a	66,20 a	2,20	0,28 c	nd
10 ³	54,20 b	61,60 a	3,20	0,38 c	nd
10 ⁴	39,60 c	50,60 b	40,60	1,46 b	31,11
10 ⁵	37,00 cd	47,80 b	260,20	2,03 ab	49,89
10 ⁶	32,60 d	39,00 c	441,60	2,52 a	78,34

Incubação C.V.= 5,39%

Latência C.V.= 6,38%

Nº Lesões C.V.= 38,43%

* Dados médios de 5 repetições.

** Em dias.

*** Valores não dimensionados.

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferiram estatisticamente ao nível de 5% (Tukey).

trações de 10^2 , 10^3 e 10^4 conídios/ml.

4.10- Efeito da concentração de inóculo de *M. musicola* no desenvolvimento da doença mal-de-Sigatoka em mudas de bananeira com diferentes idades.

Não foi verificada interação significativa entre concentração de inóculo de *M. musicola* e idade das mudas de bananeira para o período de incubação do mal-de-Sigatoka (Tabela 9). Interação significativa no entanto, foi observada entre os fatores acima mencionados para o período de latência do mal-de-Sigatoka. Plantas de bananeira com 6 meses de idade, apresentaram maiores períodos de latência da doença do que os das plantas com 3 meses, em todas as concentrações de inóculo testadas (Tabela 9).

Tanto para mudas de 6 meses quanto para de 3, o período de incubação e latência do mal-de-Sigatoka foi incrementado em função inversa ao aumento da concentração de inóculo de *M. musicola* (Figuras 8, 9 e 10).

Mudas de bananeiras (3 e 6 meses de idade) apresentaram alta severidade do mal-de-Sigatoka quando inoculadas com suspensões de conídios na concentração de 10^2 conídios/ml (Figura 11).

TABELA 9- Influência da idade da muda de bananeira e concentração da suspensão de conídios de *Mycosphaerella musicola* no período de incubação e latência do Mal-de- Sigatoka.

IDADE DA MUDA	INCUBAÇÃO (DIAS)			LATÊNCIA (DIAS)		
	10 ²	10 ⁴	10 ⁶	10 ²	10 ⁴	10 ⁶ *
6 MESES**	54,7 A	32,5 A	25,5 A	69,0 A	52,3 A	41,7 A
3 MESES***	43,8 A	31,3 A	22,3 A	51,5 B	40,5 B	33,8 B

INCUBAÇÃO C.V.= 19,79%.

LATÊNCIA C.V.= 3,13%.

* Conídios/ml.

** Média de 3 repetições.

*** Média de 4 repetições.

Médias com as mesmas letras na coluna, não diferiram estatisticamente ao nível de 5% (Tukey).

Figura 8- Influência da concentração de conídios de *Mycosphaerella musicola* sobre o período de incubação do mal-de-Sigatoka em mudas de bananeira com 3 e 6 meses de idade.

Figura 9- Influência da concentração de conídios de *Mycosphaerella musicola* sobre o período de latência do mal-de-Sigatoka em mudas de bananeira com 3 meses de idade.

Figura 10- Influência da concentração de conídios de *Mycosphaerella musicola* sobre o período de latência do mal-de-Sigatoka em mudas de bananeira com 6 meses de idade.

Figura 11- Folhas de mudas de bananeira com 3 (A) e 6 (B) meses de idade inoculadas com suspensões de conídios de *Mycosphaerella musicola* nas concentrações de 10^6 , 10^4 e 10^2 conídios/ml.

Na concentração de 10^4 conídios/ml foi verificada uma maior severidade da doença em mudas de 3 meses de que em 6. Poucas lesões (1 a 3 lesões/folha) provocadas pelo mal-de-Sigatoka, foram observadas nas folhas das mudas de bananeira de ambas as idades, inoculadas com suspensões de conídios na concentração de 10^2 conídios/ml (Figura 11).

Suspensões de conídios de *M. musicola* na concentração de 10^2 conídios/ml, não provocaram sintomas do mal-de-Sigatoka.

