

**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**  
**Instituto Biológico**  
**Programa de Pós-Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no**  
**Agronegócio**

**Caracterização da resistência a fungicidas em populações de fungos associados a lesões de**  
**Sigatocas em bananais do Vale do Ribeira (SP)**

**Julia Rossi Malimpensa**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e  
Ambiental no Agronegócio. Área de Concentração:  
Segurança Alimentar e Sanidade no  
Agroecossistema

**São Paulo**

**2018**

**Julia Rossi Malimpensa**

**Caracterização da resistência a fungicidas em populações de fungos associados a lesões  
de Sigatokas em bananais do Vale do Ribeira (SP)**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre  
em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no  
Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no  
Agroecossistema.

Orientador:  
Professor Dr. Ricardo Harakava

Co-orientador:  
Dr. Wilson da Silva Moraes

São Paulo  
2018

Eu **Julia Rossi Malimpensa**, autorizo o Instituto Biológico (IB-APTA), da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, a disponibilizar gratuitamente e sem ressarcimento dos direitos autorais, o presente trabalho acadêmico, de minha autoria, no portal, biblioteca digital, catálogo eletrônico ou qualquer outra plataforma eletrônica do IB para fins de leitura, estudo, pesquisa e/ou impressão pela Internet desde que citada a fonte.

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Malimpensa, Julia Rossi.

Caracterização da resistência a fungicidas em populações de fungos associados a lesões de Sigatocas em bananais do Vale do Ribeira (SP). / Julia Rossi Malimpensa - São Paulo, 2018.

79 p.

doi: 10.31368/PGSSAAA2018.D.JM07

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.  
Linha de pesquisa: Manejo integrado de pragas e doenças em ambientes rurais e urbanos.

Orientador: Ricardo Harakava.

Versão do título para o inglês: Characterization of fungicide resistance in populations of fungi associated with Sigatocas lesions in the Ribeira Valley (SP).

1. *Musa* sp. 2. Benzimidazol 3. Propiconazol 4. Estrobilurina 5. Beta-tubulina  
I. Malimpensa, Julia Rossi II. Harakava, Ricardo III. Instituto Biológico (São Paulo)  
IV. Título.

IB/Bibl./2018/007

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Julia Rossi Malimpensa

Título: Caracterização da resistência a fungicidas em populações de fungos associados a lesões de Sigatokas em bananais do Vale do Ribeira (SP).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar uma jornada tão iluminada e cheia de realizações.

A toda minha família, especialmente minha mãe, minha vó, meu vô, meu tio, minha irmã e minha madrinha por sempre me apoiarem e me fortalecerem, durante todos os desafios.

A todos os envolvidos no desenvolvimento dessa dissertação, principalmente ao meu co-orientador Wilson da Silva Moraes, por me incentivar e me apoiar não apenas com instruções preciosas, mas com carinho e estímulo. Sem o senhor eu não teria conseguido, meu mutíssimo obrigada.

Ao meu orientador Ricardo Harakava, pelos ensinamentos, pela paciência e pela dedicação em todos os passos do mestrado.

Ao técnico de laboratório da APTA do Vale do Ribeira, Alberto, por me auxiliar, me acompanhar e me divertir em todas as coletas.

Aos engenheiros agrônomos, por se disponibilizarem a me acompanhar nas coletas e por responderem aos questionários com tamanho interesse e honestidade.

Aos produtores agrícolas, que permitiram as coletas em suas propriedades possibilitando o desenvolvimento desta dissertação.

Às minhas amigas, que Deus colocou no meu caminho, pois essas nunca me deixaram faltar alegria, companheirismo, valiosos e extremamente necessários momentos de amizade: Mel, Marina Buti, Priscila Hiro, Camila, Maria, Gabriel, Kassiane Lendis e Amanda Mimo.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

Obrigada imensamente a cada um de vocês, todos sempre terão um lugar especial no meu coração.

## RESUMO

MALIMPENSA, Julia Rossi. **Caracterização da resistência a fungicidas em populações de fungos associados a lesões de Sigatokas em bananais do Vale do Ribeira (SP). 2018.** 79f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

O Vale do Ribeira representa 67% da área cultivada de bananas do estado de São Paulo. A região tem período chuvoso e temperatura elevada (nov-abr) e período menos chuvoso com baixas temperaturas (mai-out), favorecendo a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) e a Sigatoka Amarela (*Mycosphaerella musicola*), que provocam desfolha na planta e comprometem a produção. Em variedades suscetíveis (Prata e Nanica), a utilização de fungicidas para controle dessas doenças é inevitável. O Comitê de Ação contra a Resistência a Fungicidas (FRAC) relatou em 2013, populações de *M. fijiensis* com baixa sensibilidade aos fungicidas Benzimidazóis na Costa Rica, Equador, Colômbia, Guatemala e Honduras; aos Triazóis, na Costa Rica e Panamá; e às Estrobilurinas, na Costa Rica, Colômbia, Guatemala e Panamá. O presente estudo avaliou a resistência de fungos isolados de lesões foliares de bananeiras com sintomas de Sigatoka aos fungicidas usados em bananais comerciais do Vale do Ribeira, estado de São Paulo, e propõe ações anti-resistência. Realizou-se um levantamento com agrônomos consultores, identificando propriedades, razões da dificuldade de controle e histórico de fungicidas usados. Em cada propriedade, fragmentos de folhas secas contendo peritécios foram coletados aleatoriamente e submetidas ao isolamento pela descarga de ascósporos em meio ágar-água e BDA. Os isolados foram identificados por sequenciamento da região ITS, de parte do gene da actina e por PCR com primers específicos. Além de *M. fijiensis* e *M. musicola*, foram encontradas as espécies *Mycosphaerella musae* e *Mycosphaerella thailandica*, além de espécies dos gêneros *Zasmidium* sp. e *Ochroconis* sp. Em isolados de *M. thailandica*, *M. musicola*, *Zasmidium* sp. e *Ochroconis* sp. foram encontradas mutações nos genes da beta tubulina e do citocromo b mitocondrial associadas à perda de sensibilidade aos fungicidas do grupo químico dos Benzimidazóis e do grupo químico das Estrobilurinas, respectivamente. A perda de sensibilidade em parte desses isolados foi confirmada através de testes de sensibilidade *in vitro*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Musa* sp. Benzimidazol. Propiconazol. Estrobilurina. Beta-tubulina. CYP51. Citocromo b mitochondrial.

## ABSTRACT

MALIMPENSA, Julia Rossi. **Characterization of fungicide resistance in populations of fungi associated with Sigatokas lesions in the Ribeira Valley (SP)**. 2018. 79f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2018.

The Ribeira Valley represents 67% of the planted area of bananas in the state of São Paulo. The region has a rainy season and high temperature (Nov-Apr) and a less rainy season with low temperatures (May-Oct), favoring black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) and yellow Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*), which cause defoliation in the plant and compromise production. In susceptible varieties (Prata and Nanica), use of fungicides to control these diseases is inevitable. The Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) reported in 2013, populations of *M. fijiensis* with low sensitivity to Benzimidazoles in Costa Rica, Ecuador, Colombia, Guatemala and Honduras; to Triazoles, in Costa Rica and Panama; and to Strobilurins in Costa Rica, Colombia, Guatemala and Panama. In the present study resistance of fungi isolated from leaves of banana trees with symptoms of Sigatoka disease to the fungicides used in commercial banana plantations in the Ribeira Valley, São Paulo state, and anti-resistance actions are proposed. A survey was carried out with agronomists, identifying properties, reasons for the difficulty of control, and history of fungicides employed. In each property, fragments of dry leaves containing perithecia were randomly sampled and subjected to monosporic isolation by discharge of ascospores in agar-water medium and BDA. Isolates were identified by sequencing the ITS region, part of the actin gene and by PCR with specific primers. In addition to *M. fijiensis* and *M. musicola*, the species *Mycosphaerella musae* and *Mycosphaerella thailandica*, as well as species of the genera *Zasmidium* sp. and *Ochroconis* sp. In isolates of *M. thailandica*, *M. musicola*, *Zasmidium* sp. and *Ochroconis* sp. mutations were found in the beta tubulin and mitochondrial cytochrome b genes associated with the loss of sensitivity to the benzimidazole chemical group and the strobilurin chemical group, respectively. Loss of sensitivity in some of these isolates was confirmed by *in vitro* sensitivity tests.

**KEY WORDS:** *Musa* sp. Benzimidazole. Propiconazole. Strobilurin. Beta-tubulin. CYP51. Mitochondrial cytochrome b.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem de satélite da região do Vale do Ribeira com as propriedades estudadas georreferenciadas. (Google Earth).....	24
Figura 2 – Plantas severamente atacadas pela Sigatoka Negra e/ou Sigatoka Amarela.....	25
Figura 3 – Lesões de estádio 6 com abundante produção de peritécios em folhas secas de banana, visualizados com auxílio de lupa de bolso (20X).....	26
Figura 4 – Folha com lesão no estádio 5 (mancha negra) com formação de esporodóquio do fungo <i>Mycosphaerella musicola</i> .....	26
Figura 5 – Câmara úmida para indução da produção de ascósporos.....	27
Figura 6 – Tampa da placa de Petri com fragmento de folha preso em papel de filtro.....	28
Figura 7 – Colônias de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> e <i>Mycosphaerella musicola</i> em tubo de ensaio.....	28
Figura 8 – Eletroferograma do sequenciamento do gene da beta-tubulina realizado a partir de DNA extraído de colônias não puras, mostrando a sobreposição de picos.....	29
Figura 9 – Colônias dos isolados de <i>Mycosphaerella</i> spp. aptas a serem submetidas aos testes de sensibilidade in vitro.....	29
Figura 10 – Colônias do fungo formadas após o teste de sensibilidade in vitro.....	30
Figura 11 – Precipitação pluviométrica mensal acumulada e temperatura média mensal, durante 2017, Sete Barras, SP, ( <a href="https://pt.climate-data.org/location/287005/">https://pt.climate-data.org/location/287005/</a> ).....	35
Figura 12 – Bananais comerciais localizados ao longo e às margens do rio Ribeira de Iguape, no município de Sete Barras, SP, Vale do Ribeira.....	35
Figura 13 – Coexistência de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> e <i>Mycosphaerella musicola</i> evidenciada por meio de PCR com primers específicos a partir de DNA extraído de lesão foliar em propriedade no município de Sete Barras.....	38
Figura 14 – Presença exclusiva de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> evidenciada por meio de PCR com primers específicos a partir de DNA extraído de lesão foliar em propriedade no município de Sete Barras.....	38
Figura 15 – Exemplos de eletroferogramas do sequenciamento da região ITS.....	40
Figura 16 – Árvore filogenética construída com sequências do gene da actina pelo método de Neighbor Joining.....	41
Figura 17 – Árvore filogenética construída com sequências da região ITS de isolados do gênero <i>Ochroconis</i> pelo método de Neighbor Joining.....	43

Figura 18 – Árvore filogenética construída com seqüências da região ITS de isolados do gênero <i>Zasmidium</i> pelo método de Neighbor Joining.....	44
Figura 19 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade in vitro com tiofanato metílico para <i>Mycosphaerella fijiensis</i> SB5-3 e <i>Mycosphaerella musicola</i> RG1-4.....	46
Figura 20 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade in vitro com tiofanato metílico para os isolados de <i>Mycosphaerella thailandica</i> .....	48
Figura 21 – Eletroferogramas dos sequenciamentos do gene da $\beta$ -tubulina dos isolados de <i>Zasmidium</i> sp.1.....	49
Figura 22 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade in vitro com tiofanato metílico para os isolados de <i>Zasmidium</i> spp.....	50
Figura 23 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade in vitro com tiofanato metílico para os isolados de <i>Ochroconis</i> sp.2 P1-4 e <i>Ochroconis</i> sp.3 P2-3.....	51
Figura 24 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade in vitro com tiofanato metílico para o isolado de <i>Mycosphaerella musae</i> M2-1.....	51
Figura 25 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade in vitro com azoxistrobina para os isolados de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> SB5-2 e <i>Mycosphaerella musicola</i> RG1-4.....	53
Figura 26 – Inibição do crescimento micelial em teste sensibilidade in vitro com azoxis-trobina para os isolados de <i>Mycosphaerella musae</i> M2-1.....	53
Figura 27 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade in vitro com azoxistrobina para os isolados de <i>Mycosphaerella thailandica</i> SB6-2, P1-7, SB1-6, SB2-1, M3-6 e P1-1.....	55
Figura 28 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade in vitro com azoxistrobina para os isolados de <i>Mycosphaerella thailandica</i> EL1-8, M4-1, P2-2, SB6-3, M5-3 e EL2-3.....	56
Figura 29 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade in vitro com azoxis-trobina para os isolados de <i>Zasmidium</i> sp1. P2-5 e <i>Zasmidium</i> sp.2 P2-6.....	57
Figura 30 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade in vitro com azoxis-trobina para os isolados de <i>Ochroconis</i> sp.2 P1-4 e <i>Ochroconis</i> sp.3 P2-3.....	58
Figura 31 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade in vitro com propico-nazol para os isolados de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> SB5-2 e SB5-3 e <i>Mycosphaerella musicola</i> RG1-4.....	60
Figura 32 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade in vitro com propico-nazol para isolado de <i>Mycosphaerella musae</i> M2-1.....	62

Figura 33 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade in vitro com propiconazol para os isolados de <i>Mycosphaerella thailandica</i> P2-2, P1-1, SB2-1, SB6-3, M3-6 e M4-1.....	63
Figura 34 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade in vitro com propiconazol para os isolados de <i>Mycosphaerella thailandica</i> EL1-8, SB1-6, P1-7, SB6-2, M5-3 e EL2-3.....	64
Figura 35 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade in vitro com propiconazol para os isolados de <i>Zasmidium</i> sp.1 P2-5, EL1-5 e RG2-8 e <i>Zasmidium</i> sp.2 P2-6.....	65
Figura 36 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade in vitro com propiconazol para os isolados de <i>Ochroconis</i> sp.2 P1-4 e <i>Ochroconis</i> sp.3 P2-3.....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação das propriedades e variedades amostradas na região do Vale do Ribeira.....	24
Tabela 2 – Iniciadores utilizados para a identificação molecular dos isolados fúngicos.....	33
Tabela 3 – Iniciadores empregados para a amplificação de genes potencialmente envolvidos na resistência de fungos a fungicidas.....	33
Tabela 4 – Identificação molecular dos isolados fúngicos obtidos a partir de folhas de bananeiras com sintomas de Sigatoka.....	39
Tabela 5 – Ocorrência de mutação no gene da beta-tubulina e sensibilidade ao tiofanato metílico de fungos isolados de bananeira com sintomas de Sigatoka.....	46
Tabela 6 – Ocorrência de mutação no gene do citocromo b mitocondrial e sensibilidade a azoxistrobina de fungos isolados de bananeira com sintomas de Sigatoka.....	52
Tabela 7 – Ocorrência de mutação no gene CYP51 e sensibilidade a propiconazol de fungos isolados de bananeira com sintomas de Sigatoka.....	59
Tabela 8 – Mutações no gene CYP51 e sensibilidade a propiconazol de fungos isolados de bananeira com sintomas de Sigatoka.....	61

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>3.1 Importância da Banana</b> .....	14
<b>3.2 Bananicultura no Vale do Ribeira</b> .....	14
<b>3.3 Problemas fitossanitários</b> .....	15
<b>3.4 Controle das Sigatokas</b> .....	18
<b>3.5 Resistência</b> .....	19
<b>3.6 Complexo Sigatoka</b> .....	21
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
<b>4.1 Identificação e georreferenciamento das propriedades</b> .....	23
<b>4.2 Coletas de amostras</b> .....	25
<b>4.2.1 Sigatoka negra</b> .....	25
<b>4.2.2 Sigatoka amarela</b> .....	26
<b>4.3 Isolamento direto dos fungos</b> .....	27
<b>4.4 Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> a fungicidas</b> .....	28
<b>4.5 Extração de DNA dos fungos</b> .....	31
<b>4.6 Identificação molecular dos isolados</b> .....	31
<b>4.7 Ocorrência de mutações associadas à resistência a fungicidas</b> .....	33
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>5.1 Identificação, georreferenciamento e características das propriedades</b> .....	34
<b>5.2 Coletas de amostras</b> .....	36
<b>5.3 Isolamento e identificação molecular dos fungos</b> .....	37
<b>5.4 Testes de sensibilidade <i>in vitro</i> a fungicidas dos grupos dos benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas e detecção de mutações nos genes da <math>\beta</math>-tubulina, citocromo b mitocondrial e CYP51</b> .....	45
<b>5.4.1 Sensibilidade ao tiofanato metílico e sequenciamento do gene da <math>\beta</math>-tubulina</b> .....	45
<b>5.4.2 Sensibilidade a azoxistrobina e sequenciamento do gene da citocromo b mitocondrial</b> .....	51
<b>5.4.3 Sensibilidade a propiconazol e sequenciamento do gene CYP51</b> .....	59
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	67
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A banana tem um importante papel sócio econômico, sendo uma fruta de preço acessível para a maior parte da população, sua produção gera empregos de forma direta e indireta e o comércio dessa fruta tem posição de destaque no mercado brasileiro. São Paulo e Bahia são os maiores estados produtores da fruta no país. Apesar da baixa produtividade (14,35 ton.ha-1) quando comparada aos demais países produtores (Costa Rica 46,6 ton.ha-1), o Brasil ainda consegue disputar o terceiro lugar na produção mundial devido a maior área plantada com a cultura com 480,8 mil hectares (IBGE/LSPA, fevereiro de 2014).

O Vale do Ribeira é a principal região produtora de banana dentro do estado de São Paulo, representando 67% da área cultivada. A região tem clima favorável para o cultivo da banana, com período chuvoso e temperatura elevada (nov-abr) e período menos chuvoso com baixas temperaturas (mai-out), o que também favorece o desenvolvimento de doenças fúngicas, como a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) e a Sigatoka Amarela (*Mycosphaerella musicola* Leach). Essas doenças provocam manchas foliares, comprometendo a área fotossintética da planta, resultando em desfolha e redução da produção.

Existem variedades de banana resistentes às Sigatokas, porém essas não são plenamente aceitas no mercado pelos consumidores. Assim, no Vale do Ribeira as principais variedades cultivadas são suscetíveis, como as do tipo Prata e Cavendish (Nanica), exigindo a utilização de fungicidas para seu controle.

Quando um novo fungicida é desenvolvido, os indivíduos resistentes devem ser raros, caso contrário à eficiência não seria suficiente para a obtenção do registro. Dentro de uma população de fungos, mutações em genes codificadores dos alvos dos princípios ativos podem conferir diferentes níveis de resistência. Quando os fungicidas são utilizados de forma incorreta, sem alternância de grupos químicos, ocorre a chamada pressão de seleção, favorecendo a seleção de indivíduos com a mutações para resistência.

O Comitê de Ação contra a Resistência a Fungicida (FRAC) relatou em 2013, populações de *M. fijiensis* com baixa sensibilidade aos fungicidas do grupo químico dos Benzimidazóis na Costa Rica, Equador, Colômbia, Guatemala e Honduras; aos Triazóis, na Costa Rica e Panamá; e às Estrobilurinas, na Costa Rica, Colômbia, Guatemala e Panamá. No Brasil, um estudo realizado por Gomes et al. (2014), sobre a sensibilidade de *M. fijiensis* aos fungicidas triazóis, benzimidazóis, cloronitrilas e ditiocarbamatos foi realizado entre 2008 e

2009, encontrou resistência à ditiocarbamato. Entretanto, esses resultados não correspondiam às observações de campo.

## **2 OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de populações de *M. musicola*, *M. fijiensis* e outros fungos encontrados em lesões foliares de bananeiras com sintomas de Sigatoka Amarela ou Negra aos fungicidas dos principais grupos químicos usados no controle destas doenças na região do Vale do Ribeira, São Paulo.

