

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA
FILHO"
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**SENSIBILIDADE DE POPULAÇÕES DE *Mycosphaerella fijienses* E
M. Musicola A TRIAZÓIS EM BANANAIS DE REGIÕES
PRODUTORAS NO ESTADO DE SÃO PAULO**

Felix Sebastião Christiano Junior

Ilha Solteira – SP
Julho de 2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA
FILHO"**

CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

FELIX SEBASTIÃO CHRISTIANO JUNIOR

Orientador: Paulo Cezar Ceresini

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Engenharia
do Campus de Ilha Solteira – UNESP
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo.

Ilha Solteira – SP
Julho de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

C555s Christiano Junior, Felix Sebastião.
Sensibilidade de populações de *Mycosphaerella fijienses* e *M. Musicola* a triazóis em bananais de regiões produtoras no estado de São Paulo / Felix Sebastião Christiano Junior,. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2022
25f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2022

Orientador: Paulo Cezar Ceresini
Inclui bibliografia

1. Fungicidas Inibidores de Desmetilase (DMI). 2. Controle químico.
3. Sigatoka negra. 4. Sigatoka amarela.


Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ENGENHARIA - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA

CURSO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA

ATA DA DEFESA – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: Sensibilidade de populações de *Mycosphaerella fijiensis* e *M. musicola* a triazóis em bananais de regiões produtoras no estado de São Paulo

ALUNO: Félix Sebastião Christiano Júnior RA: 172055202

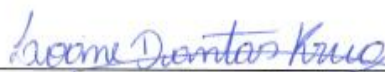
ORIENTADOR: Paulo Cezar Ceresini

Aprovado (X) - Reprovado () pela Comissão Examinadora com Nota: 8,0
(oitos)

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini
Presidente (Orientador)



Me. Loane Dantas Krug



Me. Abimael Gomes da Silva



Félix Sebastião Christiano Júnior

Ilha Solteira, 27 de julho de 2022.

DEDICO

Dedico a Deus, pois sem ele no coração, dificilmente este trabalho seria concluído. Aos meus pais, Felix Sebastião Christiano e Cleina Cristina Tomaz da Silva Christiano, por me darem todo o suporte e crédito em toda a minha jornada na graduação. **Amo de todo coração vocês.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele no coração e na vida, nada teria se realizado e se concretizado, tanto na vida pessoal e profissional.

Aos meus pais, Felix e Cleina, por sempre confiarem em minhas decisões, e por sempre me darem apoio, incentivo, presença, segurança e estabilidade, nos momentos que foram precisos. Por serem grandes pilares em minha vida, e por sempre me sustentarem.

Aos meus avós Paternos e Maternos, João Carlos e Rita, Orlando e Natalice, que sempre oraram pelo meu bem, sempre me aconselharam, e me davam dicas de como ser uma pessoa virtuosa, dedicada e perseverante.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Cezar Ceresini, pessoa de grande importância, contribuinte para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, proporcionando oportunidades únicas e expondo realidades, acreditando em minha capacidade e transmitindo toda a sua experiência profissional.

A todos os professores da graduação que me agregaram conhecimento para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, de forma direta ou indireta, durante todos esses anos da minha graduação.

Aos meus colegas e integrantes do laboratório de fitopatologia da UNESP de Ilha Solteira, por me proporcionarem grandes experiências e aprendizados, em especial ao Abimael e a Tatiane, por todos os dias de trabalho, aos momentos de lazer e as experiências trocadas durante todo o período, e por se terem se tornados grandes amigos. Ao Felipe e a Katherin, por serem grandes profissionais e por me compartilharem grande parte de seu conhecimento em um pouco espaço de tempo, e também por se tornarem grandes amigos e podermos compartilhar grandes momentos junto. Agradeço também a Samara, por ter aberto as portas do Laboratório para mim, por dedicar seu tempo em me educar profissionalmente. Agradeço ao Silvino, pelos conselhos profissionais e também pelos momentos de lazer. Espero levar a amizade de vocês para a vida toda.

Aos colegas da Iniciação Científica, Lucas, Maria Clara, Davi e Vitor, se tornaram grandes amigos, e com eles vieram trocas de experiências profissionais e compartilhamento de ideias, e por grandes momentos de lazer.

Aos meus amigos moradores da República Sukupira e agregados, por momentos de lazer e convívio, seja momentos bons ou ruins, sendo como irmãos durante toda a graduação. Espero que a nossa amizade dure para sempre.

Aos meus amigos Brian, Diego, Nelson, Carlos, Heitor, Iago, Murillo, Davi Prata, Bruno e Felipe, importantes em momentos de estudos e lazer.

Ao grupo de profissionais do colégio Decisão-Anglo de Nova Granada - SP, que com a grande ajuda deles, me ajudaram a ingressar na UNESP – FEIS, e por fim realizar toda a graduação.

Aos Professores João Britto, Décio e Ariad, por me darem muito suporte no momento em que eu estava pra ingressar na Faculdade, sem eles nada teria sido concretizado.