4.11- Comportamento de variedades de bananeira com relação à doença mal-de-Sigatoka, em condição de casa-de-vegetação.

Das cultivares de bananeira avaliadas, a cv mysore foi a que demonstrou maior resistência ao mal-de-Sigatoka. Mudas desta cultivar apresentaram os maiores valores médios para períodos de incubação e latência da doença, bem como as menores médias para número de lesões e porcentagem de área foliar infectada (Tabela 10 e Figura 12).

As cultivares prata e nanicao apresentaram períodos de incubação e latência do mal-de-Sigatoka bastante semelhantes, porém na cv prata, a severidade da doença foi maior que na cv nanicao (Tabela 10).

TABELA 10- Comportamento de cultivares de bananeira com relação ao Mal-de-Sigatoka.

CULTIVAR	CARACTERES*			
	Nº LESÕES /FOLHA	% ÁREA FOLIAR INFECTADA	PERÍODO INCUBAÇÃO	PERÍODO LATÊNCIA**
PRATA	478	54,26	44,30	51,00
NANICÃO	278	39,75	41,60	50,00
MYSORE	35	1,56	51,30	67,00

* Dados médios de 3 repetições.

** Em dias.

Figura 12- Folhas das cultivares de bananeira mysore, prata e nanico (da esquerda para direita) inoculadas com suspensões de conídios de *Mycosphaerella musicola*.

5 - DISCUSSÃO.

O lento desenvolvimento das colônias dos isolados de *Mycosphaerella musicola*, concorda com o observado por CALPOUZOS (1955) e MEREDITH & LAWRENCE (1970). Estes autores verificaram um diâmetro máximo de 1.2 e 1.5 cm para colônias de *M. musicola* cultivadas em BDA, após períodos de incubações de 38 e 45 dias, respectivamente. Presenças de setores de coloração branca, cinza e rosa em colônias de *M. musicola* constatados no presente trabalho (Fig. 1), também foram relatados pelos referidos autores. Segundo CALPOUZOS (1955), a formação de "setores" em colônias de *M. musicola* foi provocada por heterocariose. Tamanho e forma dos conidióforos e conídios observados nos isolados de *M. musicola*, foram semelhantes ao descrito por MEREDITH (1970) e MEREDITH & LAWRENCE (1970). A presença de hifas de *M. musicola* com formato de "sino", foi descrita por STOVER (1978), como sendo uma característica somente constatada em isolados patogênicos do fungo.

A esporulação *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola* foi influenciada pelo meio de cultura,

período de incubação, regime de luz e isolado do fungo.

Em todos os meios testados, foram constatadas produções de conídios de *M. musicola* porém com uma maior eficiência nos meios V8 e meio de soja (Tabela 2). A eficiência do meio V8 para esporulação de *M. musicola*, concordou com os resultados obtidos por MOURICHON et alii (1987) e FOURÉ & LECOST (1988), que utilizaram este meio para produção *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella spp.* patogênicas à bananeira.

Foi constatada forte influência do período de incubação sobre a esporulação de conídios de *M. musicola* no meio V8 e meio de soja (Tabela 2 e Fig. 2). Diminuições significativas nas produções de conídios do fungo foram observadas aos 35 dias de incubação no meio V8 e a partir dos 21 dias em meio de soja. Tal fato poderia estar associado a um esgotamento dos nutrientes dos meios devido a um intenso metabolismo do fungo, haja visto que em meio de BDA onde a esporulação de *M. musicola* foi menos intensa, não foram detectadas variações significativas entre as produções de conídios nos diferentes períodos de incubações avaliados.

Diminuição da esporulação *in vitro* de conídios de *M. musicola* em função do aumento do período de

incubação, foi atribuído por CALPOUZO (1955) a um aumento do número de setores não esporulantes nas colônias do fungo. Tal fato porém, fica descartado no presente trabalho, em função de não terem sido observadas durante a execução deste experimento, formações de setores estéreis nas colônias do fungo.