### **2.1 Objetivos específicos**

a) Avaliar o comportamento de populações de *M. fijiensis*, *M. musicola* e outros fungos encontrados em lesões foliares de bananeiras com sintomas de Sigatoka Amarela ou Negra em relação a fungicidas dos grupos dos Benzimidazóis, Estrobilurinas e Triazóis em bananais comerciais do Vale do Ribeira, SP, através de testes de sensibilidade *in vitro*;

b) Caracterizar os isolados fúngicos quanto à ocorrência de mutações potencialmente associadas à resistência a fungicidas nos genes codificadores de beta-tubulina, citocromo b mitocondrial e CYP51.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Importância da Banana**

O cultivo da banana tem um papel social muito importante por se tratar de uma fonte de alimento barata e rica em nutrientes. A banana é constantemente associada a uma alimentação saudável com possível associação à felicidade devido à presença da vitamina B6, que previne a depressão, ansiedade e irritação, atuando no sistema cognitivo, com a proteção de neurônios e a síntese de neurotransmissores (SOUSA, 2013). É uma fruta que conquistou papel econômico relevante pois, além da qualidade nutricional, é acessível a populações pobres de muitos países em desenvolvimento (ARAÚJO et al., 2014).

A banana é a segunda fruta mais consumida no planeta, com 11,4 kg/hab/ano. Na América do Sul o consumo é ainda maior com 20 kg/hab/ano (FAO, 2013). Com esse potencial de consumo, a banana é a única fruta dentre as tropicais e subtropicais com presença significativa no comércio internacional. Segundo a FAO, os três maiores produtores são China, Índia e Brasil. Juntos correspondem a 45,9% do total mundial, sendo suas produções destinadas principalmente aos seus mercados internos. Entre as frutas, a banana apresenta a maior dispersão geográfica do Brasil. A safra de 2016/17 chegou a 6,985 milhões de toneladas, sendo São Paulo o maior produtor com 1,087 milhões toneladas (15,6%), seguido pela Bahia com 1,070 milhões de toneladas (15,3%), Minas Gerais com 809 mil toneladas (11,6%), Santa Catarina com 720 mil toneladas (10,3%), Pará com 532 mil toneladas (7,6%), Ceará com 348 mil toneladas (5%) e Pernambuco com 325 mil toneladas (4,7%) (IBGE LSPA, 2017).

A banana representa 22% do valor total da produção frutícola nacional, ficando em terceiro lugar quanto à área cultivada com 490.628 hectares, perdendo apenas para cultura da laranja (719.360 ha) e castanha de caju (708.808 ha) (IBGE, 2013). A produtividade média brasileira ainda é baixa, apenas 14,35 ton/ha, diante do desempenho dos outros países que lideram o mercado global, como a Costa Rica, com uma produtividade de 46,6 ton/ha (FAOStat, 2002).

#### **3.2 Bananicultura no Vale do Ribeira**

O estado de São Paulo é o maior produtor brasileiro, com destaque para o litoral sul onde se cultivam 35.301 hectares ha, produzindo em 2013, 828.593 toneladas e geraram 24,7 mil empregos diretos e 70,6 mil indiretos. O rendimento médio brasileiro foi de

14,35 ton/ha sendo os valores por estado de 22,64 ton/ha para São Paulo; 23,34 ton/ha para Santa Catarina; 23,97 ton/ha para o Paraná; 26,80 ton/ha para o Distrito Federal; e 27,73 ton/ha para o Rio Grande do Norte (IBGE, 2013).

Na região do Vale do Ribeira, estado de São Paulo, a importância da bananicultura pode ser constatada pelas estimativas do Instituto de Economia Agrícola (APTA, SAA-SP) que registraram na safra 2003/2004, 3.924 produtores de banana, numa área aproximada de 41.924 hectares e 75 milhões de plantas, o equivalente a 67% das áreas de cultivo de banana do estado de São Paulo. Assim, a cultura representou 1,7% do PIB estadual e 80% da receita do Vale do Ribeira, gerando mais de 30 mil empregos diretos e 45 mil indiretos (GELMINI, 2004).

### 3.3 Problemas fitossanitários

A cultura da banana é acometida por diversas doenças, as quais constituem fator limitante da produção se não forem devidamente tratadas. Dentre esses problemas os fungos causam as maiores perdas de produção, principalmente as espécies *M. fijiensis* e *M. musicola* responsáveis pelas doenças conhecidas como Sigatoka Negra e Sigatoka Amarela, respectivamente. Esses fungos pertencem ao filo Ascomycota, família Mycosphaerellaceae, que formam corpos de frutificação, como os peritécios que produzem os ascósporos, durante sua fase sexuada de reprodução e formação de conídios em conidióforos, na sua fase assexuada da reprodução (CROUS et al., 2009).

A Sigatoka negra foi identificada pela primeira vez em 1963, no Vale de Sigatoka, nas ilhas Fiji, continente asiático. No hemisfério ocidental, ela apareceu pela primeira vez em 1972, em Honduras e em 1979 já estava na Costa Rica, disseminando-se a partir daí para outros países da América Latina e do Caribe. (CORDEIRO, 2001; CAVALCANTE, 2004). No Brasil, a doença foi constatada em fevereiro de 1998, nos municípios de Tabatinga e Benjamin Constant no estado do Amazonas (PEREIRA et al., 1998), seguindo para o Acre, Rondônia, Pará, Mato Grosso em 1999. Em 2004, foi constatada pelo Instituto Biológico, SP, nos bananais comerciais do Vale do Ribeira, Estado de São Paulo (FERRARI et al., 2005). Atualmente, a doença foi constatada em praticamente todos os estados da região Norte, Sudeste e Sul, e em parte das regiões Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Tocantins) e Nordeste (Maranhão e Bahia). A doença ainda não foi constatada no Norte do estado de Minas Gerais, onde predomina o clima semiárido quente (BSh) (SENHOR, 2009).

A Sigatoka amarela encontra-se disseminada praticamente em todas as regiões produtoras de banana do Brasil e do mundo, provocando consideráveis prejuízos na produção de frutos (FOURÉ, 1994).

Os sintomas da Sigatoka amarela podem ser classificados em cinco estádios, nos quais inicialmente são observadas pequenos traços amarelados (com dimensão de aproximadamente 1 mm) na superfície superior das folhas mais novas, que evoluem para estrias de coloração amarelada, se tornando mais largas e compridas, com margens não bem definidas, que se misturam com a coloração normal das folhas. Ao final, as estrias se tornam manchas de coloração marrom-clara que escurecem formando manchas de coloração marrom-escura, agora com contorno bem definido, centro marrom e exibindo halo amarelado ao redor da lesão. As manchas se desenvolvem completamente, passando a exibir o centro de coloração cinza com bordas de coloração escura a preta (STOVER, 1972).

O ciclo da Sigatoka negra inicia-se pela infecção das folhas mais novas da bananeira, pelos tubos germinativos dos ascósporos do fungo, causando sintomas, na folha, de pequenos pontos, que evoluem para traços e estrias de coloração marrom-café, observados na face inferior das folhas. Durante o desenvolvimento dessas folhas, as estrias marrons evoluem para manchas negras e, destas, para manchas necróticas, que passam a ser observadas na superfície superior das folhas mais velhas (MORAES et al., 2006).

Durante o processo de colonização dos tecidos da folha pelo fungo, surgem os sintomas típicos da doença devido ao colapso das estrias marrons e das manchas negras que passam a exibir grandes manchas negras e necróticas na superfície superior do limbo foliar a partir da ponta das folhas afetadas. Assim, é possível diferenciar os sintomas típicos de cada doença, pela sua coloração e localização, sendo que a Sigatoka amarela apresenta as estrias amareladas e manchas marrons na face superior da folha, enquanto a Sigatoka negra apresenta as estrias marrons na face inferior e as manchas negras e necróticas na face superior. A presença de manchas negras nas folhas mais velhas da planta indica o extravasamento, oxidação do conteúdo celular e a morte das células do tecido foliar, provocando a escassez de nutrientes e consequente indução da fase sexuada do fungo, tanto para *M. fijiensis* quanto *M. musicola*. A partir daí, o fungo passa a formar os corpos de frutificação, denominados peritécios, que produzem e abrigam os esporos sexuais (ascósporos).

*M. fijiensis* e *M. musicola* se propagam por meio de dois tipos de esporos, os conídios e os ascósporos. Os ascósporos atingem a superfície adaxial da folha mais nova da

planta (folha vela ou charuto), germinam emitindo um tubo germinativo que penetra no tecido foliar, pelos estômatos, e atinge as células em seu entorno, dando origem às primeiras infecções. De cada ponto de infecção, os tubos germinativos se transformam em estruturas vegetativas, denominadas de hifas, que crescem internamente atingindo novas células onde passam a absorver os nutrientes. As hifas se reproduzem assexuadamente formando estruturas reprodutivas denominadas de conidióforos, a partir dos quais são produzidos os esporos assexuados ou conídios.

Os conídios se formam no ápice dos conidióforos a partir do primeiro estágio de desenvolvimento dos sintomas, na superfície inferior das folhas mais novas. Os ascósporos são produzidos dentro de corpos de frutificação ou peritécios, que se formam nos estágios mais avançados do desenvolvimento dos sintomas, na superfície superior das folhas mais velhas. Os conídios de *M. fijiensis* são cilíndricos a partir da base, eretos ou ligeiramente curvos, com septos variando de um a dez, exibindo uma cicatriz na base dos conídios e dos conidióforos, enquanto os conídios de *M. musicola* são normalmente retos com um a seis septos, com ausência da cicatriz na base do conídio (FERRARI et. al., 2008).

A Sigatoka negra apresenta maior frequência de lesões que a Sigatoka amarela, sendo a primeira muito mais agressiva e responsável pelos maiores prejuízos na produção de frutos devido à sua rápida disseminação. Com a chegada da Sigatoka negra nos bananais do Vale do Ribeira tem-se verificado a presença dos sintomas causados pelas duas doenças, inclusive com aumento de frequência e mudanças na forma das lesões da Sigatoka amarela (MORAES, 2005). Em grande parte das áreas onde ocorria a Sigatoka amarela, a Sigatoka negra passou a ser a doença predominante (PEREIRA et al.,1998). Pereira et al. (1999), afirmam ainda que o desaparecimento da Sigatoka amarela após o surgimento da Sigatoka negra, deve-se a maior e mais precoce produção de esporos e, conseqüentemente, a maior intensidade de infecção e taxa de progresso da doença, não dando oportunidade para a Sigatoka amarela desenvolver, ratificando Stover (1983).

A diminuição da área fotossintetizante da planta, causada pelas manchas foliares decorrentes da ação do fungo, podem provocar severo desfolhamento (ROMERO; SUTTON, 1998). Com isso, é drasticamente prejudicado o tamanho dos frutos, das pencas e dos cachos e o número de pencas por cacho e, conseqüentemente, o rendimento por unidade de área (MANICA, 1997). Perdas superiores a 50% da produção foram observadas por Stover; Simonds (1987), chegando a 100% (PEREIRA et al., 1998).

A rápida disseminação da Sigatoka Negra pelo mundo e seu poder de destruição vem preocupando todas as entidades envolvidas com a cultura da banana, que vem se esforçando para desenvolver técnicas para diminuir os prejuízos causados pela doença.

### **3.4 Controle das Sigatokas**

No Estado de São Paulo, a Sigatoka negra chegou em 2004 e, já em 2005, ocorreu o primeiro registro da sua presença exclusiva em alguns bananais do Vale do Ribeira, conforme levantamentos realizados por Moraes et al. (2005b). Estes fatos serviram de alerta para que bananicultores, autoridades do setor produtivo e os pesquisadores implantassem medidas urgentes para a redução do inóculo do fungo, sob pena de num curto prazo as aplicações mensais de fungicidas passassem a ser quinzenais ou, talvez, semanais (MORAES et al., 2005b), tal como em países da América Central onde a agressividade da doença provocou a substituição da Sigatoka amarela num período de quatro anos e quadruplicou o número de pulverizações de fungicidas (OROZCO-SANTOS, 1998; PÉREZ, 1996, 2000; MARÌN, 1992).

O Brasil, que oscila entre terceiro a quinto maior produtor mundial de banana, vem pesquisando diversas formas de manejo dessa doença. Apesar de existirem variedades resistentes, que seria a forma mais econômica e sustentável para se conviver com a doença, estas não são tão apreciadas e conhecidas pelos consumidores como as variedades suscetíveis do subgrupo Prata (*Musa*, AAB) e Nanica (*Musa*, AAA).

O uso criterioso dos métodos de controle preventivos e culturais é fundamental antes da chegada do fungo na área. Porém, o uso de fungicidas ainda é a melhor solução depois que a doença se instala no bananal constituído de variedades suscetíveis, aliado aos métodos culturais. O controle químico convencional da Sigatoka negra exige mais aplicações do que as usadas no controle da Sigatoka amarela, encarecendo muito o custo de produção.

Atualmente, estão em andamento pesquisas de formas de aplicação de determinados fungicidas, visando diminuir o número de aplicações, mas no modo convencional, a aplicação dos fungicidas encarece a produção em aproximadamente 25% (PLOETZ, 1999). O aumento no custo de produção ocasiona um problema social, pois uma boa parte dos produtores não têm o capital e nem a tecnologia para efetuar um controle eficiente da doença, em particular os pequenos produtores.

O controle químico tem sido realizado por meio de aplicação aérea e terrestre de fungicidas sistêmicos que pertencem a três principais grupos químicos: os inibidores da divisão

celular (metil carbamato, benzimidazol ou BCMs), inibidores da desmetilação do esterol ou inibidores da biossíntese do ergosterol (triazóis ou DMIs) e os inibidores de quinonas ou inibidores da respiração celular (estrobilurinas ou QoIs).

Os triazóis agem como inibidores da esterol 14 $\alpha$ -desmetilase, uma enzima da superfamília das CYP51 envolvida na catálise da desmetilação 14 $\alpha$  do eburicol (24-metileno-24,25-dihidrolanosterol), um precursor na biossíntese do ergosterol. O ergosterol regula a fluidez da membrana celular e a permeabilidade das células fúngicas, essencial para a sobrevivência. Estes fungicidas começaram a ser utilizados no controle de Sigatoka negra em 1987, mas foi só em 1991 que o propiconazole (triazol) tornou-se mais amplamente utilizado para o controle dessa doença, como resultado da resistência generalizada ao Benomyl (benzimidazol). O uso intensivo do Benomyl impôs uma pressão seletiva favorecendo o surgimento de cepas resistentes, um fenômeno que tem sido observado em outras espécies fúngicas.

Atualmente, quase todos os países reconhecem a necessidade de políticas públicas com base no desenvolvimento sustentável e de práticas de produção denominadas “verdes”, que resultem em menos resíduos ou evitem o desperdício. Na Europa, cresce a altas taxas a demanda por produtos orgânicos (IFOAM, 2007). Segundo Santos (2014), em 2004 a Europa já apresentava a segunda maior área (24%) sob manejo da agricultura orgânica no mundo, perdendo apenas para a Oceania (43%). Porém ainda é o maior mercado para comercialização de produtos orgânicos no mundo. Diferente de outros países, o registro de agrotóxicos no Brasil não tem prazo de validade, enquanto na União Europeia o registro é válido por 10 anos, nos Estados Unidos por 15 anos e no Japão por 3 anos (ICICT, 2016).

### **3.5 Resistência**

Quando um novo fungicida é desenvolvido, os indivíduos resistentes a ele devem ser raros, caso contrário, sua eficiência não seria suficiente para a obtenção do registro. Como as populações de fungos são extremamente grandes, muitos tipos de mutações podem ocorrer na presença de determinado fungicida. Muitas serão letais, mas algumas conferirão resistência e aumentarão em frequência, devido à seleção darwiniana ou pressão de seleção. Caso as mutações não confirmem maior adaptabilidade relativa, sua frequência novamente declinará, quando a seleção ceder e a competição com indivíduos não mutantes se restabelecer. Raramente isso ocorre, mas se dá quando a resistência se torna um problema prático e a

população não mutante original pode precisar de anos para se restabelecer (HOLLOMON, 1997).

Os agentes causais das Sigatokas apresentam várias gerações em períodos curtos e sua esporulação é extensiva, exigindo aplicações frequentes de fungicidas. Conseqüentemente, maior é o risco de surgimento de resistência do que em espécies que apresentam apenas uma geração por ano (HOLLOMON, 1997). Dessa forma, o uso excessivo de fungicidas tem levado ao aparecimento de estirpes resistentes aos compostos usados no controle das Sigatokas. Evidências são apresentadas na Costa Rica, onde são necessárias 52 a 77 aplicações anuais de fungicidas sistêmicos e protetores e 28 a 40 aplicações no Equador enquanto no Brasil, especialmente na região do Vale do Ribeira, são realizadas, entre 8 a 12 aplicações anuais. Ao longo dos últimos anos, os esforços têm sido para reduzir o impacto ambiental causado pelo uso dos fungicidas tradicionais na banana.

Segundo o FRAC, a resistência a agrotóxicos é possível, porém em alguns casos só é obtida e estudada em situações laboratoriais, pois no campo os fatores climáticos e a competição com outras espécies torna inviável a sobrevivência dos indivíduos mutantes. Alterações que ocorrem nas espécies mutantes são conhecidas no caso dos fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis, DMI (triazóis) e estrobilurinas (DAVIDSE; ISHII, 1995; DELYE et al., 1998; KOELLER, 1999; GISI et al., 2000; SIEROTSKI et al., 2000).

Resistência a Benomyl foi descrita em isolados de *M. fijiensis* na Colômbia (CAÑAS- GUTIERREZ et al., 2006). Foi constatada a existência de isolados resistentes a até 50 µg de ingrediente ativo/mL, nos quais foi encontrada mutação no códon 198 do gene da beta-tubulina, com alteração do aminoácido de ácido glutâmico (E) para alanina (A) (mutação E198A).

Três principais mecanismos moleculares têm sido descritos como responsáveis pelo surgimento de resistência aos fungicidas triazóis em diferentes fungos: a) mutações pontuais no gene da 14 $\alpha$ -desmetilase do esterol (CYP51), b) super expressão dessa enzima e c) super expressão de transportadores do tipo ABC (ATP-binding cassette) codificadores de bombas de efluxo (CAÑAS-GUTIERREZ et al., 2009). Foi observado que estirpes de *M. fijiensis* com maior tolerância ao fungicida propiconazole apresentavam uma ou duas das seguintes mutações no gene da CYP51: Y136F, A313G, Y461D, Y463D, Y463H e Y463N (CAÑAS-GUTIERREZ et al., 2009).

Na Costa Rica, mutação G143A, no gene da citocromo b mitocondrial, foi constatada em isolados de *M. fijiensis* resistentes a fungicidas do grupo químico das estrobilurinas

(SIEROTZKI et al., 2000). Misturas de mitocôndrias (heteroplasma) contendo ou não a mutação que confere resistência a estrobilurinas foram descritas em algumas espécies de fungos fitopatogênicos tais como *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (FRAAIJE et al., 2002), *Podosphaera leucotricha* (LESEMANN et al., 2006) e *Venturia inaequalis* (ZHENG et al., 2000). Em isolados de *P. leucotricha*, foi observada correlação entre a quantidade de mitocôndrias portando a mutação e a resistência a estrobilurina (LESEMANN et al., 2006).

É possível gerenciar eficientemente a presença da resistência dentro de uma população, bastando para isso conhecer os mecanismos de resistência, realizar o monitoramento dessa resistência e utilizar as recomendações necessárias, a fim de evitar a disseminação dos indivíduos resistentes e o aumento da pressão de seleção. A sensibilidade de populações de *M. fijiensis* submetidas a diferentes fungicidas pode ser alterada em função da sequência de grupos químicos utilizados no seu controle. Uma vez detectado o surgimento de populações resistentes a um determinado fungicida, o mesmo deverá ser excluído da sequência ou aplicado em condições especiais, principalmente em misturas com produtos que apresentam ação multisítio na célula fúngica. A perda ou redução da sensibilidade de populações de *M. fijiensis* já foram identificadas, no campo, para fungicidas do grupo químico dos benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas (MORAES et al., 2005b).