As minhas Primas Pamela, Rosana e Maria Clara, aos meus Primos João Ricardo, Leonardo, Nicolas, Willian, Lucas, por grandes momentos de alegria, suporte e lazes.

A todos os tios e tias da minha família, foram importantes em um momento de minha vida, e carrego eles em meu coração pela dedicação, em educar, ensinar e aconselhar.

Ao Professor Rafael Montanari, por ter tornado um grande amigo e por cumprir muito bem seu papel com Professor e amigo.

A todos que eu agradei aqui foram de grandes importâncias em algum momento em minha jornada e espero levar a amizade de vocês para toda a vida, cada um que foi mencionado de forma direta ou indireta contribuiu para o meu crescimento tanto profissional quanto pessoal.

Ao Programa PIBIC UNESP/CNPq 2020/21 pela concessão de bolsa de iniciação científica ao discente (Processo 1012), e ao CNPq que concedeu bolsa de produtividade à pesquisa ao orientador (Pq-1D 313825/2018-1).

RESUMO

As sigatokas negra (*Mycosphaerella fijiensis*, *Mf*) e amarela (*M. musicola*, *Mm*) são as doenças foliares mais destrutivas da bananeira no Brasil. Os fungos produzem grande quantidade de esporos sexuados e assexuados, com alta variabilidade genética e alta capacidade evolucionária nas populações. Os fungicidas Inibidores de desmetilação de esterol (DMIs) estão entre os mais comumente utilizados para o controle destas doenças, e a pressão de seleção pelo uso contínuo tem levado à seleção de populações resistentes. Devido à importância destas doenças para as regiões produtoras de banana no Brasil, é urgentemente necessário o conhecimento sobre o nível de sensibilidade de *Mf* e *Mm* a fungicidas inibidores de desmetilação de esterol (DMIs). O conhecimento prévio dos cenários de resistência a fungicidas em regiões e áreas produtoras de banana do país poderá ser utilizados para orientar os produtores a adotarem estratégias anti-resistência. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi analisar a sensibilidade de populações de *Mycosphaerella spp.* a fungicidas DMIs. A resistência dos isolados foi determinada com base nos valores de EC_{50} para o fungicidas DMI/triazóis amplamente utilizados: tebuconazol e propiconazol. As populações de patógenos utilizadas em nosso estudo são oriundas do Vale do Ribeira e do Noroeste de São Paulo. O Vale do Ribeira representa a maior produção de banana do estado, predominando o plantio das variedades Prata e Nanica, onde são feitas em torno de 8 a 12 aplicações anuais de fungicidas, principalmente azoles. No Noroeste paulista foi coletada uma área plantada de agricultura familiar, sem aplicação de fungicidas. A região de maior aplicação de fungicida (Vale do Ribeira) apresentou maior quantidade de isolados resistentes, tanto para propiconazol quanto para tebuconazol. Quanto à amostragem de espécies, a *Mycosphaerella fijiensis* foi encontrada apenas no Vale do Ribeira e a *M. musicola* apenas no Noroeste Paulista. No entanto, em ambas as populações apresentam elevado risco de se tornarem insensíveis aos DMIs avaliados.

Palavras-chave: fungicidas inibidores de desmetilase (DMI), controle químico, sigatoka negra, sigatoka amarela.

ABSTRACT

The black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*, *Mf*) and yellow (*M. musicola*, *Mm*) are the most destructive foliar diseases of banana in Brazil. Fungi produce many sexual and asexual spores, with high genetic variability and high evolutionary capacity in populations. Sterol Demethylation Inhibitors (DMI) fungicides are commonly used to control these diseases, and the continued use has led to the selection of resistant populations. Due to the importance of these diseases for banana-producing regions in Brazil, knowledge about the level of sensitivity of *Mf* and *Mm* to DMI is urgently needed. Prior knowledge of resistance scenarios to fungicides in banana-producing regions and areas of the country could guide the producers to adopt anti-resistance strategies. Therefore, the objective of this study was to analyze the sensitivity of *Mycosphaerella* spp. Populations to DMI fungicides. The resistance of the isolates was determined based on the EC₅₀ values for the DMI fungicides/triazoles widely used, tebuconazole and propiconazole. The isolates come from the Ribeira Valley and the Northwest of São Paulo, the region represents the largest banana production in the state, predominating the planting of the Prata and Nanica varieties, where around 8 to 12 annual applications of fungicides, mainly azoles. In the Northwest of São Paulo, a planted area of family farming, without fungicide application. The region with the highest fungicide application (Ribeira Valley) showed more resistant isolates for both propiconazole and tebuconazole. As for species sampling, the *Mycosphaerella fijiensis* was found only in the Ribeira Valley and *M. musicola* only in the Northwest Paulista. However, they are at high risk of becoming insensitive to the DMIs evaluated in both populations.

