

## INFLUÊNCIA DA INOCULAÇÃO E DO MOLHAMENTO NO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES DE *Colletotrichum musae* EM BANANA

*Maria Gilmara de Oliveira Soares<sup>1</sup>, Eduardo Alves<sup>1</sup>, Aurivan Soares de Freitas<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Fitopatologia, CP 3037, 37200-000, Lavras, MG, Brasil. E-mail:gilmaragronomia@gmail.com. <sup>2</sup>Universidade Vale do Rio Verde (UNINCOR), 37410-000, Três Corações, MG, Brasil.

A banana é uma fruta consumida mundialmente em razão de seu alto valor nutritivo. Porém, as doenças pós-colheita, como a antracnose causada por *Colletotrichum musae* é considerada um fator limitante à cultura. Diante da falta de conhecimento dos fatores que influenciam a doença, objetivou-se com esse trabalho, avaliar diferentes métodos de inoculação e tempos de molhamento no desenvolvimento de lesões de *C. musae* em banana. Utilizou-se o isolado monospórico de *C. musae* CML3248 obtido de banana 'Prata'. O ensaio foi conduzido, em esquema fatorial 5 x 5, com 5 tempos de molhamento (0, 6, 12, 24 e 48 h), e 5 métodos de inoculação: um furo com micélio (1 FM), um furo com suspensão (1FS), cinco furos com micélio (5FM), cinco furos com suspensão (5FS) e corte com suspensão (CS). Houve interação significativa entre as variáveis estudadas. Em frutas submetidas a 0 h de molhamento não houve desenvolvimento de sintomas de antracnose. Porém, no molhamento de 48 h foi observado maior tamanho de lesões. O método 1 FM proporcionou menor tamanho de lesões, entretanto, o método de inoculação 5FS favoreceu o maior tamanho de lesões. Portanto, a intensidade da antracnose em banana aumenta com o método de inoculação 5FS e incremento do período de molhamento.

**Palavras-chave:** *Musa* spp., antracnose, patologia pós-colheita, infecção.

**Influence of inoculation and watering in the development of *Colletotrichum musae* injuries in banana.** Banana is a fruit consumed worldwide because of its high nutritional value. However, post-harvest diseases such as anthracnose are considered a limiting factor to the crop. Due to the lack of knowledge regarding the factors that influence anthracnose, we aimed in this work to evaluate different inoculation methods and wet periods in the development of *Colletotrichum musae* lesions in banana. The monosporic isolate of *C. musae* CML3248 obtained from 'Prata' banana was used. The experiment was carried out in a 5 x 5 factorial scheme with 5 wetting times (0, 6, 12, 24 and 48 h), and 5 inoculation methods: a mycelium bore (1 FM), a bore with suspension (1FS), five holes with mycelium (5FM), five holes with suspension (5FS) and cut with suspension (CS). There was a significant interaction between the studied variables. In fruits submitted to 0 h of wetting there was no development of anthracnose symptoms. However, in wetting of 48 h, a larger lesion size was observed. The 1 FM method provided smaller lesion size, however, the 5FS inoculation method favored the larger lesion size. Therefore, the intensity of banana anthracnose increases with the 5FS inoculation method and increased wetting period.

**Key words:** *Musa* spp., anthracnose, postharvest pathology, infection.

## Introdução

A banana (*Musa* spp.) é considerada um dos produtos agrícolas mais valiosos do mundo (Ploetz et al., 2015). Apresenta alto valor energético e nutricional, sendo cultivada na maioria dos países tropicais e subtropicais (Araujo et al., 2014). A produção mundial de banana em 2014 foi 115 milhões de toneladas, destacando-se como maiores produtores Índia, China, Filipinas, Brasil e Equador (FAO, 2017). Em 2015, o Brasil produziu cerca de sete milhões de toneladas com a maior parte da produção concentrada nos estados de São Paulo, Bahia, Minas Gerais, Santa Catarina e Pará (IBGE, 2016). Apesar desses valores expressivos, vários fatores prejudicam a produção e comercialização da fruta entre eles cita-se os significativos danos pós-colheita, podendo esses ocorrer principalmente devido a fatores de origem microbiológica (Moraes et al., 2005; Pessoa et al., 2007).