Estudos realizados por Gomes et al. (2014), entre 2008 e 2009 em bananais de diversas regiões do Brasil, demonstraram sensibilidade de populações de *M. fijiensis* aos fungicidas tebuconazol e tiofanato metílico; sensibilidades medianas em alguns isolados fúngicos ao clorotalonil; e baixa sensibilidade ao mancozebe, em cerca de 50% dos isolados. Segundo os autores, a resistência ao mancozebe, detectada *in vitro*, não reflete a observação de campo, que constata efetividade do fungicida. Nesse mesmo estudo, mutações no gene codificador da CYP51 que pudessem indicar resistência a estrobilurinas, não foram encontradas.

### **3.6 Complexo Sigatoka**

No isolamento e identificação por análise morfológica e molecular, de fungos associados aos sintomas mais avançados da Sigatoka negra ou Sigatoka amarela em folhas de bananeira, obtém-se uma variedade de espécies do gênero *Mycosphaerella*. Arzanlou et al. (2008) por exemplo, mostraram que a Sigatoka está associada a um complexo de espécies de *Mycosphaerella*, porém não se estabeleceu ainda a contribuição de cada uma dessas espécies nos sintomas da doença.

Peixouto et al. (2015), analisando isolados de *M. musicola* provenientes de diferentes regiões do Brasil, observaram alta variabilidade genética entre os isolados, por meio de análise de inter-simple sequence repeats (ISSR). Resultados semelhantes foram obtidos por Gomes et al. (2017) empregando marcadores do tipo microssatélite para isolados de *M. musicola* do estado de Minas Gerais. Gomes et al. (2013) reportaram somente a espécie *M. musicola*, em levantamentos da ocorrência de Sigatoka no estado de Minas Gerais. Em nenhum estudo realizado no Brasil, se reportou a ocorrência de outras espécies, além de *M. musicola* e ou *M. fijiensis* associados aos sintomas da Sigatoka negra ou Sigaroka amarela em bananeiras.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Para atingir os objetivos propostos, os estudos foram desenvolvidos em nível de campo e de laboratório. Em nível de campo, os estudos foram realizados em bananais comerciais do Vale do Ribeira/SP, com o apoio da Associação dos Bananicultores do Vale do Ribeira (ABAVAR). Os estudos de laboratório foram conduzidos no Laboratório de Sanidade Vegetal da APTA Vale do Ribeira, na cidade de Registro/SP, e no Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, na cidade de São Paulo/SP.

### **4.1 Identificação e georreferenciamento das propriedades**

A seleção das propriedades foi realizada com base em questionários (ANEXO A) para obtenção de informações em cada setor da cadeia de produção da banana: Bananicultores, Aviação agrícola, Revendas/Distribuidoras Agrícolas e consultores técnicos, públicos e privados. As entrevistas foram realizadas com agrônomos extensionistas das Casas da Agricultura do Vale do Ribeira - CATI (Coordenadoria de Assistência Técnica Integral), agrônomos responsáveis e técnicos das empresas de aviação agrícola da região, agrônomos, técnicos e balconistas das principais revendas de defensivos agrícolas da região e agrônomos consultores.

As informações obtidas com base nos questionários constituíram um banco de dados que possibilitaram a seleção e a identificação das propriedades-problema quanto à dificuldade no controle da Sigatoka negra e da Sigatoka amarela. Além de fornecer informações sobre o histórico das pulverizações e das possíveis causas do controle ineficiente dessas doenças.

Dezenove propriedades foram selecionadas com base na dificuldade de controle das Sigatokas e de possíveis casos de resistência a fungicida. O levantamento de informações em questionários foi realizado nas cidades de Registro, Miracatu, Sete Barras, Jacupiranga, Eldorado e Pariquera-Açu (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1 – Identificação das propriedades e variedades amostradas na região do Vale do Ribeira.

Cidade	Identificação	Variedade
Registro	RGT1	Nanica
	RGT2	Nanicão
Sete Barras	SB1	Nanica
	SB2	Nanica
	SB3	Nanica
	SB4	Nanica
	SB5	Prata
	SB6	Nanica
Miracatu	M1	Nanica
	M2	Prata
	M3	Nanica/Prata
	M4	Nanica
	M5	Prata
Eldorado	EL1	Nanicão
	EL2	Nanicão
Jacupiranga	J1	Nanica
	J2	Prata
Pariquera-Açu	P1	Nanica
	P2	Prata

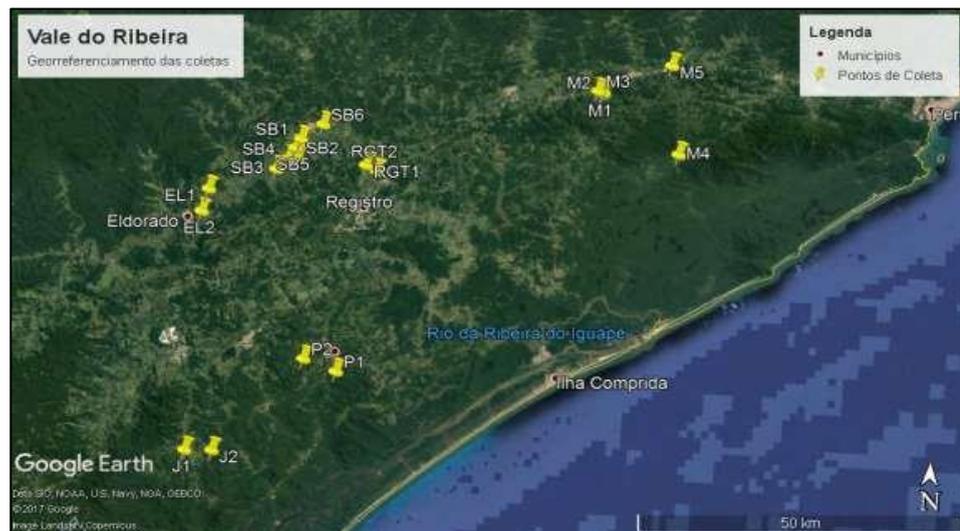


Figura 1 – Imagem de satélite da região do Vale do Ribeira com as propriedades estudadas georreferenciadas. (Google Earth).

## 4.2 Coletas de amostras

### 4.2.1 Sigatoka negra

As coletas de folhas foram realizadas em dois períodos, sendo um em Julho/2016, quando se fez 11 coletas e outro em Fevereiro a Março/2017, quando se fez 8 coletas.

Em cada propriedade pré-selecionada caminhou-se pela área à procura de plantas com folhas exibindo os estádios mais avançados do desenvolvimento dos sintomas, ou seja, em estágio 6, que corresponde às manchas necróticas com abundante produção de peritécios. Estes sintomas foram encontrados mais facilmente em folhas secas penduradas na planta (Figura 2).

Nessas folhas foram encontradas grandes áreas necrosadas, devido ao coalescimento das lesões em estágio 6, onde foi possível encontrar abundante produção de peritécios do fungo (Figura 3), identificados com auxílio de lupa de bolso com aumento de 20 vezes. De cada propriedade, coletou-se material de 5 a 10 plantas ao acaso, de acordo com a disponibilidade de folhas secas presentes na área, sendo cada ponto de coleta georreferenciado com auxílio de GPS.



Figura 2 – Plantas severamente atacadas pela Sigatoka negra e/ou Sigatoka amarela. Plantas apresentando folhas secas penduradas, de onde foram retiradas as amostras para o isolamento direto de *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola*.



Figura 3 – Lesões de estágio 6 com abundante produção de peritécios em folhas secas de bananeira, visualizados com auxílio de lupa de bolso (20X).

As folhas amostradas foram armazenadas em sacos de papel pardo e transportadas até o Laboratório de Sanidade Vegetal da APTA Vale do Ribeira, em Registro/SP, para dar prosseguimento ao isolamento dos fungos associados aos sintomas.

#### 4.2.2 Sigatoka amarela

A literatura recomenda o isolamento de *M. musicola* a partir dos conídios formados na fase assexual da fungo (*Pseudocercospora musicola*). Os conídios são formados nas folhas ainda verdes em lesões em estágio 4 e 5 (Figura 4) (FOURÉ, 1988). Porém, durante as coletas e tentativas de isolamento a partir de conídios, constatou-se a escassez de produção desses esporos, provavelmente associada às frequentes aplicações de fungicidas por pulverização aérea nos bananais comerciais estudados.

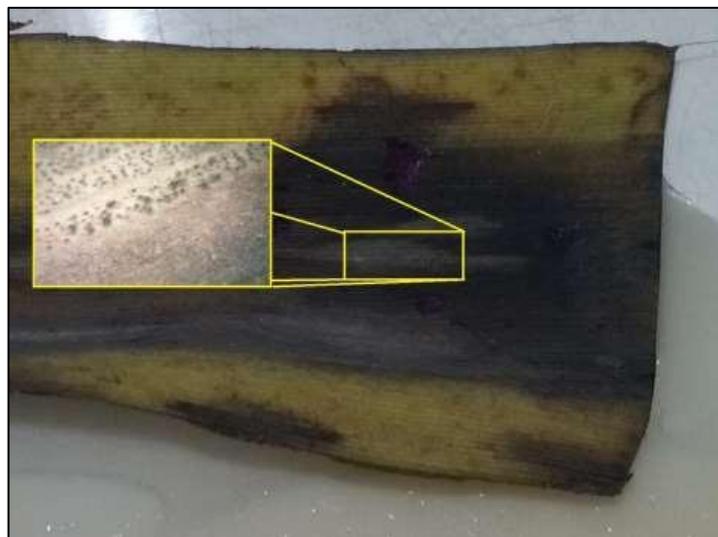


Figura 4 – Folha com lesão no estágio 5 (mancha negra) com formação de esporóclóquio do fungo *Mycosphaerella musicola*.

Em função disso, o isolamento de *M. musicola* foi realizado a partir dos ascósporos produzidos em peritécios, localizados em lesões no estádio 6, selecionando-se folhas secas e necrosadas em plantas severamente atacadas, exibindo sintomas típicos da Sigatoka amarela tal como realizado para Sigatoka negra.

### 4.3 Isolamento direto dos fungos

Das folhas de bananeira Prata (*Musa* AAB) ou Nanica (*Musa* AAA) amostradas, fragmentos de 4,0 x 8,0 cm foram retirados e submetidos à câmara úmida sob condições controladas. Para tanto, os fragmentos foram colocados em sacos plásticos transparentes, contendo algodão embebido em água destilada esterilizada, inflados com ar do ambiente, devidamente selados ou fechados e mantidos em B.O.D. a 25°C por 48 horas, a fim de estimular a produção de ascósporos dentro dos peritécios (Figura 5).

Após 48 horas, os fragmentos foram grampeados em papel filtro ( $\varnothing = 9$  cm) e imersos em água destilada esterilizada, por cinco minutos, para induzir a liberação dos ascósporos. Em capela de fluxo laminar, sob condições assépticas, os papéis de filtro foram colocados na tampa de placas de Petri com os peritécios voltados para baixo, sendo posteriormente cada uma colocada em sua respectiva base da placa de Petri, previamente preparada com meio de cultura pobre (ágar-água 2%), e mantidas fechadas por 30 minutos para que ocorresse a descarga de ascósporos (Figura 6). Após esse período, os papéis de filtro com fragmentos de folha foram retirados das placas e estas foram levadas ao microscópio óptico, sob as condições assépticas da capela de fluxo laminar, para localização dos ascósporos no meio ágar e sua posterior transferência para placas de Petri contendo meio de cultura nutritivo (BDA).



Figura 5 – Câmara úmida para indução da produção de ascósporos



Figura 6 – Tampa da placa de Petri com fragmento de folha preso em papel de filtro.

Em seguida, as placas contendo os ascósporos foram seladas com filme plástico tipo parafilme e mantidas a 26°C e umidade relativa acima de 80%, em câmara de incubação tipo B.O.D., para que ocorresse a germinação dos ascósporos, crescimento micelial e a formação das colônias do fungo. As colônias formadas foram avaliadas diariamente e somente aquelas que apresentaram características típicas de fungos do gênero *Mycosphaerella* foram repicadas para tubo de ensaio contendo meio de cultura BDA. Os tubos contendo as colônias fúngicas foram mantidos em geladeira, para preservação (Figura 7).



Figura 7 – Colônias de *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola* em tubo de ensaio.

#### 4.4 Testes de sensibilidade *in vitro* a fungicidas

O isolamento gerou a formação de colônias não puras, ou seja, formadas pela mistura de uma ou mais espécies de *Mycosphaerella* e, em alguns casos, com espécies de outros gêneros, assim optou-se neste estudo pela a realização do teste de sensibilidade antes da identificação. A constatação de mistura de espécies em alguns isolamentos foi detectada após

o sequenciamento da região ITS ou do gene da beta-tubulina que mostrou sobreposição de picos no eletroferograma (Figura 8).

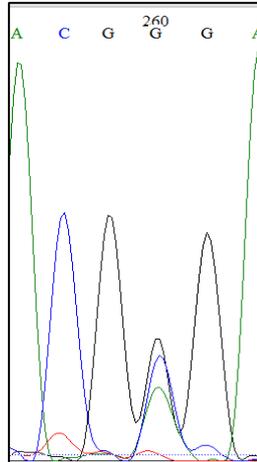


Figura 8 – Eletroferograma do sequenciamento do gene da beta-tubulina realizado a partir de DNA extraído de colônias não puras, mostrando a sobreposição de picos.

O teste de sensibilidade foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Gasparotto et al. (2006). Previamente ao teste de sensibilidade, as colônias de cada isolado fúngico mantidas em geladeira foram reativadas por meio de repicagem para meio de cultura BDA e incubadas a 25°C em B.O.D, por cinco dias, a fim de retomarem seu desenvolvimento e produção de conídios. Decorrido esse tempo, as colônias de cada isolado foram retiradas e homogêneas em 2 mL de água destilada esterilizada, sendo a suspensão de micélio filtrada em gaze e uma alíquota de 1 mL transferida para placas de Petri contendo meio de cultura BDA. As placas foram seladas com parafilme e mantidas no escuro por 15 dias, em B.O.D. à temperatura de 25°C., e transferidas para fotoperíodo de 12/12 h por 5 dias. Após esses procedimentos, as colônias se encontravam aptas a serem submetidas aos testes de sensibilidade *in vitro* (Figura 9).



Figura 9 – Colônias dos isolados de *Mycosphaerella* spp. aptas a serem submetidas aos testes de sensibilidade *in vitro*.

Para a realização dos testes de sensibilidade *in vitro*, dez colônias de cada isolado foram colocadas em um tubo de ensaio contendo água destilada esterilizada (3 mL) e Tween 20 (1 gota), a fim de quebrar a tensão superficial entre a água e o micélio do fungo e, em seguida, submetidas à agitação manual por 40 segundos. Dez gotas dessa suspensão foram transferidas e distribuídas em meio de cultura sólido (ágar-água, 2%), contendo 1.000, 100, 10, 1, 0,1 e 0 mg.L<sup>-1</sup> do fungicida tiofanato metílico, que pertence ao grupo químico dos benzimidazóis. Para o preparo dessas diluições, o fungicida foi adicionado ao meio ainda líquido e depois vertido em placa de Petri para a solidificação, adotando-se duas placas ou duas repetições para cada concentração.

Após essa etapa, as placas de Petri foram mantidas no escuro, por 5 dias, para que ocorresse o crescimento micelial e formação das colônias fúngicas, quando se calculou a porcentagem de inibição do crescimento micelial (% ICM), medindo-se o diâmetro médio das colônias em cada concentração em comparação ao tratamento testemunha (sem fungicida). Para isso, as placas de Petri foram levadas ao microscópio óptico, onde 10 colônias foram selecionadas em cada concentração do fungicida, para medição do seu diâmetro com auxílio de ocular micrométrica (Figura 10). A partir desses valores, determinou-se a DL<sub>50</sub>, ou seja, a dose letal para matar 50% da população.

Os testes de sensibilidades aos fungicidas triazol e estrobirulina foram realizados com colônias selecionadas após o teste de sensibilidade ao tiofanato metílico.

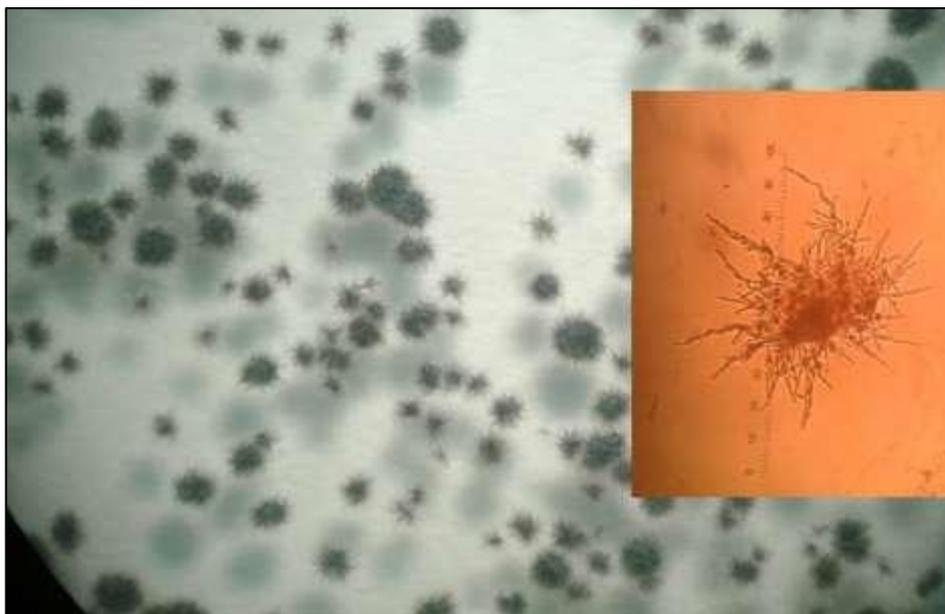


Figura 10 – Colônias do fungo formadas após o teste de sensibilidade *in vitro*. O inserto mostra imagem da colônia vista com aumento de 20x com lente ocular micrométrica do microscópio óptico.

#### 4.5 Extração de DNA dos fungos

As colônias selecionadas após o teste de sensibilidade *in vitro*, foram transferidas para o Laboratório de Bioquímica do Instituto Biológico em São Paulo/SP para a realização das análises moleculares. A extração do DNA foi realizada pelo método que emprega CTAB descrito por Ausubel et al. (1997), que consistiu em retirar pequenos fragmentos das colônias que foram trituradas em microtubos com 100 µL de tampão de extração CTAB com auxílio de pistilo de plástico. Após acrescentar mais 500 µL de tampão de extração, os microtubos foram incubados em agitação constante a 65°C por 1 hora. Acrescentou-se 600 µL de clorofórmio- álcool isoamílico (24:1) e agitou-se os tubos por alguns segundos utilizando vortex. Estes foram então centrifugados a 15.300 G por 10 minutos e 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo. Após adição de 300 µL de isopropanol, o microtubo foi misturado por inversão e novamente centrifugado a 15.300 G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o pellet lavado com 500 µL de etanol 70% e novamente centrifugado a 15.300 G por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos secos em centrífuga a vácuo por 10 minutos. O DNA obtido foi ressuspenso em 50 µL de água MilliQ autoclavada.

#### 4.6 Identificação molecular dos isolados

A identificação molecular dos isolados foi realizada através da amplificação e sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer). Foram empregados os iniciadores ITS1 e ITS4 descritos por White et al. (1990) (Tabela 2). A reação de PCR consistiu de 1 µL de DNA (concentração entre 10 a 100 ng), 5 µL de tampão 5x, 0,5 µL de dNTPS 10 mM, 0,5 µL de cada um dos iniciadores na concentração de 10 µM, 0,1 µL de GoTaq DNA polimerase (Promega) (5U/µL) e 17,4 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ autoclavada, obtendo-se um volume total de 25 µL. Foi utilizado o seguinte programa no termociclador modelo T100 (BioRad): desnaturação inicial a 94°C/2 min, 40 ciclos de 94°C/10 s – 54°C/30 s – 72°C/40 s e extensão final a 72°C/4 min. Após a amplificação, os produtos obtidos foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corados com brometo de etídeo a 10 µg/mL.