Keywords: fungicides demethylase inhibitors (DMI), chemical, black sigatoka, yellow sigatoka.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação da sensibilidade da <i>Mm</i> e <i>Mf</i> aos fungicidas DMIs.....	13
Tabela 2. Súmula da análise de variância da sensibilidade de espécies de <i>Mycosphaerella</i> a fungicidas.....	14
Tabela 3. Classificação dos isolados de <i>Mycosphaerella musicola</i> (<i>Mm</i>) e <i>M. fijiensis</i> (<i>Mf</i>) amostrados de duas populações dos patógenos da Sigatoka amarela e negra, respectivamente, no estado de São Paulo, com base na EC50 aos fungicidas DMI triazóis.....	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação de espécies (<i>Mm</i> – <i>Mycosphaerella musicola</i> e <i>Mf</i> – <i>Mycosphaerella fijiensis</i>) quanto a resistência aos DMIs.....	16
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVO.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Identificação molecular das espécies	13
3.2 Fenotipagem quanto `a sensibilidade aos triazóis	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	16
5. CONCLUSÕES.....	19
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1. INTRODUÇÃO

O complexo de sigatokas da bananeira (DSB) causado pelos fungos *Mycosphaerella fijiensis* (*Mf*) e *Mycosphaerella musicola* (*Mm*) (sigatoka negra e sigatoka amarela, respectivamente) representa as doenças foliares mais destrutivas da cultura no Brasil (BRITO et al., 2015; BRITO et al., 2020; SILVA et al., 2017).

As sigatokas são doenças policíclicas, havendo grande produção de esporos sexuados e assexuados, e estudos recentes no Brasil, México e Filipinas revelaram populações de *Mm* e *Mf* com alta variabilidade genética oriunda tanto de reprodução sexuada quanto de fluxo gênico, com alta capacidade evolucionária (MANZO-SÁNCHEZ et al., 2019; MENDONZA & ARDALES, 2019; GOMES et al., 2018). A resistência varietal é ausente ou parcial na maioria das cultivares de banana e consequentemente, o uso intensivo de fungicidas sistêmicos ou protetores tem sido a principal medida empregada para o manejo da doença, resultando em forte pressão de seleção para o surgimento de populações de patógenos resistentes (BRITO et al., 2020; DIAZ-TRUJILLO et al., 2018).

Os fungicidas inibidores de desmetilação de esterol (DMIs) estão entre os mais comumente utilizados para o controle das sigatokas. Abrangem um grande grupo de fungicidas (imidazóis, triazóis, piperidinas, piridinas, pirimidinas e triazolintionas) e estão entre os produtos químicos mais usados no controle de patógenos fúngicos humanos e vegetais. Inibem a biossíntese de ergosterol, um componente essencial da membrana celular fúngica (YANG et al., 2009), tendo como alvo a enzima 14 α -desmetilase codificada pelo gene *CYP51*, um membro da família do citocromo P450 (ZHAN et al., 2006).

Na agricultura, esse grupo de fungicidas domina o mercado de agrotóxicos desde a sua introdução na década de 1970 (COOLS et al., 2013). O uso contínuo de DMIs pressiona consideravelmente a seleção natural de populações de *Mf*, permitindo a seleção de novos genótipos com redução de sensibilidade (DIAZ-TRUJILLO et al., 2018). A perda de sensibilidade a DMIs pode ocorrer por diferentes mecanismos. No Brasil, a alteração do sítio-alvo foi verificada recentemente para populações de *Mm* do Distrito Federal, onde a mutação não-sinônima Y461N em *CYP51* foi observada em isolados resistentes à DMIs (BRITO et al., 2020). Malimpensa (2018) também verificou a presença de mutações não-sinônimas em *CYP51*, para um isolado de *Mm* (A381G e Y463H) e para dois isolados de *Mf* (G462D e Y463H), oriundos de bananais do Vale do Ribeira, São Paulo. Outro mecanismo descrito para a resistência de *Mf* a DMIs é o

aumento da expressão de *CYP51* por meio de inserções de pequenas sequências em sua região promotora (Diaz-Trujillo et al., 2018), sendo esta uma característica herdável (CHONG et al., 2019).

Poucos são os estudos sobre fenotipagem de *Mm* e *Mf* para a resistência a fungicidas DMIs no Brasil. Utilizando o método de suspensão micelial do patógeno em microplacas, Gomes et al. (2014) avaliaram a EC_{50} de tebuconazol para 60 isolados de *Mf* coletados em 2008/2009 de diferentes estados do Brasil. Os autores verificaram que a EC_{50} média foi de $0,36 \mu\text{g mL}^{-1}$, e que apenas 13% dos isolados apresentaram valores maiores que $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. No estudo realizado por Malimpensa (2018), a EC_{50} de propiconazol para *Mf* e *Mm* de 2016/2017 foi entre 0,1 e $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Brito et al. (2020) realizaram estudo sobre a resistência de *Mm* a fungicidas triazóis com isolados oriundos de 10 diferentes localidades do país, de 2013/2015, também com o método de suspensão micelial. Como ilustração das observações de Brito e colaboradores, um isolado resistente (13SJA) a epoxiconazol, tebuconazol e propiconazol apresentou EC_{50} de 0,01, 0,3 e $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente; e um isolado sensível (7CPAC) apresentou EC_{50} de aproximadamente 0,004, 0,02 e $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, o fator de resistência associado a estes fungicidas (i.e., o valor de EC_{50} médio de isolados resistentes dividido pelo valor médio dos sensíveis) foi de 2,2, 9,1 ou 4,2 vezes superior. No estudo de Aguierre (2016), isolados de *Mf* de países da América do Sul, América Central e África foram classificados em categorias quanto a sensibilidade a propiconazol de acordo com a EC_{50} : $\leq 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$: sensíveis; entre 0,1 e $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$: tolerantes; $\geq 1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$: resistentes.