A luminosidade constituiu-se em um fator fundamental para esporulação *in vitro* de conídios de *M. musicola*. Placas com colônias do fungo mantidas sob condição de luz contínua, apresentaram produções de conídios muito superiores aos tratamentos luz alternada (12 horas luz) e escuro contínuo (Tabela 3). Estes resultados concordam com os obtidos por JACOME & SCHUH (1993b) para esporulação *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*, os quais verificaram a presença de conídios somente em culturas do fungo que foram submetidos aos tratamentos de luz contínua (em maior quantidade) e luz alternada, não sendo constatadas esporulações nas colônias do fungo que permaneceram em escuro contínuo.

PEFOURA & MOURICHON (1990) relatam a condição de luz contínua como sendo um dos fatores indispensáveis para a produção *in vitro* de conídios de *Mycosphaerella musicola* e *Mycosphaerella fijiensis* em quantidades signifi-

cativas (10^6 e 10^4 conídios/ml).

Variações da capacidade de produção *in vitro* de conídios, foram observadas entre os isolados de *Mycosphaerella musicola* avaliados (Tabela 4), com o isolado Piracicaba apresentando superioridade quando comparado com os demais. Resultados semelhantes foram obtidos por CALPOUZOS (1955) e NATURAL (1989) quando avaliaram a capacidade de esporulação *in vitro* de isolados de *M. musicola* provenientes de países da América Central e Filipinas.

JACOME & SCHUH (1993a) verificaram diferenças significativas entre as produções *in vitro* de conídios de 6 isolados de *M. fijiensis* var. *difformis*, oriundos de várias regiões de Honduras. Segundo estes autores, tal fato poderia estar associado com a capacidade de adaptação deste isolados em relação à temperatura sob a qual se realizou o experimento.

Dos 3 isolados de *M. musicola* avaliados, o isolado Piracicaba foi o único que apresentou redução drástica na produção de conídios com prolongamento do período de incubação (Tabela 4 e Figura 3). Esta redução, pode estar relacionada com o esgotamento dos nutrientes dos meios provocado pelas elevadas esporulações deste isolado.

A sensibilidade dos isolados de *M. musicola*

aos fungicidas propiconazole, triadimenol e benomyl no teste realizado *in vitro* (Tabela 5), veio confirmar os resultados obtidos por MELIN (1973), FOURÉ & GRISONI (1984), RAMSEY et al (1987) e GALINDO ALVAREZ (1991) que verificaram a eficácia destes produtos para o controle das cercosporioses da bananeira, através de ensaios realizados em condições de campo.

Dos fungicidas testados, propiconazole foi o que apresentou uma melhor performance, provocando maiores halos de inibição do desenvolvimento de *M. musicola*, a partir da dose de 1 ppm. Este resultado se assemelha ao obtido por BELLAIRE (1990) que verificou *in vitro*, uma alta sensibilidade de isolados de *M. musicola* ao propiconazole, determinando a ED50 (dose de propiconazole capaz de reduzir em 50% o crescimento do tubo germinativo) como sendo inferior a 0.05 ppm e a ED90 (dose de propiconazole capaz de reduzir em 90% o crescimento do tubo germinativo) variando de 5 a 100 ppm.

Formações de halos de inibição, também foram observados para os tratamentos com triadimenol a partir da dose de 1 ppm, porém com menores diâmetros do que os encontrados para propiconazole. Observa-se no entanto na Tabela 7, que o triadimenol incorporado ao meio de cultura na concentração de 1 ppm não foi capaz de inibir o desenvolvi-

mento do isolado Registro (sensível ao fungicida) de *M. musicola*, o mesmo não ocorrendo para propiconazole.