Dentre os fatores microbiológicos que mais afetam a qualidade das frutas de banana destaca-se, o fungo *Colletotrichum musae* agente etiológico da antracnose, o qual pertence ao complexo de espécies *Colletotrichum gloeosporioides*, ocasiona perdas em torno de 30 a 40% em frutas, tornando-as indesejáveis para o consumo e comercialização (Pessoa et al., 2007; Maqbool et al., 2010; Weir et al., 2012).

A antracnose em banana é caracterizada por lesões escuras deprimidas que coalescem com o passar do tempo formando grandes áreas necróticas. Sob condições ideais de umidade ocorre formação de frutificações rosadas sobre as frutas. A polpa não é afetada, exceto quando bananas são expostas a temperaturas altas (Cordeiro et al., 2005). De acordo com Bastos e Albuquerque (2004), as doenças pós-colheita em banana são de suma importância, e de modo geral, são favorecidas por temperaturas médias de 25 a 30 °C e alta umidade. Todavia, na ausência desses fatores, o desenvolvimento da doença é reduzido (Oliveira et al., 2014b).

Na interação patógeno-hospedeiro é importante o conhecimento das condições favoráveis aos fitopatógenos para cada patossistema, tais como, o período de molhamento e a porcentagem de umidade relativa do ar para o estabelecimento da doença (Pessoa et al., 2007).

Outro fator importante no desenvolvimento de lesões em bananas é a inoculação, na qual possibilita a

ocorrência de sintomas e auxilia em estudos relacionados à confirmação ou manutenção da patogenicidade (Siviero et al., 2002). Diversos trabalhos elucidaram o efeito da temperatura no desenvolvimento de doenças fúngicas (Pessoa et al., 2007; Silveira et al., 2001; Uchôa et al., 2012). Estudos com metodologias de inoculação correlacionada com molhamento envolvendo espécies de *Colletotrichum* ainda são escassos, principalmente na pós-colheita de banana, sendo de extrema importância conhecer o melhor método de inoculação e período de molhamento que influenciam no aumento de lesões da antracnose em banana, e com isso auxiliar o produtor na escolha da forma correta de manejo para a doença. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência de diferentes métodos de inoculação e períodos de molhamento no desenvolvimento de lesões de *C. musae* em banana.

## Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Microscopia e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, Minas Gerais, Brasil. O isolado foi obtido a partir de fragmentos de banana 'Prata', retirados da região limítrofe entre a parte sadia e a doente. O preparo da cultura monospórica, foi realizado diluindo os conídios do fungo em 10 mL de água esterilizada, uma alíquota de 10 µL foi depositada em placas de Petri contendo meio ágar-água e espalhada com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C com fotoperíodo de 12 h. Após a germinação, conídios isolados foram transferidos para placas contendo meio malte.

A cultura monospórica do isolado foi preservada em microtubo e armazenada a 10 °C, no escuro e crio preservada em glicerol 15% a -80 °C (Leslie e Summerell 2006), e depositada na Coleção Micológica de Lavras (CML), Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA) sob o código de acesso CML3248.

O ensaio para avaliar os métodos de inoculação e os tempos de molhamento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial de análise de variância 5 x 5, com quatro repetições por tratamento e uma fruta por parcela.

Os métodos de inoculação testados foram: um furo com micélio (1 FM), um furo com suspensão (1FS), cinco furos com micélio (5FM), cinco furos com suspensão (5FS) e corte com suspensão (CS). Os ferimentos foram realizados em banana 'Prata' marcadas na região mediana em quatro pontos distintos com agulha (um furo), multiagulhas (cinco furos) e lâmina de bisturi (um corte), ambos na profundidade de 2 mm. Em cada ponto foram aplicados 20 µL da suspensão, contendo  $2 \times 10^6$  conídios/mL ou discos de micélio de 5 mm de diâmetro conforme os métodos de inoculação.

Para avaliação do tempo de molhamento as frutas foram colocadas dentro de sacos plásticos transparentes e umedecidos, de modo a formar uma câmara úmida com temperatura e umidade relativa média de  $25 \pm 2$  °C e  $90 \pm 5\%$ , respectivamente, durante o período determinado no tratamento. Os períodos de molhamento testados foram de 0, 6, 12, 24 e 48 h. Após a retirada dos sacos plásticos as frutas foram colocadas em suportes de plásticos sob bancada do laboratório, e avaliadas diariamente durante seis dias com auxílio de um paquímetro digital, medindo-se as lesões em dois sentidos perpendiculares. Em seguida foi calculada a área média lesionada em cm<sup>2</sup>. Pelo fato das lesões terem sido circulares, utilizou-se a fórmula para cálculo da área do círculo:

$$A = \delta r^2$$

Sendo, A = área lesionada;  $\delta$  = constante com valor (3,1416) e r = raio médio da lesão.