No momento, ainda existem dificuldades em diagnosticar a evolução da resistência destes fungos a azoles e outros grupos químicos, pois a informação existente é esparsa e corresponde a diferentes agroecossistemas, com variação no manejo, nos produtos utilizados, nas espécies predominantes (*Mf* ou *Mm*), e métodos de fenotipagem, inexistindo uma continuidade de avaliação ao longo do tempo, para acompanhar, por exemplo, a dinâmica das populações resistentes/sensíveis, assim como aumento ou redução da sensibilidade a determinados fungicidas.

O Vale do Ribeira, uma das regiões foco desse estudo, representa a maior produção convencional de banana do estado de São Paulo, predominando o plantio das variedades Prata (*Musa* sp. AAB) e Nanica (*Musa* sp. AAA), sob pulverização intensiva de fungicidas. Uma vez que estas são suscetíveis às sigatokas, existe alta pressão de seleção pelo uso frequente de fungicidas para o controle de sigatokas, com cerca de 8 a 12 aplicações anuais (MALIMPENSA, 2018). Nestas áreas as duas doenças estão

presentes, com predomínio da sigatoka negra devido sua característica de maior severidade (MORAES et al., 2005). Outra região incluída em estudo é o Noroeste do estado. Uma das propriedades amostradas possui área plantada de 40 ha com bananeira var. Maçã (triplóide AAB), suscetível às sigatokas (ROCHA et al. 2102), e onde se realiza controle químico extensivo devido à alta severidade da sigatoka amarela, com cerca de quatro pulverizações ao ano. Uma terceira amostragem foi efetuada em pequenas propriedades do Noroeste do estado, em plantios com sistema de produção de agricultura familiar sem uso de fungicidas, onde são cultivadas diversas variedades.

O estudo sobre a resistência dos fungos *M. fijiensis* e *M. musicola* associados à DSBs contribuirá gerando conhecimento relevante sobre o atual cenário de importância e amplitude de distribuição da resistência a fungicidas DMI, usados intensivamente na cultura da bananeira. Isso permitirá orientar os produtores a adotarem estratégias anti-resistência.

2. OBJETIVO

Diante desses pressupostos, para buscar evidências da ocorrência de resistência a fungicidas do grupo DMI em populações de *M. fijiensis* e *M. musicola* associadas à sigatoka negra ou amarela em bananais de diferentes localidades no estado de São Paulo, objetivou-se: isolar e identificar fungos causadores de DSBs em bananais de duas diferentes regiões em São Paulo utilizando métodos morfológicos e moleculares; caracterizar os diferentes níveis de resistência de *M. fijiensis* e *M. musicola* em cada área amostrada para os fungicidas do grupo DMI - triazóis (propiconazol e tebuconazol), baseando-se em valores de EC₅₀ (concentrações efetivas dos fungicidas para inibir em 50% o crescimento micelial).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Uma primeira amostragem foi realizada em fevereiro de 2020 na região do Vale do Ribeira, das variedades Prata (*Musa* sp. AAB) e Nanica (*Musa* sp. AAA), sob pulverização intensiva de fungicidas. Em março de 2020 realizou-se a amostragem no noroeste de São Paulo, em uma área produtora de bananeira cv. Maçã de 40 ha, onde o controle químico é feito de modo extensivo. Em março e abril de 2020, também no

noroeste de São Paulo, realizaram-se amostragens em bananais com mistura de variedades onde não há aplicação de fungicidas.

Fragmentos de folhas de bananeira de diferentes idades e diferentes cultivares com sintomas de sigatoka amarela ou sigatoka negra com cerca de 20 × 20 cm foram coletados. Em cada localidade, os pontos de coletas consistiram em áreas de 50 m² cada, de onde foram amostradas cerca de cinco plantas. Os fragmentos de folhas foram acondicionados em sacos de papel e transportados para o laboratório da UNESP de Ilha Solteira. As amostras foram mantidas em geladeira até o isolamento dos patógenos. Em cada localidade.

Para realizar o isolamento dos patógenos, utilizamos a metodologia de Alfenas e Mafia (2016), com modificações: fragmentos com cerca de 1 cm² com tecidos lesionados e sadios foram lavados em água destilada por 1 minuto, em seguida foram tratados com álcool 75% durante 1 minuto, novamente lavados em água destilada por 30 segundos, secos em papel filtro e transferidos para o meio ágar-água (AA) 2%. Após 24h os fragmentos de folhas foram examinados em microscópio estereoscópico verificando-se a presença de esporodóquios de *Mycosphaerella* spp. na face abaxial. Verificando-se a presença destes, foi feito isolamento direto, utilizando-se uma agulha para transferir os conídios presentes para placas de Petri com meio batata-dextrose-ágar BDA [20,8g L⁻¹ de batata-dextrose (Kasvi, Itália), 15g L⁻¹ de ágar] e incubando-se por 15 dias sob 12 h de fotoperíodo a 25 °C (GOMES et al., 2013).