A baixa eficiência do fungicida benomyl para inibição do desenvolvimento de isolados de *M. musicola* (Tabela 5), foi contrária aos resultados obtidos por FOURCADE & LAVILLE (1973) e BELLAIRE (1990). Segundo estes autores, conídios de isolados "sensíveis" de *M. musicola* foram incapazes de germinar quando liberados em placas contendo meios de cultura com 0.1 ppm de benomyl. Como os isolados Ubatuba, Piracicaba e São Simão de *M. musicola* foram provenientes de áreas onde não se realizavam aplicações de fungicidas, pode-se supor que a ausência de halos de inibição do fungo nas concentrações de 0.1, 1 e 10.0 ppm para o fungicida benomyl, possa ter sido ocasionado por uma baixa difusão do produto no meio e / ou sua pouca solubilidade em água.

Embora conhecido em diferentes espécies de fungo (FLETCHER et alii 1987; HOLLOMON et alii 1987), o surgimento de mutantes resistentes a fungicidas do grupo dos triazóis ainda não havia sido relatado para *Mycosphaerella musicola*.

As frequências de mutações para *M. musicola* resistentes ao triadimenol e propiconazole, descritas na

Tabela 6, podem ser consideradas altas, haja visto que os isolados Piracicaba e S. Simão do fungo onde foram detectados estes mutantes terem sido originados de áreas onde não se realizavam aplicações de fungicidas para o controle do Mal-de-Sigatoka. Estas frequências foram superiores à obtida por LAVILLE (1983) para mutantes de *M. musicola* resistentes ao benomyl, que a determinou como sendo de $1/10^4$ conídios.

Foi verificada uma alta tolerância dos mutantes de *M. musicola* aos fungicidas propiconazole e triadimenol (Tabela 7). Estes resultados concordam com os apresentados por FOURCADE & LAVILLE (1973) e STOVER (1978), que observaram o desenvolvimento normal de "strains" de *M. musicola* resistentes ao benomyl em meios de cultura com doses de 700 a 1000 ppm de benomyl.

A ocorrência de resistência cruzada dos mutantes de *M. musicola* aos fungicidas propiconazole e triadimenol (Tabela 7), pode ter sido em decorrência destes fungicidas pertencerem ao mesmo grupo químico e terem em comum o sítio de atuação no patógeno, ou seja, a inibição da biossíntese do ergosterol.

Ausência de patogenicidade e hifas sem o formato característico de "sino", bem como a diminuição do tamanho dos conídios e conidióforos verificado nos mutantes de *M. musicola* resistentes aos fungicidas triadimenol e

propiconazole, também foram relatados por STOVER (1978 e 1980) para mutantes de *M. musicola* resistentes ao benomyl.

Ainda que os mutantes de *M. musicola* não tenham sido patogênicos, estes devem ser considerados como uma forte ameaça, pois em áreas onde ocorram pulverizações frequentes destes fungicidas, o fungo estará sujeito a uma maior pressão de seleção o que poderá motivar o surgimento de mutantes resistentes aos fungicidas e patogênicos à bananeira. O aparecimento de mutantes de *Mycosphaerella spp* resistentes ao benomyl, tem sido apontado por diferentes autores (FULLERTON & TRACEY, 1984; WOODS et alii, 1982) como sendo a causa da falha do controle das cercosporioses em plantações de banana onde este fungicida é utilizado isoladamente.

A interferência das concentrações das suspensões de conídios no desenvolvimento do mal-de-Sigatoka (Figuras 6 e 7), concorda com os resultados obtidos por STOVER (1972) e VICENTE (1983) que consideraram a pressão de inóculo como um dos componentes capaz de influenciar no período de incubação e latência da doença.

Suspensões de conídios de *M. musicola* nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 conídios/ml, foram as que proporcionaram os maiores valores para número de lesões e

área foliar infectada com o mal-de-Sigatoka (Tabela 8). Destas concentrações, as de 10^4 e 10^5 conídios/ml provocaram lesões mais individualizadas e menores áreas de necrose nas folhas inoculadas, reproduzindo com maior fidelidade os sintomas da doença que ocorrem no campo.

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os períodos de incubação do mal-de-Sigatoka em mudas de bananeiras com 3 e 6 meses de idade (Tabela 9). Pouca interferência da idade da planta no período de incubação do mal-de-Sigatoka foi constatado também por GOOS & TSCHIRCH (1963) que observaram períodos de incubação semelhantes da doença para mudas de bananeira inoculadas em casa-de-vegetação e plantas adultas infectadas no campo.