O teste de Shapiro-Wilk (Shapiro e Wilk, 1965) foi aplicado aos dados para avaliar sua distribuição normal. Como os dados apresentaram distribuição normal, não foi necessário transformar as variáveis. Sendo assim, os dados foram submetidos à análise de variância em esquema fatorial 5 x 5, com 5 métodos de inoculação e 5 períodos de molhamento. As variáveis significativas no teste F ( $p \leq 0,05$ ) foram submetidas ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade e ao ajuste de modelos de regressão empregando o software Sisvar (Ferreira, 2008).

## Resultados e Discussão

Houve interação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre métodos de inoculação e períodos de molhamento. O maior desenvolvimento das lesões foi obtido no método

de inoculação cinco furos com suspensão (5FS), sendo estas incrementadas com o acréscimo do período de molhamento assumindo valores de 0,86; 0,97; 1,84 e 5,85 cm<sup>2</sup>, nos períodos de molhamento 6, 12, 24 e 48 h, respectivamente (Figura 1).

Resultados semelhantes foram verificados em outros estudos. Pessoa et al. (2007) observaram que método de inoculação com ferimentos utilizando furos com suspensão, proporcionou maiores lesões de *C. musae* em banana. Em mamão, Gomes et al. (2012) observaram maiores sintomas de antracnose quando os frutos foram inoculados com cinco ferimentos e suspensão de conídios de *Gloeosporioides*. Oliveira et al. (2014a), verificaram em frutos de meloeiro aumento de lesões quando os mesmos foram submetidos a ferimentos e inoculados pela atomização da suspensão de conídios de *Fusarium semitectum*. Nos trabalhos anteriores foi confirmada a importância da utilização de ferimentos na inoculação, da mesma forma no presente estudo verificou-se a importância essencial da inoculação com o período de molhamento favorável ao desenvolvimento da doença.

O método de inoculação cinco furos com micélio (5FM) apresentou um expressivo desenvolvimento de lesões com o aumento do período de molhamento, não diferindo estatisticamente da inoculação 5FS nos

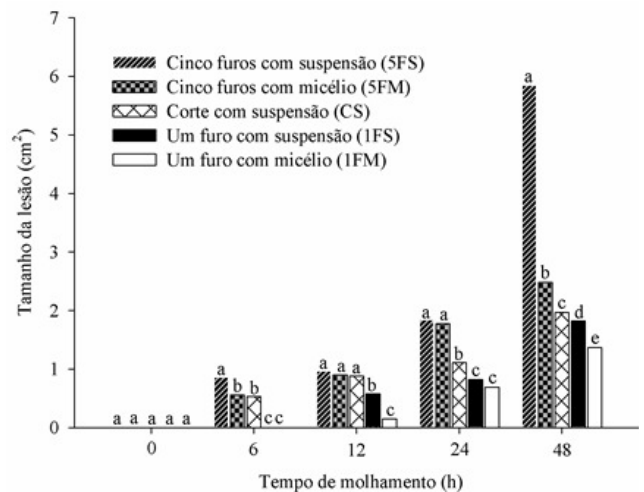


Figura 1 - Tamanho de lesão em banana ocasionada por *C. musae* sob diferentes métodos de inoculação e períodos de molhamento após seis dias da inoculação. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. CV(%) = 9,20.

períodos de molhamento 0, 12 e 24 h, obtendo lesões médias de 0,00, 0,90 e 1,78 cm<sup>2</sup>, respectivamente (Figura 1). Esses resultados corroboram com diversos outros trabalhos. Moraes et al. (2006), constataram em banana 'Prata-Anã' inoculadas com discos de micélio de *C. musae* área lesionada de 5,8 cm<sup>2</sup>. Oliveira et al. (2008), observaram em manga maiores lesões nas inoculações realizadas com discos de micélio contendo estruturas de *C. gloeosporioides*, e menores lesões com a utilização da suspensão. Já Nery-Silva et al. (2007), evidenciaram maior severidade de podridão peduncular em mamão quando inoculados com ferimentos e suspensão dos fungos *Phoma caricae-papayae*, *C. gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* e *Fusarium solani*.