O sequenciamento da região ITS não foi suficiente para distinguir as espécies *Mycosphaerella thailandica* e *Mycosphaerella colombiensis* e, para tal, foi sequenciado fragmento do gene codificador da actina. Os iniciadores utilizados foram ACT-512F e ACT-783R (CARBONE; KOHN, 1999). As condições empregadas para a PCR foram as mesmas utilizadas para a região ITS.

Os produtos amplificados foram purificados por precipitação com polietilenoglicol (PEG) 6.000 (SCHMITZ, RIESNER, 2006). Para 20  $\mu\text{L}$  de produto de PCR em microtubo de 0,2 mL foram adicionados 8,4  $\mu\text{L}$  de solução de PEG 6.000 a 50%, 0,64  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,5 M e 3,24  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M. Após agitação em vortex e incubação a temperatura ambiente por 10 min, os microtubos foram centrifugados a 15.300 G por 10 min, também a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta e adicionou-se 125  $\mu\text{L}$  de etanol 70% para lavagem do precipitado. Após nova centrifugação a 15.300 G por 10 min, o sobrenadante foi removido com pipeta e o precipitado foi submetido à secagem em centrífuga a vácuo por 10 min. O precipitado, correspondente ao produto de PCR purificado, foi ressuspendido em 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ autoclavada.

Os produtos de PCR purificados foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia (SANGER et al., 1977). As reações foram realizadas em placas de 96 poços de 0,2 mL. A reação de sequenciamento constituiu de 5  $\mu\text{L}$  do produto de PCR purificado, 1  $\mu\text{L}$  de reagente BigDye 3.1 (Applied Biosystems), 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão de diluição, 0,3  $\mu\text{L}$  de iniciador na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , 2,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ autoclavada. O programa do termociclador constituiu de desnaturação inicial a 95°C/1 min e 25 ciclos de 95°C/5 s – 50°C/30 s – 60°C/4 min. Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75% e centrifugação a 3.220 G/30 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por inversão e a placa foi centrifugada invertida sobre papel absorvente a 200 G/1 min. Foram adicionados mais 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75% e logo em seguida descartados por inversão. A placa foi novamente centrifugada invertida sobre papel absorvente a 200 G/1 min. Secagem final foi realizada em estufa a 37°C/1 h. As amostras foram ressuspendidas em 10  $\mu\text{L}$  de formamida deionizada e desnaturadas a 95°C/2 min. O sequenciamento foi realizado em sequenciador capilar automático modelo 3500xL (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank através da ferramenta BLASTN. Foram consideradas na comparação somente sequências submetidas por pesquisadores com reputação reconhecida e com artigos publicados sobre os fungos sequenciados em periódicos qualificados. Alinhamentos das sequências de nucleotídeos obtidas com as sequências selecionadas do GenBank foram realizados utilizando-se os programas ClustalW (THOMPSON et al., 1994) e BioEdit (HALL, 1999).

Tabela 2 – Iniciadores utilizados para a identificação molecular dos isolados fúngicos.

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Gene amplificado
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Região ITS
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC	Actina
ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	

#### 4.7 Ocorrência de mutações associadas à resistência a fungicidas

Após a identificação dos isolados, utilizou-se iniciadores para amplificação de regiões de genes nos quais mutações podem ocorrer e reduzir a sensibilidade aos principais grupos químicos de fungicidas empregados no controle das Sigatokas (Tabela 3), a fim de estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos no teste de sensibilidade *in vitro* e a presença ou ausência de mutação nos referidos genes. Para os benzimidazóis, sequenciou-se fragmento do gene da beta-tubulina (CAÑAS-GUTIERREZ et al., 2006); para os triazóis, sequenciou-se fragmento do gene da CYP51 (CANÁS-GUTIERREZ et al., 2009) e, para as estrobilurinas, sequenciou-se fragmento do gene da citocromo b mitocondrial (SIEROTZKI et al., 2000). Os iniciadores utilizados foram desenvolvidos no presente estudo com base em sequências disponíveis no GenBank.

Tabela 3 – Iniciadores empregados para a amplificação de genes potencialmente envolvidos na resistência de fungos a fungicidas.

Iniciador	Sequência (5' – 3')	Gene amplificado	Grupo químico afetado
Btub1-F	AAGGGHCAYTAYACYGARGG	Beta-tubulina	Benzimidazol
Btub-R2	CARTGCAAGAAAGCCTTGCG		
CYP51-F2	CTTGAAATCGCGAATCACTT	CYP51	Triazol
CYP51-R2	ATGGAAAGCTCAAGGACGT		
CytB-F2	GAAGCATTTAATTCAGTAGAAC	Citocromo b mitocondrial	Estrobirulina
CytB-R2	CAACTATATCTTGTCCTACTC		

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação, georreferenciamento e características das propriedades estudadas

As informações obtidas por meio dos questionários e entrevistas permitiram a identificação de dois tipos de propriedades: aquelas que apresentam dificuldade de controle das Sigatokas, em função do custo elevado de proteção, e aquelas que fazem o uso inadequado das ferramentas de controle, como a falta de monitoramento da severidade da doença, para aplicação do fungicida apropriado no momento adequado; falta de desfolha sanitária e erradicação dos bananais abandonados, que aumentam o inóculo do fungo e o número de pulverizações; falta de alternância de grupos químicos de fungicidas, que podem induzir o aparecimento de populações de fungos resistentes; e a adubação inadequada dos bananais, que poderia melhorar as respostas de defesas das plantas contra as doenças.

Durante o levantamento de dados das propriedades pôde-se observar a recorrência de algumas informações, como a dificuldade de controle da Sigatoka amarela, supostamente considerada como uma doença menos agressiva que a Sigatoka negra. Esses relatos foram predominantes na região de Sete Barras principalmente no período menos chuvoso e com baixas temperaturas, compreendidos entre os meses de Abril a Setembro (Figura 11).

Conforme observado na Figura 12, as propriedades localizadas neste município encontram-se situadas ao longo e às margens do rio Ribeira de Iguape, onde predomina um microclima com alta umidade, aliado às baixas temperaturas, que favorecem o desenvolvimento da Sigatoka amarela. A Sigatoka amarela é normalmente observada em condições de temperaturas mais baixas, uma vez que a 17°C se verificou crescimento mais rápido do tubo germinativo de conídios em *M. musicola* do que em *M. fijiensis*, que prefere temperaturas mais elevadas (MARIN et al., 2003; JONES, 2002).

Uma hipótese provável é a possível adaptação do fungo *M. musicola*, agente causal da Sigatoka amarela, que se encontra presente há muito mais tempo na região. O primeiro relato da Sigatoka amarela no estado de São Paulo ocorreu em 1953 (ISSA, 1953), possibilitando sua melhor adaptação ao clima da região, diferentemente de *M. fijiensis*, agente causal da Sigatoka negra, que está presente nos bananais comerciais do Vale do Ribeira desde junho de 2004.

Porém, essa hipótese foi levantada pelos questionários e entrevistas, com base nas informações prestadas pelos profissionais que atuam na região, sendo necessário um estudo mais refinado, utilizando-se de técnicas moleculares, para caracterizar as populações de

fungos presentes nos bananais comerciais da região e a possível ocorrência de populações resistentes a fungicidas.

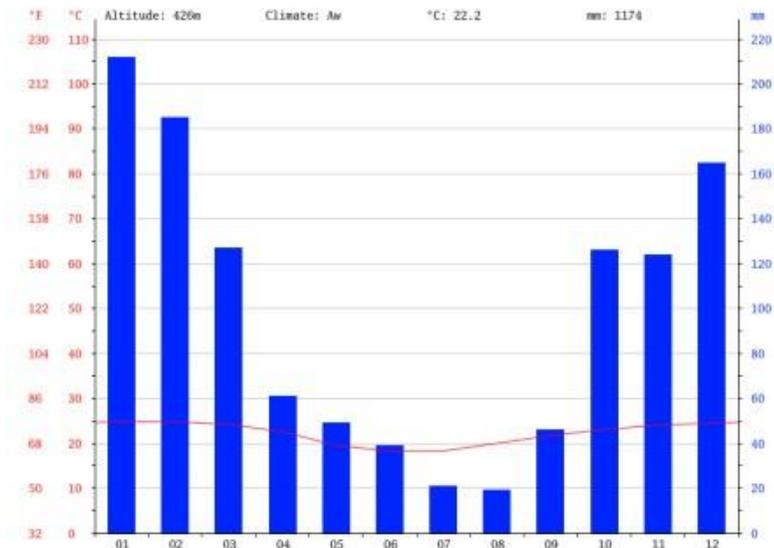


Figura 11 – Precipitação pluviométrica mensal acumulada e temperatura média mensal, durante o ano 2017, em Sete Barras, SP, Vale do Ribeira (<https://pt.climate-data.org/location/287005/>)



Figura 12 – Bananais comerciais localizados ao longo e às margens do rio Ribeira de Iguape, no município de Sete Barras, SP, Vale do Ribeira.

Em algumas entrevistas, notou-se que alguns profissionais relataram não terem problemas para o controle de Sigatoka amarela, porém estes mesmos profissionais não trabalham com propriedades à beira do rio no município de Sete Barras, ratificando a presença de um microclima que favorece o desenvolvimento de *M. musicola* nestes bananais.

Os entrevistados confirmaram que a Sigatoka negra corresponde ao mais importante problema dos bananais comerciais da região, principalmente no período chuvoso com elevadas temperaturas. A região apresenta alta pluviosidade, variando de 1.000 a 2.500 mm anuais, com média de 1.600 mm, que muitas vezes impossibilita as aplicações de fungicidas, tanto por via aérea como terrestre, provocando atrasos na pulverização e o insuficiente controle da doença. Aliado a isso, os bananicultores encontram dificuldades em contratar os serviços de pulverização aérea, uma vez que existem apenas quatro empresas que atuam na região, obrigando-os a entrarem em filas, enquanto os estádios precoces do desenvolvimento dos sintomas da doença evoluem rapidamente para os estádios mais avançados, reduzindo significativamente a eficiência de controle.

No período chuvoso com elevadas temperaturas (Outubro a Março), as bananeiras apresentam desenvolvimento mais rápido, emitindo aproximadamente uma nova folha a cada semana. No entanto, a técnica de monitoramento da severidade da doença, descrito por Fourè (1988) e modificado por Moraes et al. (2006), recomenda a aplicação de fungicida quando a pontuação atingir determinado nível de dano econômico. Um atraso de aproximadamente 15 dias permite a emissão de duas novas folhas e o desenvolvimento da doença nas demais folhas, perdendo-se a oportunidade de atingir estas folhas alvos no momento correto, onde e quando predominam os estádios precoces do desenvolvimento dos sintomas. Atrasos na pulverização reduzem a eficiência de controle, favorecendo a epidemia da doença e o desenvolvimento de resistência (ZAMBOLIM, 2010; HOLLOMON, 1997).

De acordo com o levantamento, nos bananais comerciais da região utilizavam-se 4 a 6 aplicações anuais de fungicida para o controle da Sigatoka amarela, porém, com o advento da Sigatoka negra, em 2004, os bananais comerciais, que não adotaram adequadamente a técnica de monitoramento semanal da severidade da doença, passaram a fazer 8 a 12 aplicações e apresentam menores produtividades, enquanto aqueles que a praticaram, realizam 15 a 20 aplicações e apresentam maiores produtividades. Como visto, os bananais da região ainda apresentam menor número de aplicações em relação a países exportadores, como a Costa Rica, que faz 52 a 77 e o Equador que faz 28 a 40 aplicações, porém vem apresentando significativo aumento do número de pulverizações.

## **5.2 Coletas de amostras**

A tarefa de coletar as folhas com peritécios apresentou dificuldades em alguns bananais comerciais devido, principalmente, a realização das desfolhas de limpeza ou sanitária e à aplicação foliar de fungicidas para controle das Sigatokas. Porém, as folhas que

concentram as maiores quantidades de ascósporos viáveis, dentro dos peritécios, correspondem àquelas totalmente necrosadas e secas, que permanecem penduradas nas plantas severamente atacadas pela doença (PEREIRA et al., 2010).

As folhas necrosadas e secas, quando encontradas, muitas vezes apresentavam peritécios, porém sem produção de ascósporos viáveis, devido à ação de fungicidas aplicados via foliar. Da mesma forma, folhas necrosadas apenas na sua extremidade ou totalmente necrosadas mas ainda ereta na planta apresentaram nenhum ou poucos ascósporos viáveis. Isto evidencia a importância da desfolha sanitária, principalmente das folhas penduradas na planta, e da erradicação dos bananais abandonados como medida preventiva para a redução destas que correspondem as principais fontes de inóculo do fungo, reponsáveis pela epidemia.

### **5.3 Isolamento e identificação molecular dos fungos.**

O isolamento monoascospórico por meio da descarga de ascósporos se mostrou mais eficiente para obtenção de isolados de forma rápida quando comparada ao isolamento a partir de conídios. Sabe-se que o isolamento através de conídios é indicado para *M. musicola* devido ao tamanho, que varia de 25 a 90 µm de comprimento e 1,5 a 12,5 µm de largura, e por seus conidióforos se formarem em fascículos em ambas as faces da folha, facilitando sua identificação com uso de lupa e sua retirada com uso de estilete, obtendo-se assim um isolamento livre de contaminações. Já os conídios de *M. fijiensis* são menores, com comprimento de 6,25 a 16,5 µm e largura de 4 a 7 µm, e se formam isoladamente ou em pequenos grupos que emergem do estômato, dificultando o isolamento (UCHÔA, 2010).

O isolamento e a purificação das colônias de fungos provenientes de duas propriedades do município de Sete Barras e duas do município de Jacupiranga não foi possível, devido à aplicação recente de emulsão de fungicida em óleo mineral. Nestes casos, a identificação dos isolados foi realizada com base na extração do DNA dos fungos presentes no tecido vegetal infectado, separando-se, assim, as propriedades com presença exclusiva da Sigatoka negra (Figura 14) e propriedades com a coexistência de ambas as doenças (Figura 13).

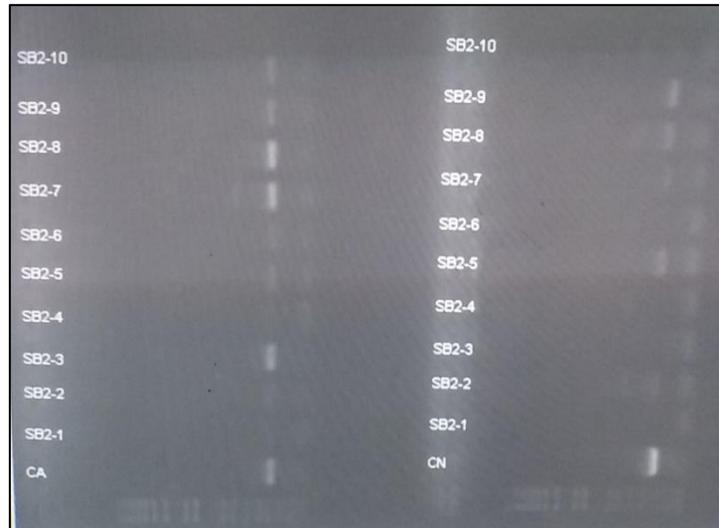


Figura 13 – Coexistência de *Mycosphaerella fijiensis* e *Mycosphaerella musicola* evidenciada por meio de PCR com primers específicos a partir de DNA extraído de lesão foliar em propriedade no município de Sete Barras. À esquerda produtos obtidos com primers para *M. musicola*, à direita produtos obtidos com primers para *M. fijiensis*. CA = controle positivo para Sigatoka amarela, CN = controle positivo para Sigatoka negra.

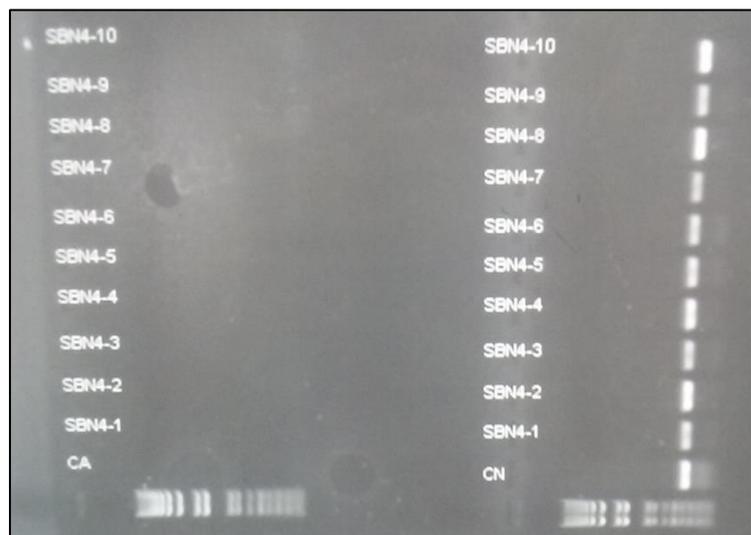


Figura 14 – Presença exclusiva de *Mycosphaerella fijiensis* evidenciada por meio de PCR com primers específicos a partir de DNA extraído de lesão foliar em propriedade no município de Sete Barras. À esquerda produtos obtidos com primers para *M. musicola*, à direita produtos obtidos com primers para *M. fijiensis*. CA = controle positivo para Sigatoka amarela, CN = controle positivo para Sigatoka negra.

O isolamento direto por meio da descarga de ascósporos e a identificação molecular por meio do sequenciamento da região ITS resultaram na obtenção de diversas espécies do gênero *Mycosphaerella*, além de fungos de outros gêneros (Tabela 4). Na mesma folha seca, de onde se obteve ascósporos de *M. musicola* e *M. fijiensis*, observou-se a presença de outras espécies, que podem ou não estar associadas às doenças. A reidentificação dos isolados após o teste de sensibilidade ao fungicida benzimidazol resultou em reclassificação da espécie em vários casos, revelando que o isolado inicial não se encontrava puro. Suspeitava-se que muitos

dos isolados não estavam puros pela análise dos eletroferogramas dos sequenciamentos da região ITS que apresentavam picos menores abaixo dos picos principais (Figura 15).

Tabela 4 – Identificação molecular dos isolados fúngicos obtidos a partir de folhas de bananeiras com sintomas de Sigatoka. Identificações baseadas no sequenciamento da região ITS ou do gene da actina. Isolados em vermelho foram submetidos aos testes de sensibilidade *in vitro* a fungicidas. Após o teste de sensibilidade ao benzimidazol, os isolados foram identificados novamente e a espécie encontrada está indicada na última coluna, após a barra.