Os isolados obtidos foram preservados por meio da criopreservação de micélio em discos de papel com 0,5 cm de diâmetro em criotubos contendo sílica gel que foram mantidos em freezer - 20 °C.

3.1 Identificação molecular das espécies

Para a identificação molecular das espécies de *Mycosphaerella*, os isolados foram reativados em meio BDA por 10 dias, separou-se cerca de 1 cm² de micélio por amostra que foi liofilizado por 48 h. O micélio liofilizado foi utilizado para extração de DNA usando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de DNA é efetuada com espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA) para se obter diluições à concentração final de 100 ng µL⁻¹.

Os primers específicos para *M. musicola* (CytB_Mm_F1251: 5'-GTTACCTTTGAAACTTCGGATC-3'; CytB_MmR: 5'-GAGACTCAACGTGTTTAGCCC-3') e *M. fijiensis* (CytB_exon1-1_Mf_F2036: 5'-CGTCGCCGTAATGTGGTTC-3'; CytB_exon1-2_Mf_R2511: 5'-GCCGCAACCTTCTAATATTAG-3') foram desenhados com base em sequências do gene que codifica para CytB. As reações de polimerase em cadeia (PCR) ocorreram em termociclador ProFlex (Applied Biosystems, EUA). A reação tem volume total de 25 µL, composta de 1 × PCR buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1,5 mM MgCl₂, 60 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada primer, 1,5 U de Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), e 100 ng de DNA genômico. As condições para a PCR foram: 5 min a 95 °C; seguido de 36 ciclos de 94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s, e 72 °C por 60 s; e 72°C por 7 min. Os amplicons foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose, e as espécies foram identificadas de acordo com o tamanho dos fragmentos revelados. A identificação de *M. fijiensis* é confirmada pela observação de um fragmento de 475 pb, e de 963 pb para *M. musicola*. Foram incluídos controles positivos para as duas espécies e controles negativos usando DNA extraído de fungo basidiomiceto *Rhizoctonia solani* AG-1 IA e do fungo ascomiceto *Pyricularia oryzae* linhagem *Triticum*, disponíveis no laboratório: A ferramenta BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (ALTSCHUL et al., 1990), no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) foi utilizada para comparação das sequências obtidas com sequências já depositadas no banco de dados e confirmaram a identificação das espécies.

3.2 Fenotipagem quanto a sensibilidade aos triazóis

Os isolados de *Mycosphaerella* sp. cuja identificação molecular da espécie foi confirmada foram selecionados para experimentos de sensibilidade a fungicidas. O fungicida Tilt (DMI-propiconazol a 250 g L⁻¹; Syngenta S.A.) foi diluído em água deionizada para produzir as soluções estoque de até 25 µg mL⁻¹, que foram usadas em todo o experimento. O fungicida Riza (DMI - tebuconazol a 200 g L⁻¹; FMC S.A.) foi dissolvido em água deionizada a 0,1 g mL⁻¹ seguido por diluição em água deionizada para obter a solução estoque de 20 µg mL⁻¹.

A solução de fragmentos miceliais para os experimentos de fenotipagem foi obtida por protocolo desenvolvido pelo autor: após o crescimento da colônia de fungos

cultivadas por 10 dias em BDA a 25°C em regime de luz, sendo 12 horas de luz e 12 horas de claro, retirou-se amostras miceliais com área de 1 cm² que foram maceradas com o uso de cadinhos e pistilos cerâmicos com 5 mL de água esterilizada com 0,05 mL⁻¹ de tensoativo.

O teste quantitativo para avaliação da sensibilidade aos triazóis (DMIs) foi conduzido usando placas de Petri (Kasvi, Itália) contendo BDA (contendo antibióticos cloranfenicol e estreptomicina à 50 µL mL⁻¹ cada) com doses crescentes de fungicidas propiconazol e tebuconazol que variaram de zero (tratamento controle) a 5 µg mL⁻¹, sendo as respectivas doses: 0; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 5. Sobre o meio de BDA, a solução de inóculo (5 µL) foi pipetada em discos de papel de filtro (0,5 mm de diâmetro) esterilizados. As placas de Petri foram lacradas com plástico filme e dispostas em delineamento inteiramente casualizado no interior de incubadora do tipo B.O.D. por 15 dias a 26 °C. Para cada fungicida foi montado um ensaio e sua réplica e cada experimento contendo quatro repetições das unidades experimentais. Para avaliar a sensibilidade dos isolados para os fungicidas propiconazol e tebuconazol foram utilizados os métodos de Cañas-Gutierrez et al. (2009) e Aguierre (2016), modificados (Tabela 1), determinando-se a EC₅₀ (i.e., a concentração do fungicida que induz metade do efeito máximo refere-se à concentração na qual o fungicida inibe em 50% o crescimento micelial).