Os dados obtidos nesse trabalho confirmam que o maior número de ferimentos pode aumentar a severidade da doença em frutas. Em trabalho realizado por Senhor et al. (2008), também foram constatados resultados semelhantes, os autores afirmaram que ferimentos mais intensos e em maiores quantidades em frutos, são essenciais para o desenvolvimento de maiores lesões, pois facilita a penetração do patógeno. Além disso, ferimentos associados com suspensão e micélio incrementam mais ainda o contato do patógeno com o hospedeiro. A vantagem no uso de suspensão de conídios pode ser explicada, pela fácil padronização da quantidade de esporos depositada na superfície do fruto, que auxilia diretamente no início da infecção e no progresso da doença. Já a utilização de disco de micélio é vantajosa pela presença de estruturas do patógeno, que apresenta uma fonte extra de substrato quando introduzido no hospedeiro através de ferimentos (Pessoa et al., 2007). No entanto, a padronização do inóculo é mais difícil. Nos métodos de inoculação corte com suspensão (CS), um furo com suspensão (1FS) e um furo com micélio (1FM), foram observadas as menores áreas lesionadas. Nos dois últimos métodos não foi verificado desenvolvimento de lesões nos períodos de molhamento de 0 e 6 h, tendo início o aparecimento das primeiras lesões a partir de 12 h de molhamento, com tamanhos de 0,58 e 0,15 cm<sup>2</sup>, respectivamente (Figura 1). De forma semelhante, Soares et al. (2008) verificaram em frutos de goiaba germinação de *C. gloeosporioides* mais intensa com 12 h de molhamento, e ausência de infecção do patógeno com 6 h. Assim, torna-se nítido a importância

da quantidade de ferimentos para o progresso da antracnose em banana, pois quanto menor o número de ferimentos menor será o desenvolvimento da doença, fato confirmado nesse estudo.

O aumento do período de molhamento favoreceu o desenvolvimento das lesões em banana ao longo do tempo (Figura 2). À medida que aumentou o tempo de molhamento de 0 para 48 h verificou-se acréscimo no tamanho das lesões de 0,030; 0,039; 0,118; 0,050 e 0,038 cm<sup>2</sup> para cada aumento na unidade de hora do molhamento, nos métodos de inoculação 1FM, 1FS, 5FS, 5FM e CS, respectivamente (Figura 2).

A alta umidade estimulou o processo da infecção de *C. musae* e o progresso das lesões (Figura 2). Esses resultados estão de acordo com Pessoa et al. (2007), ao observarem maior desenvolvimento de lesões de *C. musae* em banana com o incremento do período de molhamento, sendo as maiores lesões constatadas no período de 36 h. Oliveira et al. (2014b), verificaram em frutos de mamão maiores lesões causadas por *Phytophthora palmivora* quando submetidos aos períodos de molhamento entre 48 e 78 h. Aumento na severidade da sigatoka-negra em bananeira foi verificado com 72 h de umidade (Uchôa et al., 2012).

O período de molhamento de 6 h associado com os métodos de inoculação 1FM e 1FS, não ocasionaram doença nas frutas (Figuras 2A e 2B). Também com 0 h de molhamento, não houve desenvolvimento de lesões em todos os métodos de inoculação testados (Figura 2), indicando a necessidade de umidade na área superficial das frutas. Resultados semelhantes foram observados por Uchôa et al. (2012), ao constatarem que não houve incidência de sigatoka-negra em bananeira submetidas a 0 h de molhamento. Oliveira et al. (2014a), observaram presença de lesões ocasionadas por *F. semitectum* em melão, com e sem molhamento, porém, sobre umidade de 48 h o tamanho das lesões foi mais expressivo.

A umidade relativa elevada auxilia na manutenção da turgidez dos frutos frescos. Além disso, é um dos fatores que mais favorece o incremento de doenças pós-colheita, em função da quantidade de gotículas que se acumulam na superfície dos frutos, criando microclima favorável para o surgimento da doença (Oliveira et al., 2014a). Portanto, algumas medidas podem ser adotadas para reduzir os riscos de doenças pós-colheita, tais como: evitar umidade elevada sob