Município	Isolado	Região ou gene utilizado	Identificação (antes do teste de sensibilidade/após o teste)
Miracatu	M1-1	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	M1-3	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	M1-4	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	M1-5	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	M1-6	ITS	<i>M. musae</i>
	M1-7	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	M1-8	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	M1-9	actina	<i>M. thailandica</i>
	M1-10	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	M2-1	actina/ITS	<i>M. thailandica/M. musae</i>
	M2-2	actina	<i>M. thailandica</i>
	M3-1	actina	<i>M. thailandica</i>
	M3-2	ITS	<i>M. musae</i>
	M3-3	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	M3-4	ITS	<i>Ochroconis</i> sp.1
	M3-5	actina	<i>M. thailandica</i>
	M3-6	actina/actina	<i>M. thailandica/M. thailandica</i>
	M3-7	actina	<i>M. thailandica</i>
	M3-8	actina	<i>M. thailandica</i>
	M3-9	actina	<i>M. thailandica</i>
	M3-10	actina	<i>M. thailandica</i>
	M4-1	ITS/actina	<i>Ochroconis</i> sp1./ <i>M. thailandica</i>
	M5-2	ITS	<i>Ochroconis</i> sp.2
M5-3	ITS/actina	<i>Ochroconis</i> sp.2/ <i>M. thailandica</i>	
M5-4	actina	<i>M. thailandica</i>	
M5-5	ITS	<i>M. fijiensis</i>	
Sete Barras	SB1-1	actina	<i>M. thailandica</i>
	SB1-2	actina	<i>M. thailandica</i>
	SB1-3	actina	<i>M. thailandica</i>
	SB1-4	actina	<i>M. thailandica</i>
	SB1-5	actina	<i>M. thailandica</i>
	SB1-6	actina/actina	<i>M. thailandica/M. thailandica</i>
	SB1-9	actina	<i>M. thailandica</i>
	SB2-1	actina/actina	<i>M. thailandica/M. thailandica</i>
	SB5-1	actina	<i>M. thailandica</i>
	SB5-2	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	SB5-3	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	SB6-2	actina/actina	<i>M. thailandica/M. thailandica</i>
SB6-3	actina/actina	<i>M. thailandica/M. thailandica</i>	
SB6-5	actina	<i>M. thailandica</i>	
Registro	RG1-1	ITS	<i>M. musicola</i>
	RG1-3	ITS	<i>M. musicola</i>
	RG1-4	ITS/ITS	<i>M. musicola/M. musicola</i>
	RG1-5	ITS	<i>M. musicola</i>
	RG1-7	ITS	<i>M. musicola</i>
	RG1-9	ITS	<i>M. musicola</i>

Tabela 4 – continuação

Município	Isolado	Região ou gene utilizado	Identificação (antes do teste de sensibilidade/após o teste)
Registro	RG1-10	ITS	<i>M. musicola</i>
	RG2-1	actina	<i>M. thailandica</i>
	RG2-2	ITS	<i>M. musicola</i>
	RG2-4	actina	<i>M. thailandica</i>
	RG2-5	actina	<i>M. thailandica</i>
	RG2-8	ITS/ITS	<i>M. musicola/Zasmidium</i> sp.1
Eldorado	EL1-2	ITS	<i>M. musicola</i>
	EL1-3	ITS	<i>Zasmidium</i> sp.1
	EL1-4	ITS	<i>M. musicola</i>
	EL1-5	actina/ITS	<i>M. thailandica/Zasmidium</i> sp.1
	EL1-6	ITS	<i>M. musicola</i>
	EL1-8	ITS/actina	<i>M. musicola/M. thailandica</i>
	EL2-1	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	EL2-2	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	EL2-3	actina/actina	<i>M. thailandica/M. thailandica</i>
Pariquera-Açú	P1-1	ITS/actina	<i>M. musicola/M. thailandica</i>
	P1-2	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	P1-3	ITS	<i>M. fijiensis</i>
	P1-4	ITS/ITS	<i>M. musae/Ochroconis</i> sp.2
	P1-5	ITS	<i>Ochroconis</i> sp.4
	P1-6	actina	<i>M. thailandica</i>
	P1-7	ITS/actina	<i>M. musae/M. thailandica</i>
	P2-1	ITS	<i>Ochroconis</i> sp.4
	P2-2	ITS/actina	<i>M. musicola/M. thailandica</i>
	P2-3	ITS/ITS	<i>Ochroconis</i> sp.4/ <i>Ochroconis</i> sp.3.
	P2-4	ITS	<i>Ochroconis</i> sp.4
Jacupiranga	J2-4	ITS	<i>M. fijiensis</i>

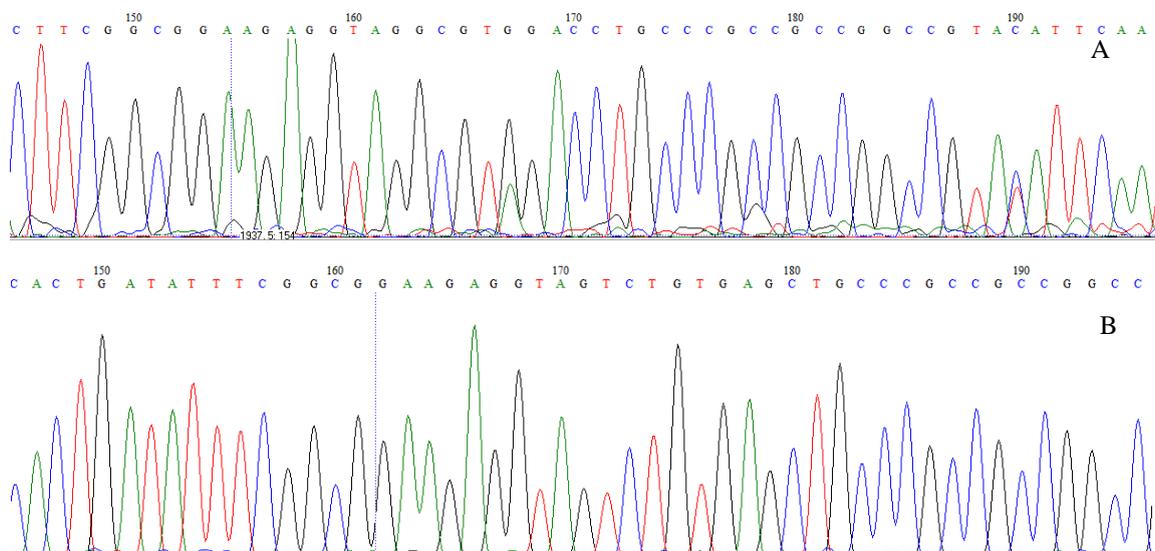


Figura 15 – Exemplos de eletroferogramas do sequenciamento da região ITS. (A) isolado com sinal de presença de mais de uma espécie fúngica, (B) isolado sem sinal de presença de mais de uma espécie.

Diferentes espécies de fungos causando manchas foliares em bananeiras foram relatadas por Stahel (1937), Pont (1960), Stover (1963), Stover (1969) e Pérez (1980). Levanta-se neste estudo a possibilidade de que as Sigatokas não sejam causadas por um único patógeno, mas sim por um complexo de espécies do gênero *Mycosphaerella*. Para confirmar essa hipótese sugere-se testes de patogenicidade dos isolados obtidos neste estudo em folhas de bananeira.

As análises de sequências da região ITS não permitiu a distinção entre *M. thailandica* e *M. colombiensis*, por se tratarem de espécies irmãs que são morfologicamente semelhantes (CROUS et al., 2004). Essas espécies podem ser separadas apenas pela morfologia dos ascósporos, que são constricto em *M. thailandica* e não-constricto em *M. colombiensis*, e por padrões na germinação. *M. colombiensis* só foi relatada como patógeno de folhas de eucalipto na Colômbia (CROUS, 1998), enquanto *M. thailandica* foi relatada infectando *Acacia sp.* e *Musa sp.* (CROUS et al., 2004). O sequenciamento de fragmento do gene da actina permitiu confirmar a identificação dos isolados do presente estudo como *M. thailandica* (Figura 16).

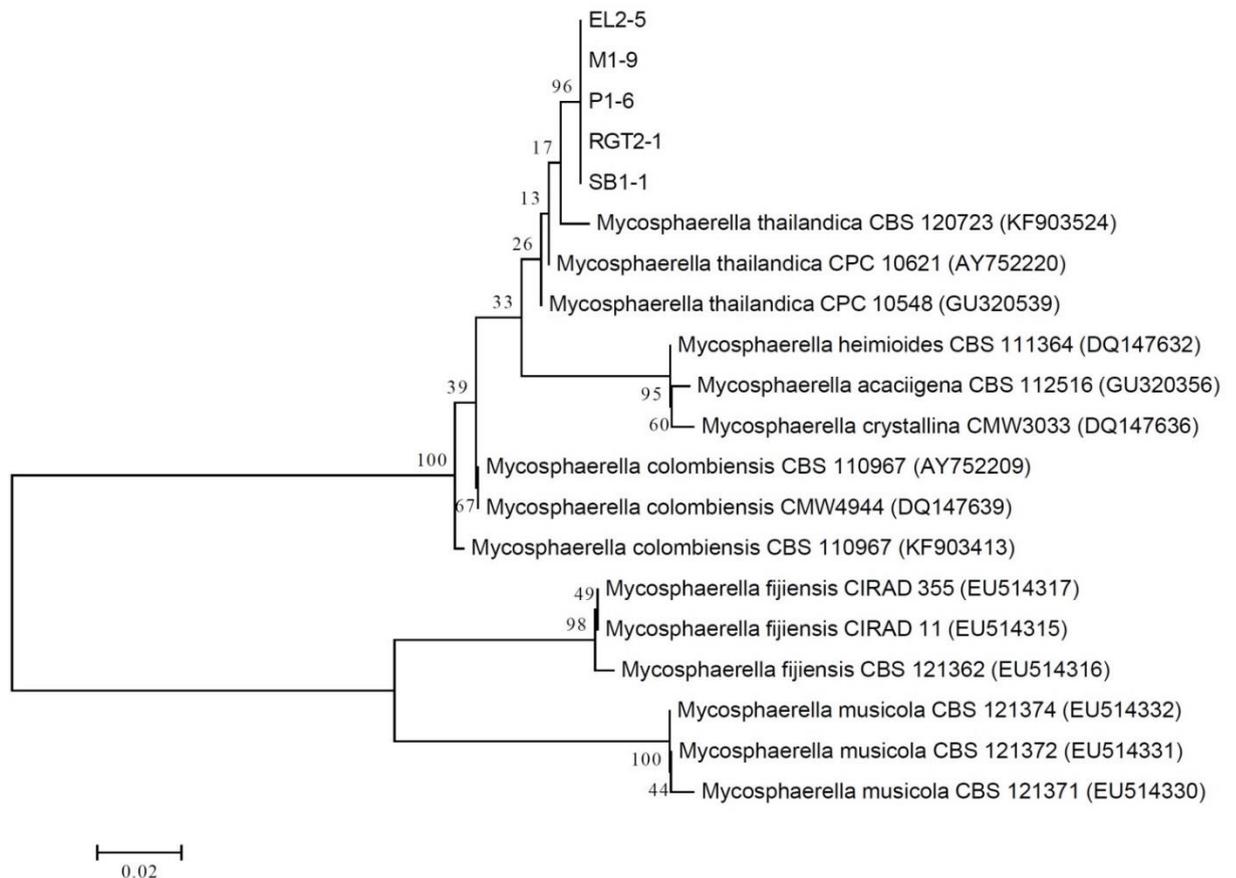


Figura 16 – Árvore filogenética construída com sequências do gene da actina pelo método de Neighbor Joining. Sequências de isolados do presente estudo foram comparadas com sequências de espécimes de coleções depositadas no Genbank. O número de acesso no Genbank encontra-se entre parênteses.

Estudo desenvolvido por Bolfarini et al. (2012), no Vale do Ribeira, SP, concluiu pela predominância de *M. fijiensis* na região, porém a identificação dos isolados foi realizada por PCR, utilizando-se os mesmos primers específicos utilizados no presente estudo, ratificando a necessidade do sequenciamento genético para a identificação das espécies associadas aos sintomas e a necessidade de confecção de primers específicos para essas espécies.

*Mycosphaerella musae* foi uma das espécies detectadas no presente estudo coinfectando folhas de bananeira com outros fungos. Stover (1994) demonstrou que *M. musae* isolado de fases iniciais de lesões de Sigatoka e uma espécie não virulenta de *Cercospora sp.* são o mesmo fungo. Constatou também, que *M. musae* apresenta maior produção de ascósporos quando associado a lesões de Sigatoka amarela do que a lesões de Sigatoka negra.

Outros isolados detectados pertencem aos gêneros *Ochroconis* (quatro espécies) e *Zasmidium* (duas espécies). O sequenciamento da região ITS não permitiu que se chegasse à identificação ao nível de espécie (Figuras 17 e 18). Existem espécies destes dois gêneros que ocorrem em bananeira (*Ochroconis musae*, *Zasmidium musae*, *Zasmidium musicola*, *Zasmidium musae-banksii* e *Zasmidium musigenum*), porém, a análise filogenética indicou que os isolados do presente estudo são distintos a essas espécies (Figuras 17 e 18). Um fungo identificado como *Ochroconis sp.* isolado L1265, com sequência ITS depositada no Genbank (KC288114) quase idêntica à do isolado P2-3, foi isolado de paciente no Brasil recipiente de transplante de rim e sob terapia imunossupressiva, apresentando infecção subcutânea fúngica (SANTOS et al., 2013).

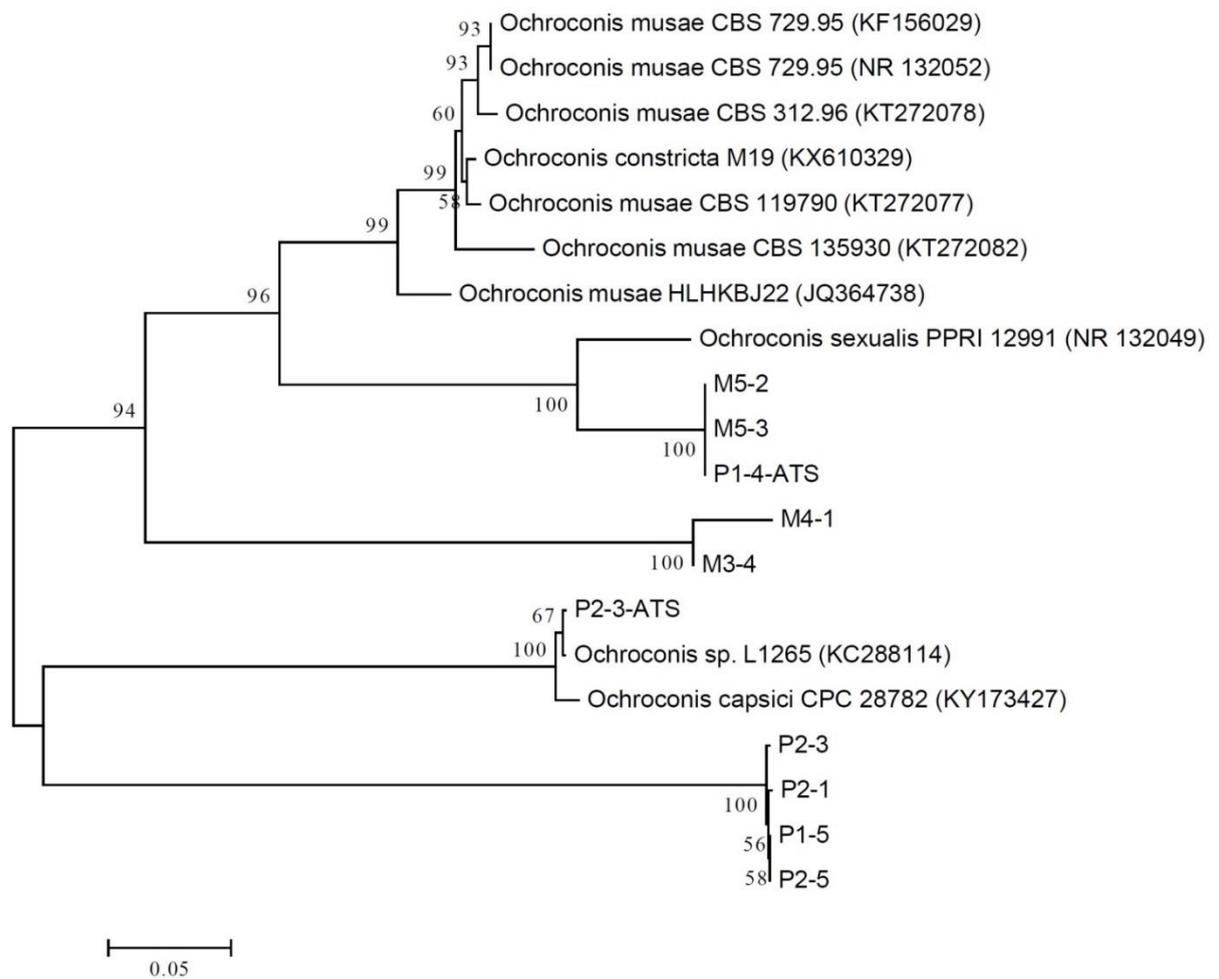


Figura 17 – Árvore filogenética construída com sequências da região ITS de isolados do gênero *Ochoconis* pelo método de Neighbor Joining. Sequências de isolados do presente estudo foram comparadas com sequências de espécimes de coleções depositadas no Genbank. O número de acesso no Genbank encontra-se entre parênteses. Os isolados do presente estudo seguidos da sigla ATS correspondem àqueles obtidos após o teste de sensibilidade ao benzimidazol.

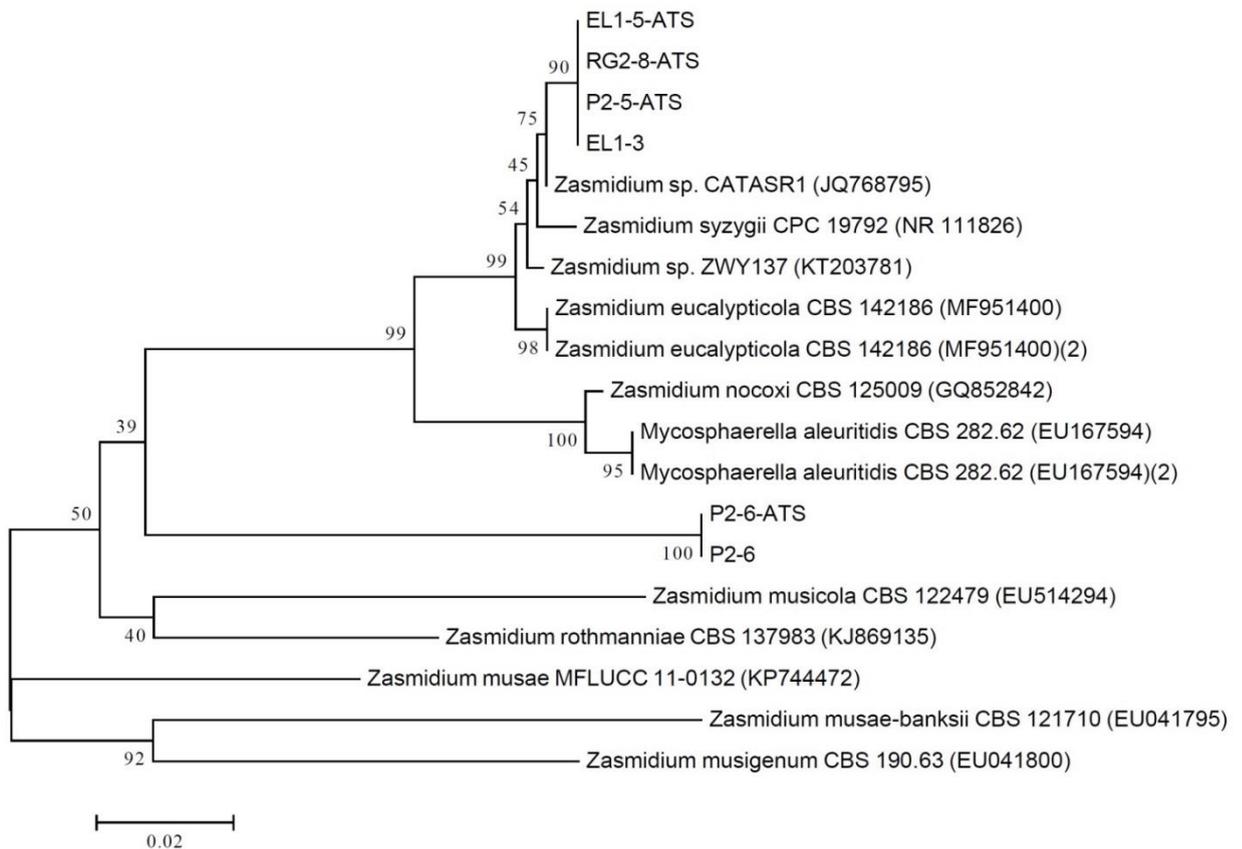


Figura 18 – Árvore filogenética construída com sequências da região ITS de isolados do gênero *Zasmidium* pelo método de Neighbor Joining. Sequências de isolados do presente estudo foram comparadas com sequências de espécimes de coleções depositadas no Genbank. O número de acesso no Genbank encontra-se entre parênteses. Os isolados do presente estudo seguidos da sigla ATS correspondem àqueles obtidos após o teste de sensibilidade ao benzimidazol.