Períodos de latência do mal-de-Sigatoka foram maiores nas mudas com idade de 6 meses do que nas com 3 meses (Tabela 9). Este fato está relacionado com uma maior velocidade de evolução das lesões tipo estrias para manchas ter ocorrido nas plantas mais jovens, demonstrando uma maior predisposição destas à doença (FOURÉ, 1985).

As variações dos períodos de incubação e latência do mal-de-Sigatoka, em função das concentrações das suspensões de conídios de *M. musicola* para mudas de bana-

neira com 3 e 6 meses de idade (Fig. 8, 9 e 10), foram semelhantes às obtidas no item 4.8 (Fig. 6 e 7).

Mudas da cultivar mysore foram mais resistentes ao mal-de-Sigatoka que as das cultivares prata e nanicão (Tabela 10 e Figura 12). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por GOES & BARROS (1982), VENTURA et alii (1987) e MONTCEL (1987), que avaliaram o comportamento destas cultivares com relação ao mal-de-Sigatoka, utilizando plantas adultas de bananeira infectadas em condição natural no campo.

Diferentes níveis de resistência foram também encontrados por MOURICHON et alii (1987) ao avaliarem em condição de casa-de-vegetação, o comportamento de mudas de cultivares de bananeira em relação à *Mycosphaerella fi-jiensis*.

6 - CONCLUSÕES.

Com base nos resultados do presente trabalho, podemos chegar às seguintes conclusões:

1- Produção *in vitro* de inóculo de *M. musicola* se consegue através da semeadura de conídios em meio de soja e V8-agar, sob condições de luz contínua, a 25°C. As maiores produções de conídios são obtidas dos 14 aos 28 dias de incubação no meio de V8 agar e aos 14 dias de incubação no meio de soja.

2- Os produtos propiconazole, triadimenol e benomyl continuam apresentando nesta ordem de eficiência, fungitoxidez inerente a *M. musicola*. Detectaram-se mutantes de *M. musicola* resistentes aos fungicidas propiconazole e triadimenol que apresentaram o fenômeno da resistência cruzada para esses produtos; entretanto, tais mutantes não foram patogênicos.

3- É possível determinar níveis de resistência de cultivares de banana ao Mal-de-Sigatoka, através da avaliação do número de lesões, área foliar infectada, perío-

dos de incubação e de latência em mudas inoculadas sob condições controladas de casa-de-vegetação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 3.ed. São Paulo, ANDREI ed.,1990. 478p.

BANANA: PANORAMA INTERNACIONAL. **Informações Econômicas**. São Paulo, 21(12):60-7,dez., 1991.

BELLAIRE,L.L. Caractérisation de la sensibilité de soches de *Pseudocercospora musae* aux fongicides utilisés dans la lutte contre la cercosporiose jaune du bananier en Gaudeloupe. **Fruits**, Paris, 45 (3):209-12, 1990.

CALPOUZOS,L. **Studies on the Sigatoka disease of bananas and its fungus pathogen**. Cienfuegos, Atkins Garden and Research Laboratory, 1955. 70p.

COMPANHIA DE ENTREPOSTOS E ARMAZÉNS GERAIS DE SÃO PAULO (CEAGESP). **Boletim anual-1990**. São Paulo, 1990. 107p.

CRONAUER, S.S. & KRIKORIAN, A.D. Somatic Enbryos fron cultured tissues of triploid plantains (*Musa* AAB). *Plant Cell Reports*, Paris, 2:289-91, 1983.

DEIGHTON, F.C. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI *Pseudocercospora* Speg; *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria* Pter. Kew, CMI. 1976. 186p. (Mycological Papers, 140).