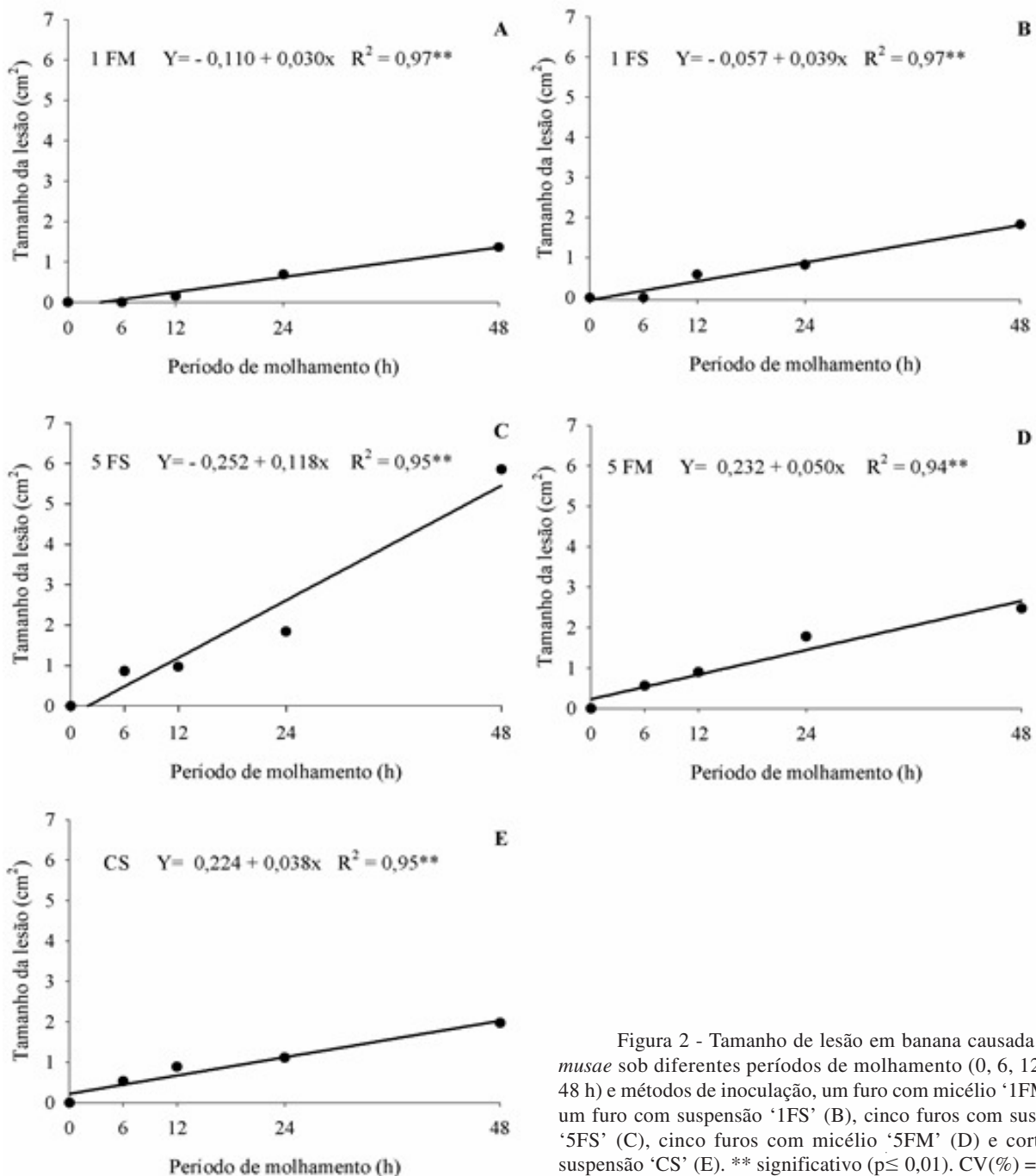


Figura 2 - Tamanho de lesão em banana causada por *C. musae* sob diferentes períodos de molhamento (0, 6, 12, 24, e 48 h) e métodos de inoculação, um furo com micélio '1FM' (A), um furo com suspensão '1FS' (B), cinco furos com suspensão '5FS' (C), cinco furos com micélio '5FM' (D) e corte com suspensão 'CS' (E). \*\* significativo ( $p \leq 0,01$ ). CV(%) = 9,20.

a superfície das frutas que normalmente é ocasionada por irrigações prolongadas, realizar desbaste de restos florais e frutas sintomáticas visando reduzir o inóculo de *C. musae* na área, implantação de cultivares resistentes, boas práticas de manejo cultural, lavagem e embalagem cuidadosa dos frutos visando evitar fermentos (Cordeiro et al., 2005). Os resultados deste estudo estabelecem

uma padronização de metodologia eficiente, prática e simples de inoculação combinada com molhamento que possui uniformidade e reprodutibilidade de sintomas de antracnose em frutas de banana, na qual pode ser utilizada com o propósito de explicar melhor a epidemiologia da doença, além de contribuir em futuros estudos de patogenicidade e variabilidade de espécies de *C. musae*.