Arzanlou et al. (2008) também relataram a ocorrência de diversas espécies de *Mycosphaerella* e de outros gêneros, associados a lesões de Sigatoka em bananeiras, muitos dos quais também foram constatados no presente estudo. Estes autores afirmaram que a contribuição de cada uma dessas espécies para o estabelecimento da doença ainda precisaria ser melhor estudada. Os ascósporos das diversas espécies do gênero *Mycosphaerella* podem facilmente ser confundidos, mesmo em microscópio, conforme constatado no presente estudo. Dessa forma, a avaliação da resistência a fungicidas utilizando o método de descarga de ascósporos, preconizado pelo FRAC, pode não ser adequado devido à dificuldade de se identificar o ascósporo que apresentou resistência.

No presente estudo, constatou-se a imensa diversidade de espécies de fungos cujos ascósporos podem ser obtidos de uma mesma lesão. De acordo com Ngando et al. (2015), o método de avaliação da resistência de *M. fijiensis* deve ser feito com o uso de conídios pela menor diversidade genética que estes apresentam. Porém, a identificação tanto de conídios como de ascósporos do complexo da mancha foliar de *Mycosphaerella* exige um olho

treinado para reconhecer as pequenas diferenças (CROUS et al., 2004). Assim, baseado nas observações do presente estudo, recomenda-se adaptação do teste de sensibilidade do FRAC, tanto para o uso de conídios como de ascósporos. Realizando identificação da espécie após a finalização do teste, através de isolamento das colônias que germinarem nas maiores concentrações do fungicida em análise e identificando-a através de sequenciamento do DNA ou com uso de primers específicos quando disponíveis. Desta forma, garante-se para qual espécie de fungo foi avaliada a sensibilidade ao fungicida.

#### **5.4 Testes de sensibilidade *in vitro* a fungicidas dos grupos dos benzimidazóis, triazóis e estrobilurinas e detecção de mutações nos genes da $\beta$ -tubulina, citocromo b mitocondrial e CYP51**

##### **5.4.1 Sensibilidade ao tiofanato metílico e sequenciamento do gene da $\beta$ -tubulina**

O teste de sensibilidade ao benzimidazol mostrou predomínio de resistência entre as espécies e isolados fúngicos obtidos no presente estudo (Tabela 5).

A mutação GAG para GCG, que altera o aminoácido ácido glutâmico (E) para alanina (A), mutação E198A, está relacionada à menor sensibilidade de *M. fijiensis* a fungicidas do grupo dos benzimidazóis (CAÑAS-GUTIERREZ et al., 2006). A análise do teste de sensibilidade ao fungicida tiofanato metílico permitiu correlacionar a presença da mutação com a menor sensibilidade ao fungicida para a maioria dos isolados do presente estudo (Tabela 5). As exceções serão discutidas caso a caso.

O sequenciamento do gene da beta-tubulina de dois isolados de *M. fijiensis* de propriedade do município de Sete Barras não indicou a presença da mutação para resistência a benzimidazóis e o teste *in vitro* confirmou a sensibilidade desses isolados (Tabela 5, Figura 19). Embora não tenham sido obtidos isolados de *M. musicola* em propriedades deste município, o isolado RG1-4 desta espécie obtido em propriedade de Registro foi resistente a benzimidazol e apresentou mutação E198A, sugerindo que a dificuldade no controle de Sigatoka amarela na região esteja relacionada à presença de cepas resistentes desta espécie de fungo (Tabela 5, Figura 19). Além disso, quatro isolados de *M. thailandica* obtidos em Sete Barras apresentaram resistência a benzimidazol e mutação E198A, embora o papel desta espécie na doença Sigatoka ainda necessite esclarecimento.

Tabela 5 – Ocorrência de mutação no gene da beta-tubulina e sensibilidade ao tiofanato metílico de fungos isolados de bananeira com sintomas de Sigatoka. GAG = ácido glutâmico (E), GCG = alanina (A), CAG = glutamina (Q), GCC = alanina (A), GGG = glicina (G), TTC = fenilalanina (F), TAC = tirosina (Y).

Isolado	Identificação	Gene $\beta$ -tubulina (Códons 198, 200* ou 240**)	Classificação
RG1-4	<i>M. musicola</i>	GCG	Resistente
SB5-2	<i>M. fijiensis</i>	GAG	Sensível a 10 mg/L
SB5-3	<i>M. fijiensis</i>	GAG	Sensível a 10 mg/L
M2-1	<i>M. musae</i>	GAG	Sensível
M3-6	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
P1-7	<i>M. thailandica</i>	GCC	Resistente
P2-2	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
EL2-3	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
EL1-8	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
P1-1	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
SB6-2	<i>M. thailandica</i>	TTC**	Resistente
SB1-6	<i>M. thailandica</i>	GGG	Resistente
SB6-3	<i>M. thailandica</i>	TAC*	Resistente
SB2-1	<i>M. thailandica</i>	n/d	Resistente
M4-1	<i>M. thailandica</i>	GAG	Sensível
M5-3	<i>M. thailandica</i>	GAG	Sensível
EL1-5	<i>Zasmidium</i> sp.1	GCG	Resistente
P2-5	<i>Zasmidium</i> sp.1	GAG	Resistente a 100 mg/L
P2-6	<i>Zasmidium</i> sp.2	GAG	Resistente a 100 mg/L
RG2-8	<i>Zasmidium</i> sp.1	GC(A)G e TT(A)C*	Resistente
P1-4	<i>Ochroconi</i> . sp.2	CAG	Resistente
P2-3	<i>Ochroconis</i> sp.3	GAG	Resistente a 100 mg/L

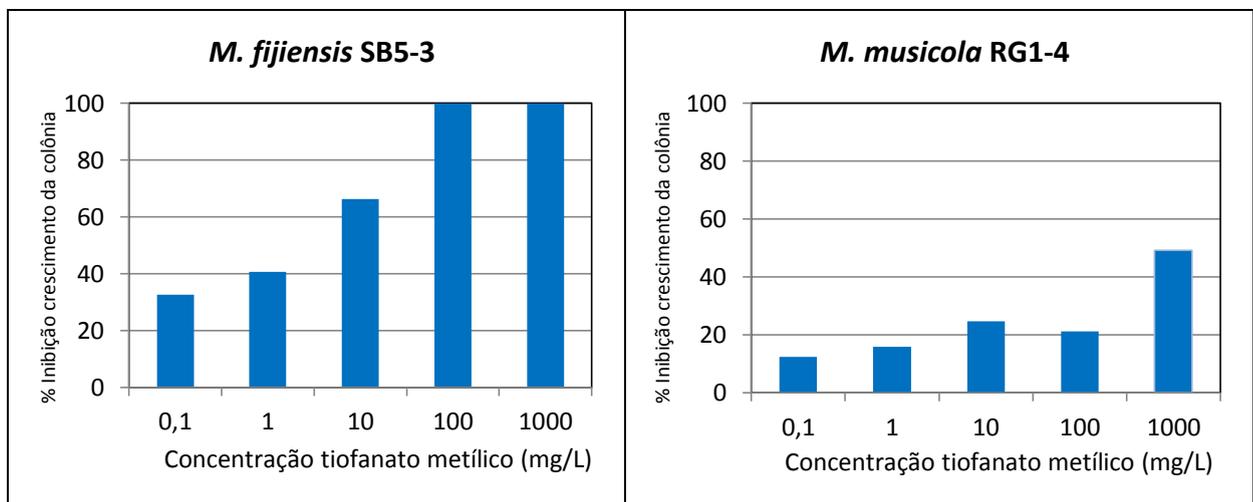


Figura 19 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com tiofanato metílico para *M. fijiensis* SB5-3 e *M. musicola* RG1-4.

No trabalho de Cañas-Gutiérrez et al. (2006), considerou-se resistente todo o isolado que apresentou crescimento na concentração de 10 µg/mL, sendo esta a concentração mais alta avaliada no estudo. Os demais isolados foram classificados como medianamente tolerantes ou sensíveis, ou seja, não foi considerada a porcentagem de inibição dos isolados em comparação com a testemunha e sim a presença ou ausência de crescimento fúngico.

A correlação entre a mutação no códon 198 do gene da  $\beta$ -tubulina e a resistência apresentada no teste de sensibilidade ficou evidente nos isolados de *Mycosphaerella thailandica*. A maior parte dos isolados que apresentou a mutação neste códon, também apresentou crescimento em altas concentrações do fungicida (P1-1, P1-7, P2-2, SB1-6, SB2-1, EL1-8, EL2-3, e M3-6). Já os isolados que não apresentaram a mutação (M4-1 e M5-3) foram sensíveis ao teste, com valores de  $DL_{50}$  entre as concentrações de 1 e 10 mg/L. Entretanto, dois isolados de *M. thailandica* (SB6-2 e SB6-3) que foram resistentes no teste de sensibilidade não apresentaram mutação no códon 198. O isolado SB6-3, apresentou mutação no códon 200, alterando o aminoácido de fenilalanina (TTC) para tirosina (TAC) (F200Y). Essa mutação já foi relatada em isolados resistentes ou medianamente resistentes de diversas espécies fúngicas como *Venturia inaequalis*, *Venturia pirina*, *Penicillium italicum*, *Penicillium aurantiogriseum*, *Tapesia acuformis* e *Tapesia yallundae* (ALBERTINI et al., 1999; KOENRAADT et al., 1992). O isolado de SB6-2 de *M. thailandica*, apresentou mutação no códon 240, TTG (leucina – L) para TTC (fenilalanina – F) (L240F). Esta mutação conferiu resistência moderada a carbendazim e baixa para tiabendazol em *Tapesia yallundae* (ALBERTINI et al., 1999). Em *Monilinia laxa*, a mutação L240F está associada à baixa resistência a benomyl e tiofanato metílico (MA et al., 2005). O grau de resistência do isolado SB6-2 foi menor se comparado ao SB6-3, concordando com os dados da literatura.

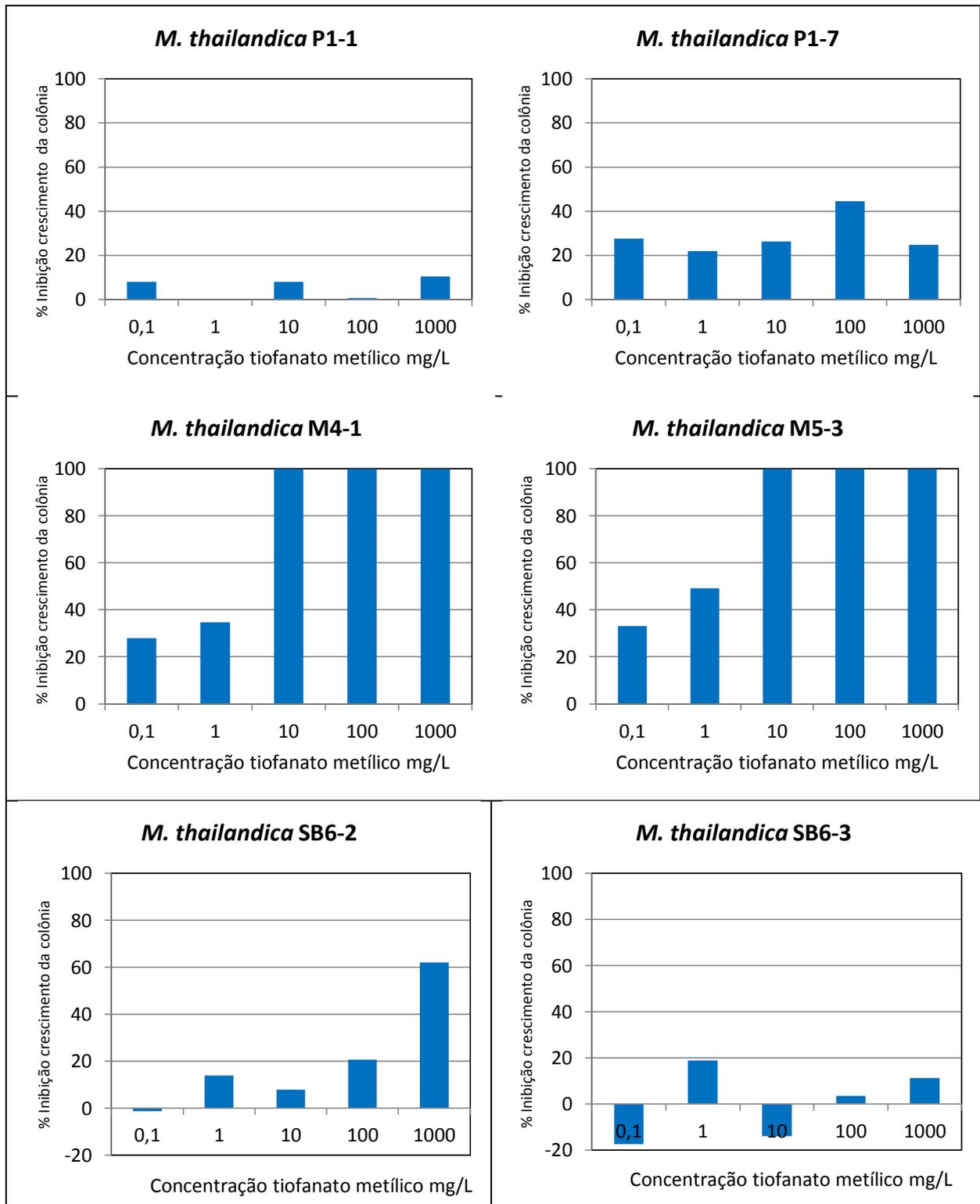


Figura 20 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com tiofanato metílico para os isolados de *Mycosphaerella thailandica*. Isolados P1-1 e P1-7 (resistentes, mutação E198A), M4-1 e M5-3 (sensíveis sem mutação), SB6-2 (resistente, mutação L240F) e SB6-3 (resistente, mutação F200Y).

Os quatro isolados do gênero *Zasmidium* avaliados quanto à sensibilidade ao benzimidazol (RG2-8, P2-5, P2-6 e EL1-5), apresentaram diferentes níveis de resistência ao tiofanato metílico (Figura 22). A avaliação da resistência para estes fungos foi dificultada por

não terem sido obtidas colônias isoladas nas placas contendo o fungicida, observando-se a formação de uma camada homogênea de micélio que diferiu quanto à espessura nas diferentes concentrações do fungicida. Para estes fungos a sensibilidade foi avaliada comparando-se o grau de desenvolvimento da camada de micélio formada nas placas com o fungicida em relação ao controle sem fungicida. O isolado de *Zasmidium* sp.1 EL1-5 mostrou resistência até à concentração de 1.000 mg/L e apresentou a mutação E198A (Figura 21). Interessantemente, o isolado RG2-8, que também apresentou insensibilidade até à concentração mais elevada do benzimidazol, apresentou polimorfismos nos códons 198, com a alteração GCG predominando sobre GAG, e 200, com a sequência TTC (fenilalanina) predominando sobre a mutante TAC (tirosina) (Figura 21). Nos demais isolados de *Zasmidium* em que a insensibilidade foi menos acentuada, não foram observados tais polimorfismos. (Figura 21).

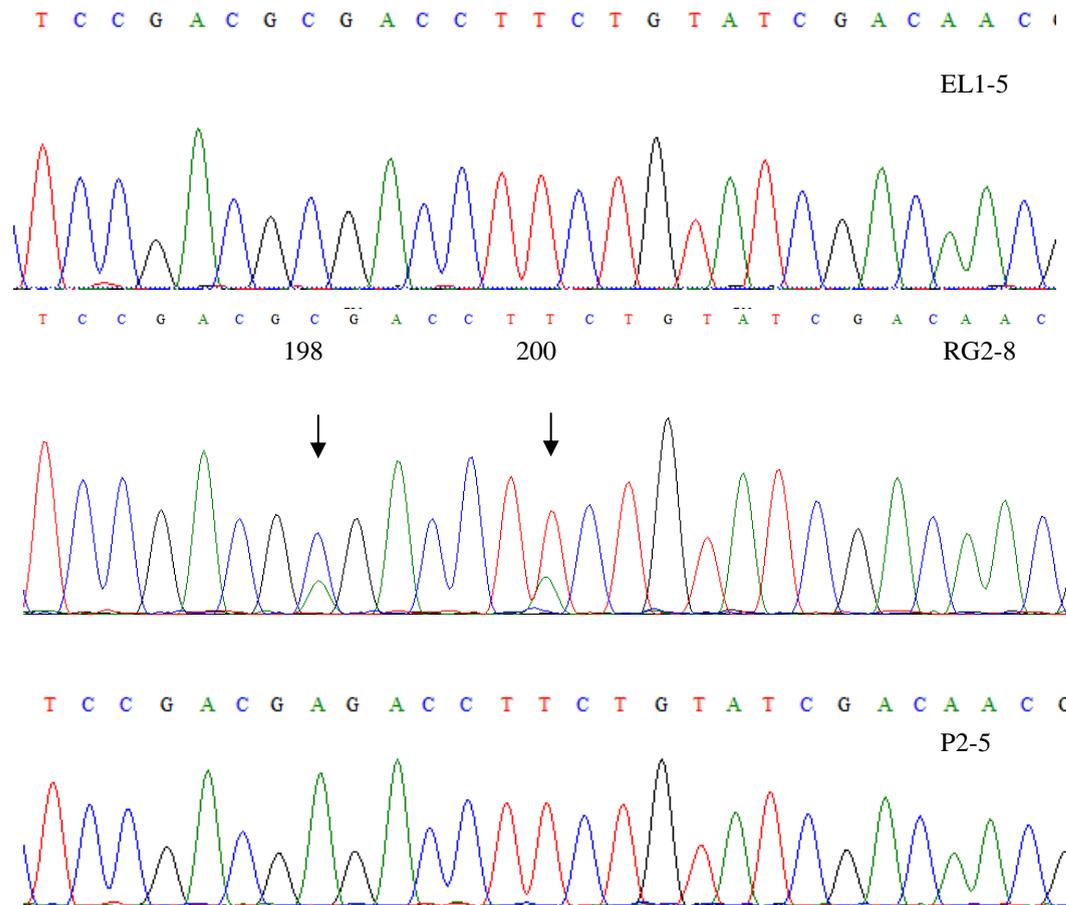


Figura 21 – Eletroferogramas dos sequenciamentos do gene da  $\beta$ -tubulina dos isolados de *Zasmidium* sp1. Isolado EL1-5 (resistente, mutação E198A), isolado RG2-8 (resistente, polimórfico nos códons 198 e 200) e isolado P2-5 (resistente, sem mutações). As setas indicam os polimorfismos nos códons 198 e 200 do isolado RG2-8

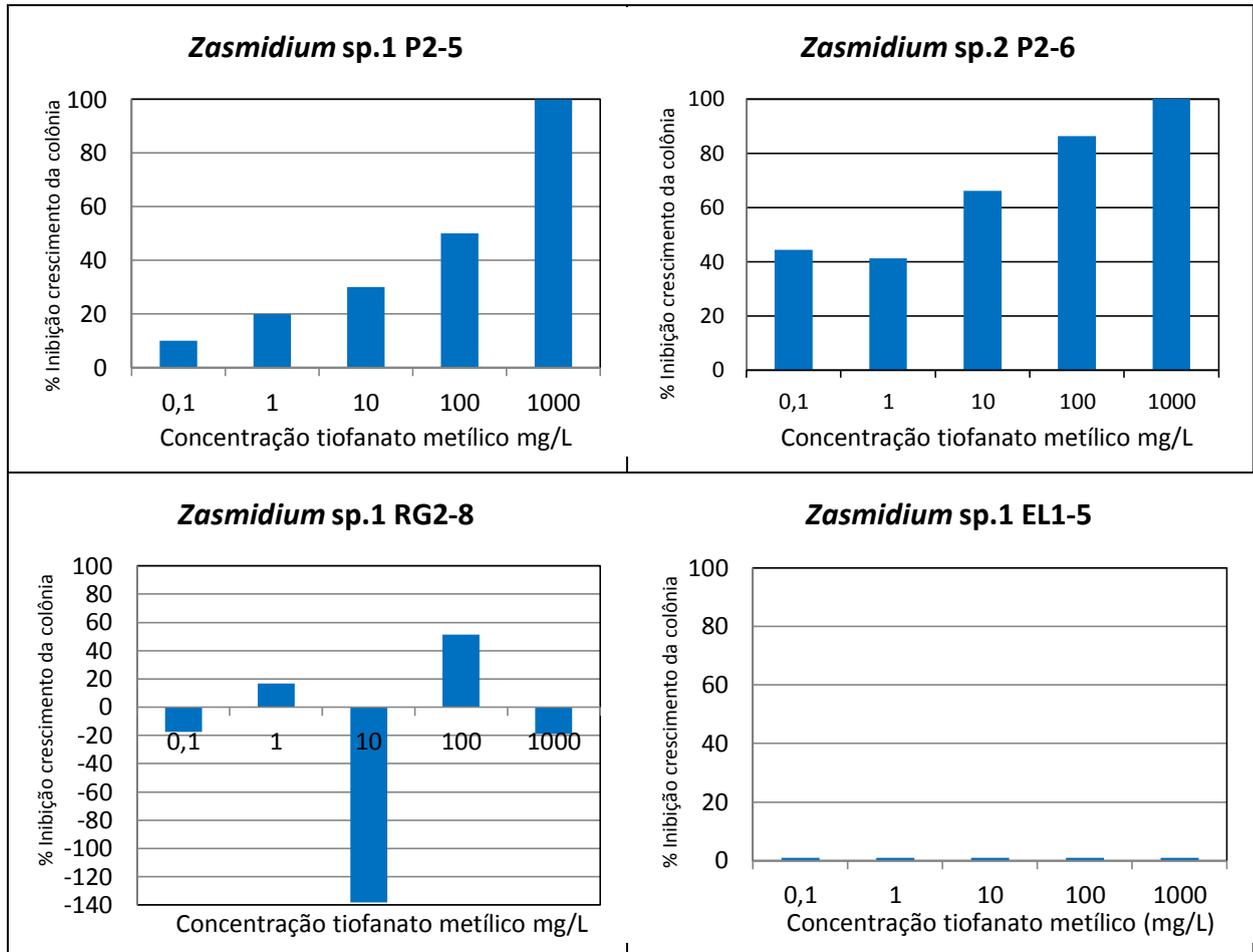


Figura 22 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com tiofanato metílico para os isolados de *Zasmidium* spp. *Zasmidium* sp.1 P2-5 e *Zasmidium* sp.2 P2-6 (resistentes, sem mutação), *Zasmidium* sp.1 RG2-8 (resistente, polimórfico para mutações E198A e F200Y), *Zasmidium* sp.1 EL1-5 (resistente, mutação E198A)

Os isolados P1-4 e P2-3 identificados como *Ochroconis* sp.2 e *Ochroconis* sp.3, mostraram alta tolerância no teste de sensibilidade, ambos com  $DL_{50}$  entre 100 e 1000 mg/L. O isolado P1-4, que mostrou sensibilidade relativamente menor que o P2-3, apresentou mutação GAG (ácido glutâmico - E) para CAG (glutamina - Q) no códon 198. Em *Tapesia yallundae*, esta mutação conferiu resistência elevada a tiabendazole e moderada a carbendazim (ALBERTINI et al., 1999).