Aos quinze dias de incubação, foi mensurado o diâmetro da colônia (mm nas duas direções). Os valores dos diâmetros de colônia sem fungicida (controle) representaram o crescimento a 100%, então, por regra de três, para cada isolado foi calculado a porcentagem de crescimento para suas repetições e suas diluições de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 5,0ppm dos fungicidas utilizados no experimento. Por conseguinte, a concentração efetiva do fungicida capaz de inibir em 50 % do crescimento micelial (EC₅₀) foi calculado com base na porcentagem de crescimento de cada isolado nas diferentes concentrações dos fungicidas quando comparados ao crescimento nas placas sem fungicidas (testemunha), após regressão das porcentagens (X) versus o log₁₀ da concentração de fungicidas (Y). Foi utilizado o procedimento PROJ.LIN (X;Y) do pacote Office do Windows - Excel 2010. Com base nos valores de EC₅₀ e nas porcentagens de crescimento obtidos das concentrações de 0,001 a 5ppm de fungicida.

O experimento e sua réplica foram montados em delineamento inteiramente casualizado e para avaliar a influência dos tratamentos foram utilizados testes de média ($p < 0,05$).

Tabela 1. Classificação da sensibilidade da *Mm* e *Mf* aos fungicidas DMIs.

Classes fenotípicas	EC ₅₀ intervalos (µg mL ⁻¹)	
	DMIs	
	Propiconazol	Tebuconazol
Sensível (S)	≤ 0,005	≤ 0,02
Sensibilidade reduzida (SR)	> 0,005 até 0,05	> 0,02 até 0,2
Resistência Moderada (RM)	> 0,05 até 1	> 0,2 até 2
Resistente (R)	>1	> 2
	Cañas-Gutierrez et al. (2009), modificado	Aguirre (2016), modificado

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram detectadas diferenças significativas ($p \leq 0,05$) do efeito dos tratamentos. Por sua vez, não houve diferença significativa entre réplicas dos experimentos assim como as interações Experimento*Isolados e Experimento*Espécies foram não significativas, indicando completa reprodutibilidade das observações, independente do experimento (Tabela 2).

Tabela 2. Sùmula do quadro de análise de variância com os quadrados médios e a significância do teste F por variável, para sensibilidade de *Mycosphaerella* spp. a fungicidas.

Fator de variação	Graus de liberdade	Propiconazol	Tebuconazol
Experimento	1	0,00007 ^{ns}	0,000158 ^{ns}
Isolados	9	0,06576 ^{**}	1,603273 ^{**}
Experimento * Isolados	9	0,000003 ^{ns}	0,000167 ^{ns}
Resíduos	60	0,000001	0,000277
Experimento	1	0,000007 ^{ns}	0,000158 ^{ns}
Espécies	1	0,476324 ^{**}	7,347629 ^{**}
Experimento * Espécie	1	0,000006 ^{ns}	0,000160 ^{ns}
Resíduos	76	0,001521	0,093419

** significativo a 1% pelo teste F; ^{ns} não significativo

Detectou-se baixa frequência de isolados sensíveis ($EC_{50} < 0,005$ para propiconazol e $EC_{50} < 0,02$ para tebuconazol) (Tabela 3), demonstrando um cenário preocupante quanto às doses efetivas para o controle da doença na cultura da bananeira, já que ocorre forte pressão de seleção sobre os indivíduos, e em longo prazo ineficácia das moléculas fungicidas. Ao comparar as espécies do patógeno (figura 1), notou-se que as maiores médias de EC_{50} , tanto para propiconazol quanto para tebuconazol, foram observadas para *M. fijiensis* (*Mf*) do Vale do Ribeira. Esse perfil de menor sensibilidade da população de *Mf* está possivelmente relacionado ao maior número de aplicações anuais

de fungicidas. Enquanto em bananais do Vale do Ribeira relatou-se mais de 10 aplicações de fungicidas, no Noroeste Paulista [onde predomina a incidência de Sigatoka amarela causada por *M. musicola* (*Mm*)] há uma média de 4 aplicações (Tabela 3, figura 1).

Foi identificado um único isolado sensível a tebuconazol na região do Vale do Ribeira (Tabela 3), sendo este um isolado de *Mf*. Sua sensibilidade pode ser explicada pelo patógeno ter migrado (por fluxo gênico decorrente do transporte de esporos aéreos do patógeno) de uma área onde não se realiza a aplicação deste fungicida, já que o mesmo já apresenta resistência moderada para propiconazol.

Tabela 3. Classificação dos isolados de *Mycosphaerella musicola* (*Mm*) e *M. fijiensis* (*Mf*) amostrados de duas populações dos patógenos da Sigatoka amarela e negra, respectivamente, no estado de São Paulo, com base na EC₅₀ aos fungicidas DMI triazóis.