## Conclusão

O método de inoculação cinco furos com suspensão associado a 48 h de molhamento são adequados à infecção de *C. musae*, pois proporcionam maior desenvolvimento de lesões de antracnose em banana.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor.

## Literatura Citada

- ARAUJO, A. G. et al. 2014. Host-pathogen interactions of *Musa* spp. and *Mycosphaerella musicola* with epidemiological variables and leaf anatomy within the pathosystem of Yellow Sigatoka disease. *Australian Journal of Crop Science* 8 (8):1200.
- BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. 2004. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. *Fitopatologia Brasileira* 29 (5): 555-557.
- CORDEIRO, Z. J. M.; MATOS, A. P.; KIMATI, H. 2005. Doenças da bananeira. In: Kimati, H. et al. ed. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. São Paulo, SP, Ceres. pp. 99-117.
- FERREIRA, D. F. 2008. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium* 6 (2):36-41.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO. Produção de banana, 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 10 set. 2017.
- GOMES, L. I. S. et al. 2012. Metodologia de inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de mamão. *Agrotropica (Brasil)* 24 (3):183-188.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. 2015. Produção agrícola municipal. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 22 set. 2016.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. USA, Blackwell Publishers. 420p.
- MAQBOOL, M.; ALI, A.; ALDERSON, P. G. A. 2010. Combination of gum arabic and chitosan can control anthracnose caused by *Colletotrichum musae* and enhance the shelf-life of banana fruit. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 85 (5):432-436.
- MORAES, W. D. S. et al. 2005. Termoterapia de banana 'Prata-Anã' no controle de podridões em pós-colheita. *Fitopatologia Brasileira* 30 (6):603-608.
- MORAES, W. S.; ZAMBOLIM, L.; LIMA, J. D. 2006. Incidência de fungos em pós-colheita de banana 'Prata anã' (*Musa* AAB). *Summa phytopatológica (Brasil)* 32 (1):67-70.
- NERY-SILVA, F. A. et al. 2007. Metodologia de inoculação de fungos causadores da podridão peduncular em mamão. *Ciência e Agrotecnologia (Brasil)* 31 (5):1374-1379.
- OLIVEIRA, T. A. S. et al. 2008. Efeito do estágio de maturação, tipo de inóculo e local de inoculação na severidade da podridão peduncular em manga. *Tropical Plant Pathology (Brasil)* 33 (6):409-414.
- OLIVEIRA, M. J. D. et al. 2014a. Effects of wounding, humidity, temperature, and inoculum concentrations on the severity of corky dry rot caused by *Fusarium semitectum* in melon fruits. *Acta Scientiarum. Agronomy* 36 (3):281-289.
- OLIVEIRA, T. A. S. et al. 2014b. Fatores epidemiológicos de *Phytophthora palmivora* afetando a severidade da podridão-dos-frutos do mamoeiro na pós-colheita. *Summa Phytopathologica (Brasil)* 40 (3):256-263.
- PESSOA, W. R. L. S. et al. 2007. Efeito da temperatura e período de molhamento sobre o desenvolvimento de lesões de *Colletotrichum musae* em banana. *Summa Phytopathologica (Brasil)* 33 (2):147-151.
- PLOETZ, R. C.; KEMA, G. H.; MA, L. J. 2015. Impact of diseases on export and smallholder production of banana. *Annual review of phytopathology* 53:269-288.
- SENHOR, R. F. et al. 2008. Influência do método de inoculação, intensidade do fermento e idade do fruto na severidade da podridão-de-cratera em melão. *Summa Phytopathologica (Brasil)* 34 (3):232-237.
- SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52 (3/4):591-611.
- SILVEIRA, N. S. S. et al. 2001. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. *Fitopatologia Brasileira* 26 (1):33.
- SIVIERO, A. et al. 2002. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. *Fitopatologia Brasileira* 27 (6):574-580.
- SOARES, A. R.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L. 2008. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. *Tropical Plant Pathology* 33 (4):265-272.
- UCHÔA, C. N. et al. 2012. Relação entre a temperatura e o molhamento foliar no monociclo da sigatoka-negra. *Summa Phytopathologica (Brasil)* 38 (2):144-147.
- WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73 (1):115-180.