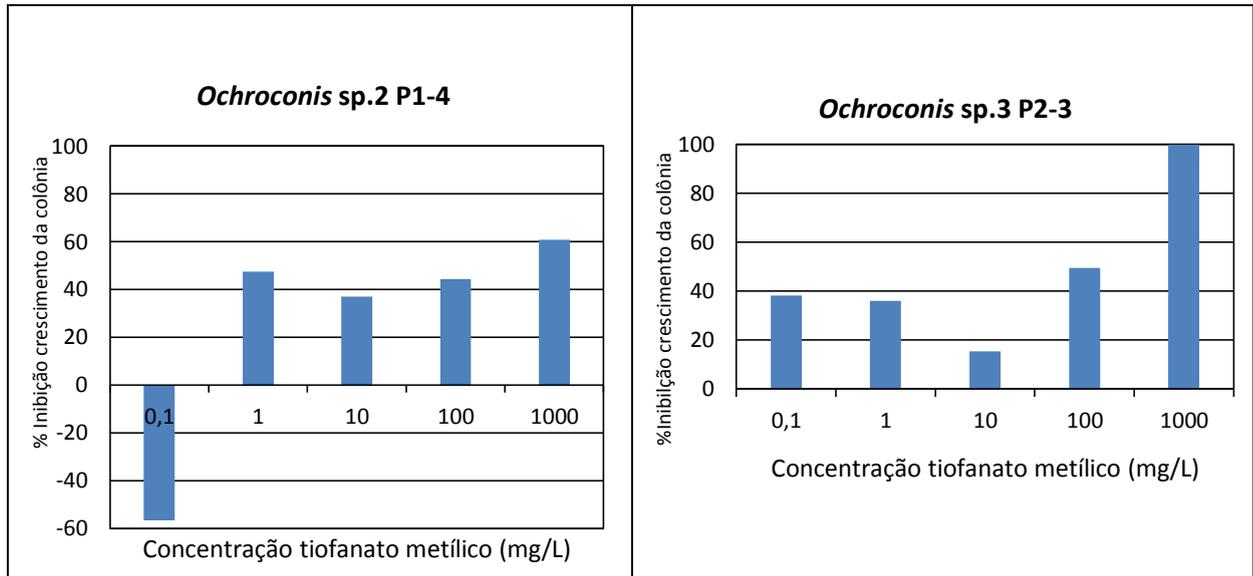


Figura 23 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com tiofanato metílico para os isolados *Ochroconis* sp.2 P1-4 e *Ochroconis* sp.3 P2-3.

O isolado de *Mycosphaerella musae* (M2-1) mostrou-se sensível no teste de sensibilidade ao tiofanato metílico, apresentando  $DL_{50}$  entre os valores de 1 mg/L e 10 mg/L (Figura 24), porém no sequenciamento não foi identificada mutação no gene  $\beta$ -tubulina, apresentando o códon 198 GAG.

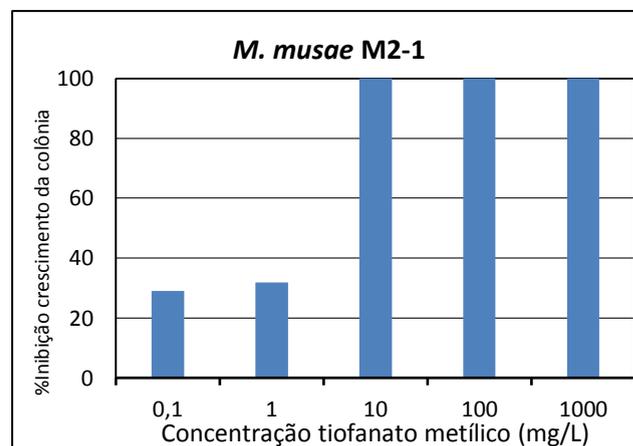


Figura 24 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade *in vitro* com tiofanato metílico para o isolado de *Mycosphaerella musae* M2-1.

#### 5.4.2 Sensibilidade a azoxistrobina e sequenciamento do gene da citocromo b mitocondrial

Os isolados fúngicos submetidos aos testes de sensibilidade a estrobilurina foram aqueles que cresceram nas concentrações mais elevadas dos testes com tiofanato metílico e cujas identificações já haviam sido confirmadas. Observou-se predominância de isolados resistentes à azoxistrobina (Tabela 6). Os isolados da espécie *M. fijiensis* mostraram-se

sensíveis e não apresentaram mutação no códon 143 (alanina no lugar de glicina, G143A), enquanto que o isolado de *M. musicola* (RG1-4), apesar de apresentar essa mutação, mostrou pequena diminuição na sensibilidade à estrobilurina (sensível a partir de 1 mg/L do fungicida) (Figura 25).

Tabela 6 – Ocorrência de mutação no gene do citocromo b mitocondrial e sensibilidade a azoxistrobina de fungos isolados de bananeira com sintomas de Sigatoka. GCA = alanina (A), GGT = glicina (G), GCG = alanina (A), GCT = alanina (A), GGA = glicina (G), GGG = glicina (G).

Isolado	Identificação	Citocromo b mitocondrial (códon 143)	Classificação
RG1-4	<i>M. musicola</i>	GCA	Sensível a 0,1 mg/L
SB5-2	<i>M. fijiensis</i>	GGA	Sensível
SB5-3	<i>M. fijiensis</i>	GGA	Sensível
P1-1	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
P1-7	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
M3-6	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
SB1-6	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
SB2-1	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
EL1-8	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
SB6-2	<i>M. thailandica</i>	GCG	Resistente
P2-2	<i>M. thailandica</i>	GCG	Sensível a 1 mg/L
M4-1	<i>M. thailandica</i>	GCA	Sensível a 1 mg/L
M5-3	<i>M. thailandica</i>	GCG	Sensível a 1 mg/L
SB6-3	<i>M. thailandica</i>	GCG	Sensível a 1 mg/L
EL2-3	<i>M. thailandica</i>	GGG	Sensível a 0,1
M2-1	<i>M. musae</i>	GGG	Sensível
EL1-5	<i>Zasmidium</i> sp.1	GCT	Resistente
RG2-8	<i>Zasmidium</i> sp.1	GGT	Resistente
P2-5	<i>Zasmidium</i> sp.1	GGT	Sensível a 1 mg/L
P2-6	<i>Zasmidium</i> sp.2	GGG	Sensível a 1 mg/L
P1-4	<i>Ochroconis</i> sp.2	GCT	Resistente
P2-3	<i>Ochroconis</i> sp.3	GGA	Sensível a 1 mg/L

SIEROTZKI et al. (2000) estudou a resistência de *M. fijiensis* a fungicidas do grupo químico das estrobilurinas e constatou que a mutação G143A é suficiente para uma resistência completa, devido aos altos fatores obtidos em testes de sensibilidade aos princípios ativos trifloxistrobina, azoxistrobina e famoxadona. Esses autores observaram que os isolados resistentes de *M. fijiensis* portadores da mutação foram capazes de crescer em meio contendo acima de 10 mg/L de azoxistrobina.

Possivelmente, diferenças nos métodos de avaliação da resistência expliquem a menor sensibilidade observada em relação ao presente estudo.

AMIL et al. (2002) observaram que o fungicida azoxistrobina, em concentração de 10 ppm (10 mg/L), conseguiu inibir 55% da infecção inicial de ascósporos de *M. fijiensis*, mesmo para isolados resistentes do fungo.

Gomes et al. (2014) não encontraram a mutação G143A em nenhum dos 46 isolados de *M. fijiensis* obtidos de diferentes regiões produtoras de banana no Brasil, entre os anos de 2008 e 2009, incluindo o Vale do Ribeira em SP. Entretanto, esses isolados não foram avaliados quanto à sensibilidade *in vitro* a fungicidas do grupo das estrobilurinas.

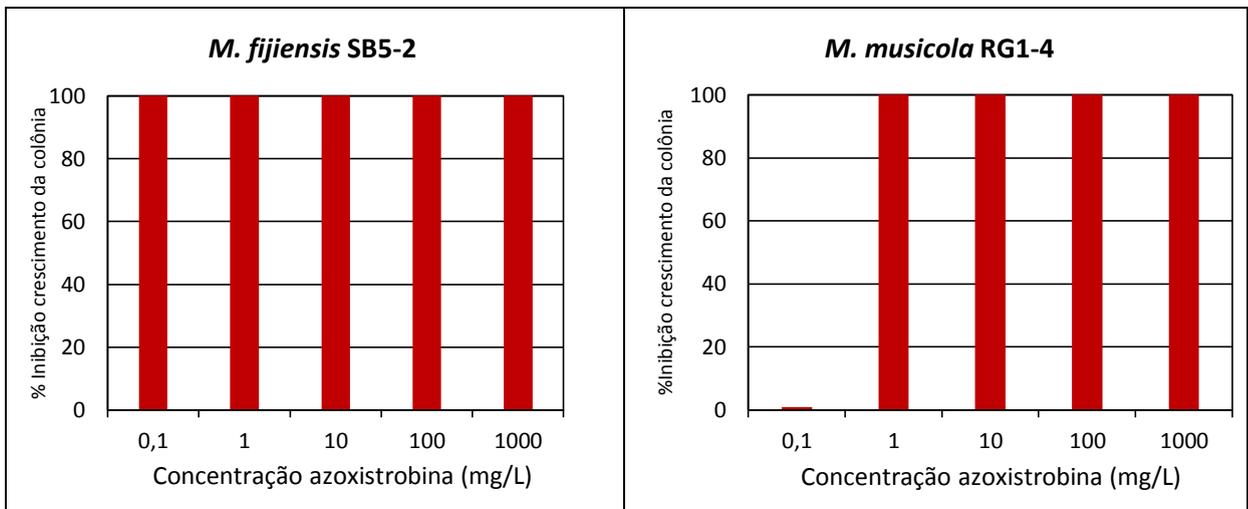


Figura 25 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade *in vitro* com azoxistrobina para os isolados de *Mycosphaerella fijiensis* SB5-2 e *Mycosphaerella musicola* RG1-4.

O isolado de *M. musae* apresentou alta sensibilidade, assim como os isolados de *M. fijiensis*, não apresentando crescimento micelial na concentração mais baixa de 0,1 mg/L (Figuras 25 e 26).

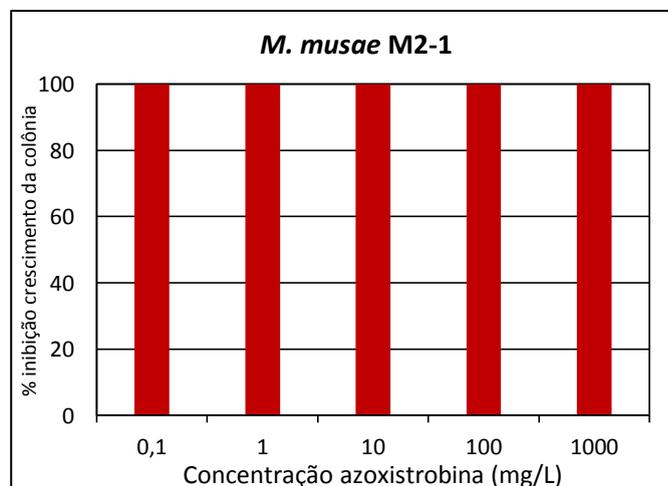


Figura 26 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade *in vitro* com azoxistrobina para o isolado de *Mycosphaerella musae* M2-1.

Os isolados de *M. thailandica* apresentaram diferentes níveis de tolerância à azoxistrobina, sendo divididos em grupos para melhor classificação. Assim temos os isolados altamente resistentes P1-7 e SB6-2, que mesmo na concentração de 1.000 mg/L ainda apresentaram inibição menor que 50% (Figura 27).

Os isolados de *M. thailandica* e M3-6, P1-1, SB1-6 e SB2-1 foram capazes de crescer em concentrações de até 1.000 mg/L, porém, com inibições de crescimento ligeiramente acima de 50% (Figura 27).

O isolado M4-1 também foi capaz de crescer em concentrações de até 1.000 mg/L mas apresentou inibição de crescimento superior a 50% desde a concentração de 1 mg/L (Figura 28).

O isolado EL1-8 foi totalmente inibido na concentração de 1.000 mg/L porém apresentou comportamento incomum na concentração de 100 mg/L, na qual a inibição de crescimento foi menor que nas concentrações imediatamente superior e inferior (Figura 28).

Os isolados mais sensíveis foram P2-2 (inibição total a partir de 100 mg/L), SB6-3 e M5-3 (inibição total a partir de 10 mg/L), e EL2-3 (inibição total a partir de 1 mg/L) (Figura 28).

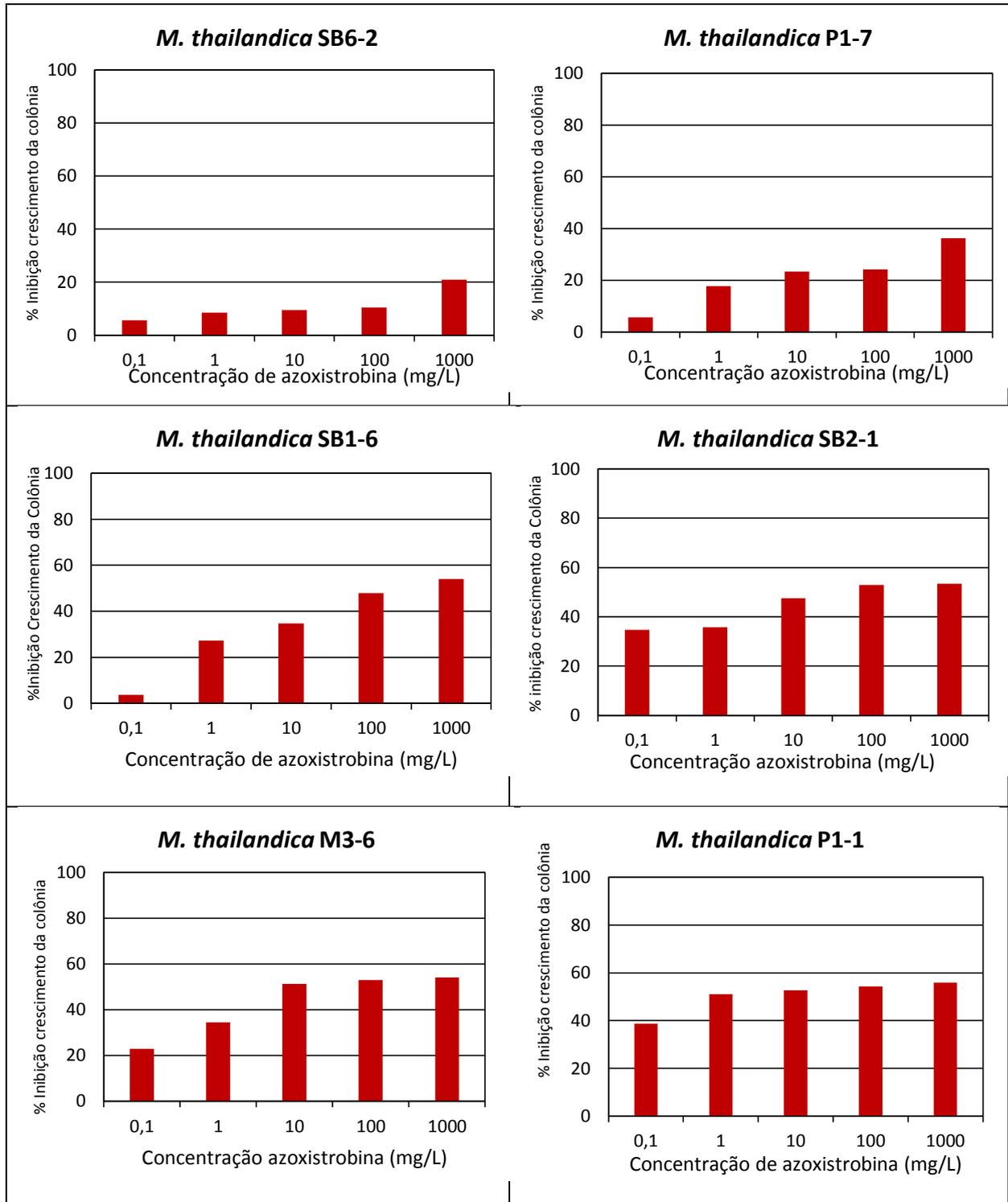


Figura 27 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com azoxistrobina para os isolados de *Mycosphaerella thailandica*: SB6-2, P1-7, SB1-6, SB2-1, M3-6 e P1-1.