FLETCHER, J.T.; COOPER, S.T.; PRESTIDGE, A.L.H. The sensitivity of *Eryiphe graminis f. sp. tritici* to various fungicides inhibiting sterol biosynthesis. *ISPP Chemical Control Newsletter*. Wallingford, 9:30-2, 1987. Apud; *Review of Plant Pathology*, 67(3):128, Mar., 1988. (Resumo)

FOURCADE, I & LAVILLE, E. Obtention *in vitro* de souches résistantes au benomyl chez le *Cercospora musae* ZIMM. *Fruits*, Paris, 28(2):103-5, 1973.

FOURÉ, E. Les Cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananieres et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladie les raies noires). (SUITE III). *Fruits*, Paris, 40(6):393-9, 1985.

FOURÉ, E. Les Cercosporioses du bananier et leurs traitements. Sélection de molécules fongicides nouvelles.

Activites comparees de differents molécules fongicides sur *Mycosphaerella fijiensis* MORELET, agent de la maladie des raies noires des bananiers et plantains du Gabon. (Suite IV). *Fruits*, Paris, 39(12):753-65, 1984.

FOURÉ, E. Les Cercosporioses du bananier et leurs traitements. Sélection de molécules fongicides nouvelles.

Activites comparees de differents molécules fongicides sur *Mycosphaerella fijiensis* MORELET, agent de la maladie des raies noires des bananiers et plantains du Gabon. (Suite III). *Fruits*, Paris, 39(7/8):427-39, 1984.

FOURÉ, E. & LECOST, T. Variabilité génétique des *Mycosphaerella* inféodés au genre *Musa*. Mise en évidence de la présence au Cameroun sur bananiers et plantains d'une Cercosporiose (*Mycosphaerella musicola*) au comportement pathogène atypique. *Fruits*, Paris, 43(7/8):407-15, 1988.

FOURÉ, E.; PEFOURA, A.M.; MOURICHON, X. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *Mycosphaerella fijiensis* MORELET au Cameroun. Caractérisation de la résistance au champ de bananiers appartenant à divers groupes génétique. *Fruits*, Paris, 40(4):339-46, 1985.

FOURÉ, E.; PEFOURA, A.M.; MOURICHON, X. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *Mycosphaerella fijiensis* MORELET au Cameroun. Caractérisation de la résistance au champ de bananiers appartenant à divers groupes génétiques. *Fruits*, Paris, 45(4):339-45, 1990.

FULLERTON, R.A. & TRACEY, G.M. Tolerance of *Mycosphaerella fijiensis* to benomyl and carbendazim in the Pacific Island. *Tropical Agriculture*, Trinidad, 61(2):133-6, apr., 1984.

GALINDO ALVAREZ, J. R. Epidemiologia do Mal-de-Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*) da bananeira e controle químico da doença, via solo, com triadimenol. Viçosa, 1991. 119p. (M.S.- Universidade Federal de Viçosa)

GOES, A. de & BARROS, J.C.S. de. Comportamento de bananeiras do grupo prata em relação ao Mal-de-Sigatoka. *Comunicado Técnico*, Rio de Janeiro, 118:1-2, 1982.

GOOS, R.D. & TSCHIRCH, M. Greenhouse studies on the Cercospora Leaf Spot of Banana. *Transactions of the British Mycological Society*, Londres, 46(3):321-30, 1963.

- HOLLOMON, D.W.; CARTER, G.A.; KENDALL, S.J. Sensitivity of *Rhynchosporium secalis* to triazole fungicides. ISPP Chemical control Newsletter. Londres, 8:20-1, 1987. Apud; Review of Plant Pathology, Wallingford, 66(8):351, 1987. (Resumo).
- JACOME, L.H. & SCHUH, W. Effects of leaf wetness duration and temperature on development of Black Sigatoka disease on banana infected by *Mycosphaerella fijiensis* var *disformis*. Phytopathology, St. Paul, 82(5):515-20, 1990.
- JACOME, L.H. & SCHUH, W.(a) 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*. Tropical Agriculture, Trinidad, 70(1): 51-9, jan., 1993.
- JACOME, L.H. & SCHUH, W.(b) Spore production and artificial inoculation techniques for *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Tropical Agriculture, Trinidad, 70(1):33-8, jan., 1993.
- JACOME, L.H.; SCHUH, W.; STEVENSON, R.E. Effect of temperature and relative humidity on germination and germ tube development of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. Phytopathology, St. Paul, 81(12):1480-5, 1991.