Isolado	Espécie	População	EC ₅₀ para propiconazol (µg.mL ⁻¹)		EC ₅₀ para tebuconazol (µg.mL ⁻¹)	
ISC-009	<i>Mm</i>	Noroeste	0,015 ^G	SR	0,041 ^E	SR
ISC-033		Paulista	0,010 ^G	SR	0,045 ^E	SR
ISC-097			0,019 ^F	SR	0,050 ^E	SR
ISC-111			0,014 ^G	SR	0,041 ^E	SR
ISC-119			0,016 ^G	SR	0,044 ^E	SR
Média			0,015 ^B	SR	0,044 ^B	SR
JA-2.24	<i>Mf</i>	Vale do	0,274 ^A	RM	0,861 ^C	RM
JA-2.29b		Ribeira	0,149 ^C	RM	0,912 ^B	RM
JA-3.6			0,126 ^E	RM	0,002 ^F	S
SA-06			0,160 ^B	RM	0,328 ^D	RM
SA-14			0,137 ^D	RM	1,148 ^A	RM
Média			0,169 ^B	RM	0,650 ^A	RM

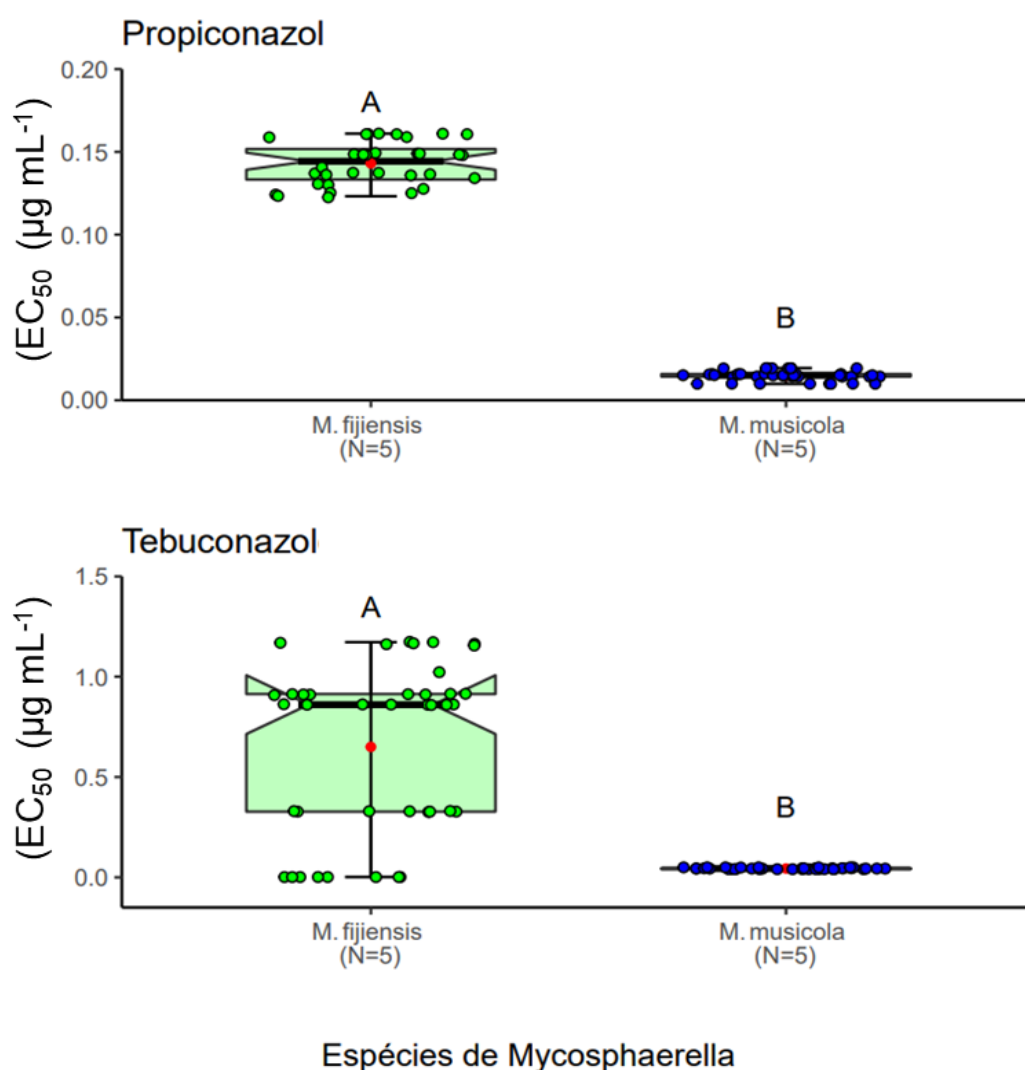
Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (espécie e população) e Scott-Knott (Isolados). Classificação das sensibilidades: S (sensível), **SR** (sensibilidade reduzida) e **RM** (resistência moderada). A classificação foi adaptada de Cañas-Gutierrez et al. (2009) e Aguierre (2016).

De acordo com Brito (2015), foram detectadas diversas mutações no gene *CYP51* em *M. fijiensis* e *M. musicola* com efeitos semelhantes no processo de resistência aos fungicidas DMI triazóis. A pressão de seleção decorrente da pulverização desses fungicidas faz com que as mutações conferindo resistência aos DMIs aumentem em frequência e se fixem nas populações dos patógenos da Sigatoka amarela e negra. A média para propiconazol em *M. Musicola*, no Noroeste Paulista foi de 0,015, o que indica uma sensibilidade reduzida, para tebuconazol observou o mesmo, porém apresentaram um valor de 0,044. No Vale do Ribeira, com a população de *M. fijienses*, a média para

propiconazol foi de 0,169, já apresentando uma resistência moderada, enquanto que para tebuconazol obteve um valor de 0,650, indicando também uma resistência moderada.