JOYA, C. Identification of Sigatoka pathogens and monitoring for benzimidazole resistance. *Phytopathology*, St. Paul, 72(4):453, 1982.

LAVILLE, E. Les Cercosporioses du bananier et leurs traitements. Evolution des populations pathogenes généralités. *Fruits*, Paris, 38(2):75-82, 1983.

MARIOTTO, P.R. Ocorrência de resistência a benomyl em *Cercosporidium personatum* (Berk. & Curtis) Deighton, no Estado de São Paulo. *Biológico*, São Paulo, 51(12):315-7, dez., 1985.

MARTINEZ, J.A. Epidemiologia do agente causal do Mal-de-Sigatoka (*Mycosphaerella musicola* Leach) na região produtora de banana do Estado de São Paulo e sua importância no desenvolvimento e intensidade da doença. Botucatu, 1973. 47p. (Doutorado-Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu/UNESP)

McGAHAN, M.W. & FULTON, R.H. Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella musicola*: A comparative anatomical study of juvenile and adult leaves in relation to lesion morphology. *Phytopathology*, St. Paul, 55:1179-82, 1964.

- MELIN, P. étude de nouveaux fongicides sur la Cercosporiose du bananier. *Fruits*, Paris, 28(6):429-31, 1973.
- MEREDITH, M.A. Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. Surry, CMI, 1970. 147p. (Phytopathological Papers, 11)
- MEREDITH, D.S. & LAWRENCE, J.S. Morphology of the conidial state of *Mycosphaerella musicola* in the Pacific region. Transactions of the British Mycological Society, Londres, 54(2):265-81, 1970.
- MONTCEL, H.T. The susceptibility of various cultivated bananas to Sigatoka diseases. In: PERSLEY, G.J. & DE LANGHE, E.A. *Banana and plantain breeding strategies*. Brisbane, Aciar, 1987. p.272-89.
- MOURICHON, X.; PTER, D.; ZAPATER, M.F. Inoculation experimentale de *Mycosphaerella fijiensis* sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture *in vitro*. *Fruits*, Paris, 42(4):195-8, 1987.
- NATURAL, M.P. An update on the development of an *in vitro* screening procedure for resistance to Sigatoka leaf diseases of banana. In: PERSLEY, G.J. & DE LANGHE, E.A. *Banana and plantain breeding strategies*. Brisbane, ACIAR, 1987. p.208-29.

PEFOURA, A.M. & FOURÉ, E. Efficacités comparées de différentes formulations de triadimenol appliquées au sol sur *Mycosphaerella fijiensis*, agent de la maladie des raies noires des plantains au Cameroun. Evolution des possibilités de lutte in milieu paysan. *Fruits*, Paris, 43(4):199-260, Apr., 1988.

PEFOURA, A.M. & MOURICHON, X. Développement de *Mycosphaerella musicola* (maladie de Sigatoka) et *Mycosphaerella fijiensis* (maladie des raies noires) sur les bananiers et plantains. Etude du cas particulier des productions d'altitude. *Fruits*, Paris, 45(1):17-24, 1990.

RAMSEY, M.D.; DANIELLS, J.W.; ANDERSON, V.J. Effects of Sigatoka leaf spot (*Mycosphaerella musicola* Leach) on fruit yields, field ripening and greenlife of bananas in North Queensland. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, 41:305-13, 1990.

RAMSEY, M.D.; VAWDREY, L.L.; SCHIPKE, L.G. Evaluation of systemic and protectant fungicides for the control of Sigatoka leaf spot (*Mycosphaerella musicola* Leach) of bananas in North Queensland. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, Melbourne, 27:919-23, 1987.

- SHOLBERG, P.L.; YORSTON, J.M.; WARNOCK, D. Resistance of *Venturia inaequalis* to benomyl and dodine in British Columbia, Canada. *Plant Disease*, St. Paul, 73(8):667-9, 1989.
- STOVER, R.H. A non-virulent benomyl tolerant *Cercospora* from leaf spot caused by *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* and *Mycosphaerella musicola*. *Transactions of the British Mycological Society*, Londres, 69(3):500-2, 1978.
- STOVER, R.H. *Banana, plantain and abaca diseases*. Kew, CMI, 1972. 316p.
- STOVER, R.H. Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. *Tropical Agriculture*, Trinidad, 53(2):111-4, Apr., 1976.
- STOVER, R.H. Extranuclear inherited tolerance to benomyl in *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Transactions of the British Mycological Society*, Londres, 68(1):122-4, 1977.
- STOVER, R.H. Field observation on benomyl tolerance in ascospores of *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Transactions of the British Mycological Society*, Londres, 72(3):518-9, 1979.

- STOVER, R.H. Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella musicola*: Role of conidia in epidemiology. *Phytopathology*, St. Paul, 60(5):856-60, May, 1970.
- STOVER, R.H. Measuring response of Musa cultivars to Sigatoka pathogens and proposed screening procedures. In: PER-SLEY, G.J. & DELANGHE, E.A. **Banana and plantain breeding strategies**. Brisbane, ACIAR, 1987. p.114-8.
- STOVER, R.H. Response of the Black Sigatoka pathogen *Mycosphaerella fijiensis* to calixin (tridemorth) *in vitro*. *Fruits*, Paris, 47(2):291-301, 1992.
- STOVER, R.H. Sigatoka Leaf Spots of banana and plantains. *Plant Disease*, St. Paul, 64(8):750-756, 1980.
- VÁZQUEZ, R.E. Tilt (propiconazole) 250 CE para el control de *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis* la Sigatoka negra del plátano. *Phytopathology*, St. Paul, 76(3):377, 1986.
- VENTURA, J.A.; NÓBREGA, A.C.; GOMES, J.A. Avaliação de cultivares e clones de bananeiras em relação ao Mal-do-Panamá e Mal-de-Sigatoka no Estado do Espírito Santo. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 13(2):142, jul., 1988.

VENTURA, J.A.; NÓBREGA, A.C.; GOMES, J.A.; BULL, L. Uso de fungicida granulado para controle do Mal-de-Sigatoka em bananeiras da cultivar prata. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 13(2): 117, jul., 1980.

VICENTE, L.P. Epifitiologia de la mancha de la hoja del platano (Sigatoka) causada por *Mycosphaerella musicola*: Factores que influyen en el periodo de incubacion y en el desarrollo de la enfermedad en cuba. *Agrotecnia de Cuba*, Havana, 15(1):55-64, 1983. Apud *Review of Plant Pathology*, Wallingford, 65(2):146, 1986. (Resumo)

WARDLAW, C.W. **Banana diseases**; including plantains and abaca. 2.ed. London, Longman, 1972. 878p.

WEBBER, J.F. Effect of MBC fungicide tolerance on the fitness of *Ophiostoma ulmi*. *Plant Pathology*, London, 37:217-24, 1988.

WEBBER, J.F.; MITCHELL, A.G.; SMITH, F. Linkage of the genes determining mating type and fungicide tolerance in *Ophiostoma ulmi*. *Plant Pathology*, Londres, 35:512-6, 1986.

WICKS, T.; LOMMAN, G.; ROGERS, I.S. Fungicide control of ringspot (*Mycosphaerella brassicola*) in brussels sprouts. *Australian Journal Experimental Agriculture*, Melbourne, 27:597-600, 1987.

WOODS, T.L.; JACOME, L.; STOVER, R.H. Resurgence of tolerance to benomyl in *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Phytopathology*, St. Paul, 72(4):988, 1982.

ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Fungicidas sistêmicos recomendado no controle de doenças. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENSINO AGRÍCOLA SUPERIOR. *Curso de defensivos agrícolas*. Brasília, 1990. p. 1-17. (Modulo 2.6)