Além disso, se os eventos mutacionais seguidos de seleção para resistência normalmente estão associados a fluxo gênico intenso pela dispersão aérea de esporos assexuais de indivíduos do patógeno com fenótipo de resistência a DMIs. Esse conjunto de processos microevolutivos em cadeia potencializa a disseminação da resistência entre cultivos de bananeira. É provável que esses genótipos do patógeno com resistência a DMI tenham habilidade competitiva e adaptabilidade suficientes para se estabelecer em novas populações (Chong et al., 2019).

Figura 1. Comparação de espécies (*Mm* - *Mycosphaerella musicola* e *Mf* - *Mycosphaerella fijiensis*) quanto a resistência aos DMIs.



Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÕES

Isolados de *Mf* provenientes do Vale do Ribeira, a região com uso intensivo de fungicidas triazóis na bananeira, são mais resistentes a propiconazol e tebuconazol que isolados de *Mm* provenientes do Noroeste Paulista.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIERRE, P.A.C. The origin, versatility and distribution of azole fungicide resistance in the banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. **PhD thesis**, Wageningen University, Wageningen, NL, 2016.
- ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G. **Métodos em Fitopatologia** 2ª ed. Viçosa: Editora UFV. 2016. 516 p.
- ALTSCHUL, SF.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, EW.; LIPMAN, DJ. **Basic local alignment search tool**. J Mol Biol. 1990 Oct 5;215(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. PMID: 2231712.
- BRITO, F. S. D. et al. Sigatoka Disease Complex of Banana in Brazil: Managment Practices and Future Directions. **Outlooks on Pest Management**, v. 26, p. 78-81, 2015.
- BRITO F.S.D. et al. Genetic Diversity and Azole Fungicide Sensitivity in *Pseudocercospora musae* Field Populations in Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v.11, doi: 10.3389/fmicb.2020.00099, 2020.
- CHONG, P. et al. *Pfcyp51* exclusively determines reduced sensitivity to 14 α -demethylase inhibitor fungicides in the banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. **PLOS ONE**, 14 (10), art. no. e0223858, 2019.
- COOLS, H.J. et al. Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. **Plant Pathology**, v. 62, p. 36-42. 2013.
- DIAZ-TRUJILLO, C. et al. A new mechanism for reduced sensitivity to demethylation-inhibitor fungicides in the fungal banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. **Molecular Plant Pathology**, v. 19, p. 1491-1503, 2018.
- GOMES, L.I.S. et al. *Mycosphaerella musicola* Identified as the Only Pathogen of the Sigatoka Disease Complex Present in Minas Gerais State, Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 12, 2013.
- GOMES et al. Yellow sigatoka epidemics caused by a panmictic population of *Mycosphaerella musicola* in Brazil. **Plant Pathology**, v.67, p.295–302, 2018.

- MALIPENSA, J. R. Caracterização da resistência a fungicidas em populações de fungos associados a lesões de Sigatokas em bananais do Vale do Ribeira (SP). **Dissertação (Mestrado)**. Instituto Biológico (São Paulo). Programa pós-graduação, 2018.
- MANZO-SÁNCHEZ et al. Genetic variability of *Pseudocercospora fijiensis*, the black Sigatoka pathogen of banana (*Musa* spp.) in Mexico. **Plant Pathology**, v.68, p.513–522, 2019.
- MENDONZA; ARDALES. Population Structure of the Banana Black Sigatoka Pathogen [*Pseudocercospora fijiensis* (M. Morelet) Deighton] in Luzon, Philippines. **Philippines Agricultural Scientist**, v.102, n.3, p.211-219, 2019.
- MORAES, W.S. et al. Dominância da Sigatoka-negra em bananais do Vale do Ribeira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 193. 2005.
- ROCHA, F.S. et al. Aspectos Diagnósticos entre *Mycosphaerella* spp. da Bananeira, Distribuição e Manejo no Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.14, p. 64-84, 2012.
- SILVA, L.J.S. et al. Análise dos impactos econômicos, sociais e ambientais da tecnologia: deposição de fungicidas na axila da segunda folha da bananeira para o controle da sigatoka-negra. Circular 130. Manaus: **Embrapa Amazônia Ocidental**. 35p. 2017.
- VARGAS, M.H. ED50plus v1.0. **Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, Mexico DF, Mexico, 2000.
- YANG, J. et al. Expression and homology modelling of sterol 14 α -demethylase of *Magnaporthe grisea* and its interaction with azoles. **Pest Management Science**, v. 65, p.60-265. 2009
- ZHAN, J. et al. Selection for increased cyproconazole tolerance in *Mycosphaerella graminicola* through local adaptation and in response to host resistance. **Molecular Plant Pathology**, v.7, p.259-268. 2006.