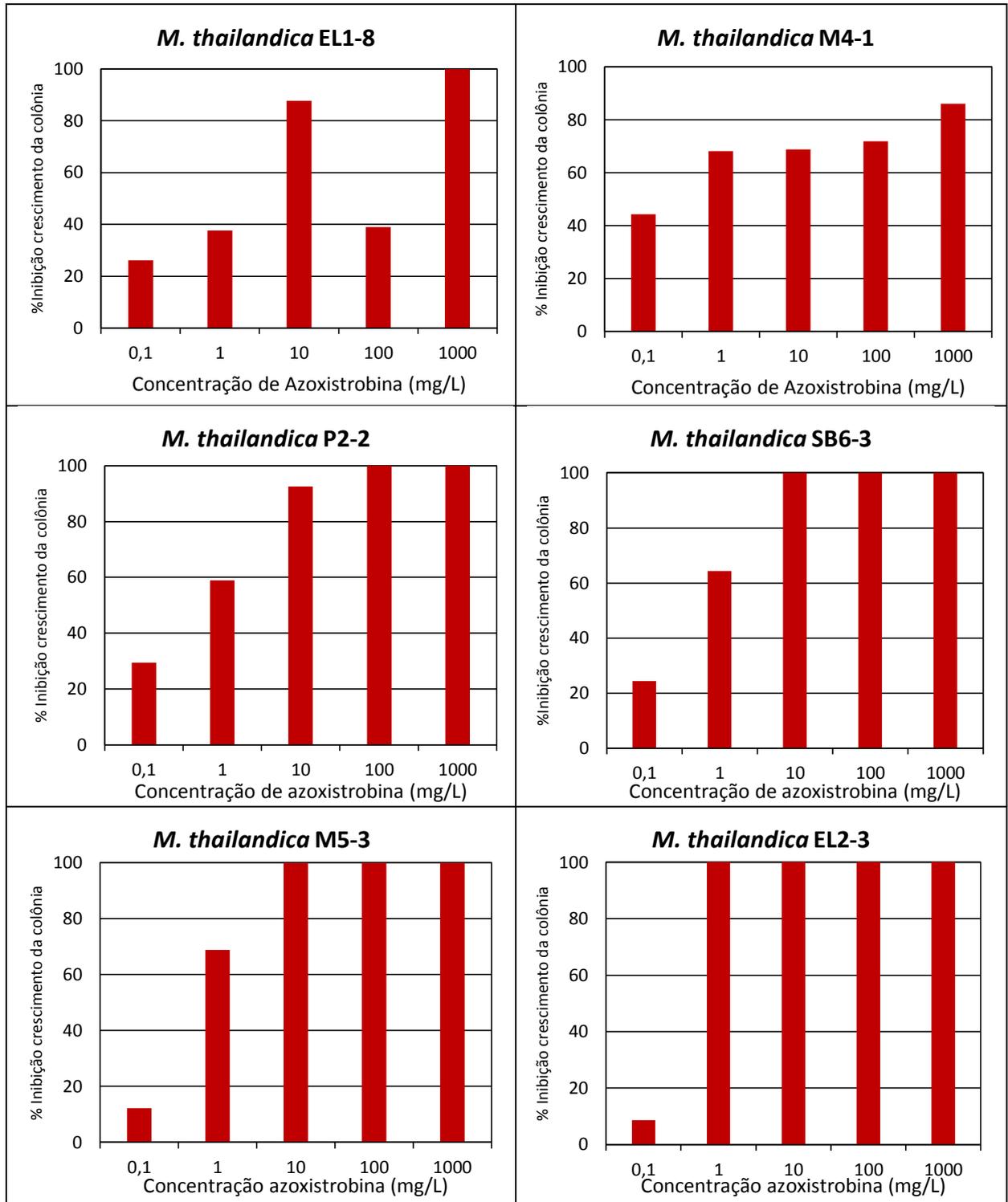


Figura 28 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com azoxistrobina para os isolados de *Mycosphaerella thailandica* EL1-8, M4-1, P2-2, SB6-3, M5-3 e EL2-3.

Assim como no ensaio de sensibilidade para benzimidazol, os isolados de *Zasmidium* spp. não formaram colônias isoladas nas placas onde a azoxistrobina foi adicionada. Desta forma, a avaliação da sensibilidade também foi realizada com base na quantidade de micélio formado sobre o meio de cultura. Os isolados do gênero puderam ser divididos em dois grupos, um altamente tolerante, que apresentou crescimento mesmo na concentração mais alta de 1.000 mg/L de azoxistrobina (isolados RG2-8 e EL1-5) e outro com baixa tolerância que apresentou inibição maior que 50% a partir de 1 mg/L (isolados P2-5 e P2-6) (Figura 29).

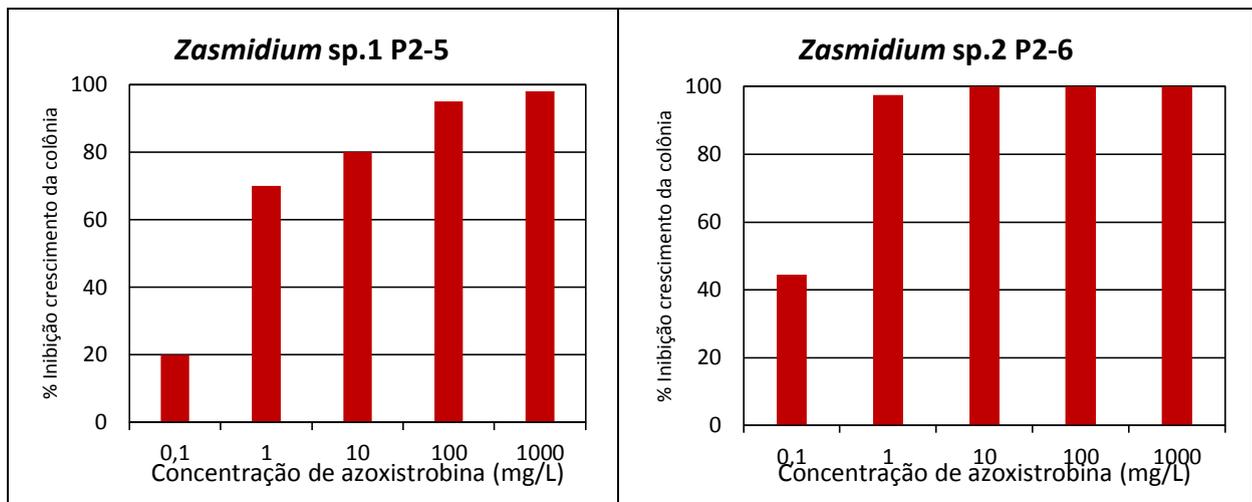


Figura 29 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com azoxistrobina para os isolados de *Zasmidium* sp.1 P2-5 e *Zasmidium* sp.2 P2-6.

O isolado P1-4 do gênero *Ochroconis* apresentou inibição de mais de 50% do crescimento das colônias em concentrações de azoxistrobina a partir de 1 mg/L, não atingindo, porém, 100% de inibição mesmo na concentração mais elevada. Por outro lado, o isolado P2-3 mostrou-se sensível ao fungicida, com total inibição em concentrações maior ou igual a 1 mg/L. (Figura 30).

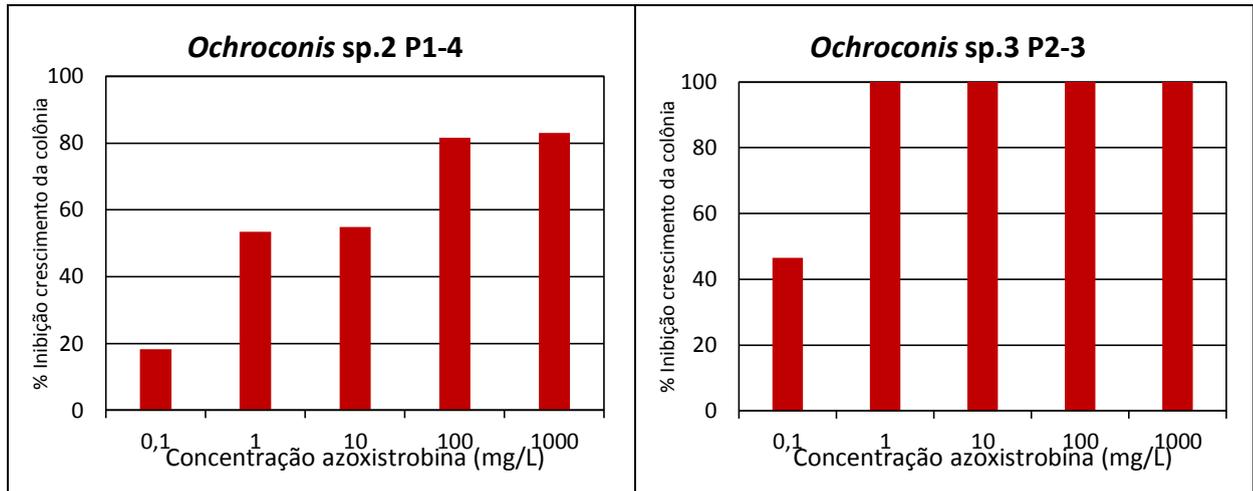


Figura 30 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com azoxistrobina para os isolados de *Ochroconis* sp.2 P1-4 e *Ochroconis* sp.3 P2-3.

Zheng et al. (2000) verificaram a ocorrência de *Venturia inaequalis* resistente ao fungicida do grupo químico das estrobirulinas, porém o sequenciamento não apresentou mutação no gene do citocromo b. Analisou-se então a ocorrência de heteroplasmia, uma mistura de mais de um tipo de genoma mitocondrial, ou seja, presença de duas populações diferentes de mitocôndrias, uma resistente contendo a mutação no gene citocromo b e garantindo o mecanismo alternativo de respiração para o fungo na presença do inibidor e outra população mitocondrial selvagem sem a mutação. Quando o isolado de *Venturia inaequalis* era cultivada em meio isento de inibidores a população de mitocôndrias selvagens era restabelecida, revertendo para um estado de homoplasmia, ou seja, a pressão de seleção é necessária para que a heteroplasmia predomine.

Fraaije et al. (2002) analisando isolados resistentes a estrobilurina de *Blumeria (Erysiphe) graminis f. sp. tritici* encontrou a mutação no códon 143 do gene mitocondrial b, em alguns isolados mutantes encontrou misturas de alelos, caracterizando a heteroplasmia. A resistência em indivíduos com a heteroplasmia nem sempre é estável quando mantida em ausência de seleção. O alelo A143 aumenta em frequência média de 2,2 a 58% nas gerações que sofrem pressão de seleção.

Lesemann et al. (2006) trabalharam com isolados de *Podosphaera leucotricha*, que mostraram diferentes níveis de resistência a estrobirulina, variando de acordo a heteroplasmia, ou seja, a quantidade de mitocôndrias com mutação esta correlacionada a resistência que será apresentada. Quanto maior o número de mitocôndrias mutantes, maior a resistência no fungo.

Serão necessários mais testes com todos os isolados que apresentaram mistura de alelos no eletroferograma, para confirmar a hipótese de heteroplasmia nos isolados de *Mycosphaerella thailandica* e nos isolados dos gêneros *Zasmidium* e *Ochroconis*.

Amil et al. (2002), avaliaram isolados de *Micosphaerella fijiensis* da Costa Rica e identificaram populações sensíveis localizadas em propriedades cercadas por populações resistentes a azoxystrobina, o que defende a possibilidade de reestabelecimento de populações sensíveis em áreas com a presença de populações resistentes. No presente estudo foram encontrados isolados com diferentes níveis de tolerância à estrobirulina para *M. thailandica* e *Zasmidium* spp, indicando também ser possível o restabelecimento de populações sensíveis na região do Vale do Ribeira.

### 5.4.3 Sensibilidade a propiconazol e sequenciamento do gene CYP51

Houve variabilidade na sensibilidade ao propiconazol entre os isolados das diferentes espécies de fungos estudados (Tabela 7).

Tabela 7 – Ocorrência de mutação no gene CYP51 e sensibilidade a propiconazol de fungos isolados de bananeira com sintomas de Sigatoka.

Isolado	Identificação	Classificação
RG1-4	<i>M. musicola</i>	Sensível acima de 0,1 mg/L
SB5-2	<i>M. fijiensis</i>	Sensível acima de 0,1 mg/L
SB5-3	<i>M. fijiensis</i>	Sensível abaixo de 0,1 mg/L
P1-1	<i>M. thailandica</i>	Sensível a 1 mg/L
P1-7	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 1 mg/L
M3-6	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 0,1 mg/L
SB1-6	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 1 mg/L
SB2-1	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 0,1 mg/L
EL1-8	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 0,1 mg/L
SB6-2	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 1 mg/L
P2-2	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 0,1 mg/L
M4-1	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 0,1 mg/L
M5-3	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 1 mg/L
SB6-3	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 0,1 mg/L
EL2-3	<i>M. thailandica</i>	Sensível acima de 1 mg/L
M2-1	<i>M. musae</i>	Sensível acima de 0,1 mg/L
EL1-5	<i>Zasmidium</i> sp.1	Sensível acima de 10 mg/L
RG2-8	<i>Zasmidium</i> sp.1	Sensível acima de 10 mg/L
P2-5	<i>Zasmidium</i> sp.1	Sensível acima de 1 mg/L
P2-6	<i>Zasmidium</i> sp.2	Sensível acima de 0,1 mg/L
P1-4	<i>Ochroconis</i> sp.2	Sensível abaixo de 0,1 mg/L
P2-3	<i>Ochroconis</i> sp.3	Sensível acima de 10 mg/L

Os dois isolados de *M. fijiensis* e o de *M. musicola* apresentaram inibição de crescimento acima de 50% em concentrações igual ou maior que 1 mg/L do fungicida. Em comparação à estrobilurina, foi necessária uma concentração 10 vezes maior do triazol para a obtenção do mesmo efeito sobre *M. fijiensis* (Figura 31).

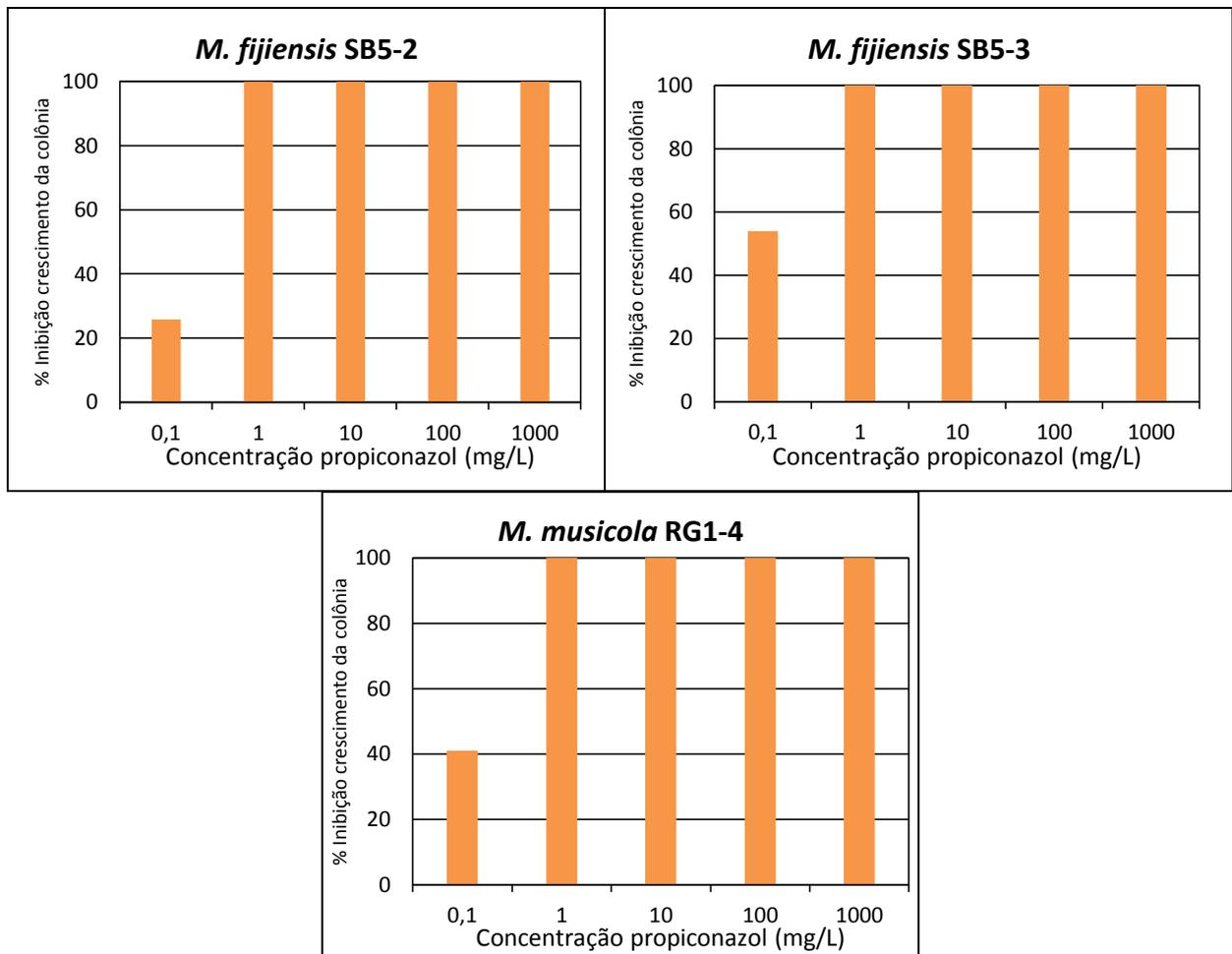


Figura 31 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com propiconazol para os isolados de *Mycosphaerella fijiensis* SB5-2 e SB5-3 e *M. musicola* RG1-4.

Cañas-Gutiérrez et al. (2009) classificaram isolados de *M. fijiensis* como sensíveis ao propiconazol aqueles que apresentaram  $DL_{50}$  entre 0,029 a 0,047 mg/L; medianamente tolerantes entre 0,225 a 0,427 mg/L e tolerantes a partir de 1 mg/L. Salas (2015) avaliando a sensibilidade de isolados de *M. fijiensis* em algumas localidades da Costa Rica não encontrou valores de  $DL_{50}$  maiores que 0,0035 mg/L. Em trabalho de Bolaños et al. (2012), os valores de  $DL_{50}$  variaram de 0,0001 a 0,95 mg/L, havendo correlação positiva entre o número de aplicações e os valores de  $DL_{50}$ , indicando que a pressão de seleção propiciou o surgimento de resistência ao propiconazol. Aguirre (2016), analisando isolados de *M. fijiensis* de vários países, encontrou na Costa Rica, Colômbia e Filipinas, países com históricos de uso intensivo de fungicidas para o controle da Sigatoka negra, isolados com  $DL_{50}$  para propiconazole de até 18,4, 13,6 e 12,5 mg/L, respectivamente. A comparação dos resultados para *M. fijiensis* e *M. musicola* do presente estudo com os da literatura não indicam a ocorrência de resistência elevada aos triazóis, pois a  $DL_{50}$  observada se situou entre 0,1 e 1,0 mg/L. Entretanto, para

este grupo de fungicidas, um maior detalhamento do grau de sensibilidade utilizando concentrações intermediárias entre 0,1 e 1 mg/L seria desejável.

De acordo com o observado no trabalho de Gomes et al. (2014), a DL<sub>50</sub> ao tebuconazole variou de 0,02 a 1,39 mg/L para 45 isolados de *M. fijiensis* de diferentes regiões do Brasil coletados em 2008 e 2009, incluindo alguns do Vale do Ribeira, SP. Embora a metodologia de avaliação da sensibilidade *in vitro*, que foi de ensaio em placa de microtitulação, e o princípio ativo tenham sido distintos em relação ao presente estudo, os resultados indicam que a sensibilidade do fungo a triazóis não sofreu forte alteração nos últimos 10 anos.

O sequenciamento do gene CYP51 mostrou a presença de mutações nos três isolados de *M. musicola* e *M. fijiensis*. O isolado RG1-4 de *M. musicola* apresentou as mutações A381G e Y463H. Os isolados de *M. fijiensis* SB5-2 e SB5-3 apresentaram as mutações G462D e Y463H, respectivamente (Tabela 8). Estas mutações já haviam sido relatadas para *M. fijiensis* em isolados com sensibilidade reduzida a triazóis (CAÑAS-GUTIÉRREZ et al., 2009; AGUIRRE, 2016). Cañas-Gutiérrez et al. (2009) detectaram as combinações de mutações Y136F/Y463H e A313G/Y463H nos isolados com maior tolerância ao propiconazol. Segundo Aguirre (2016), as mutações diretamente correlacionadas à resistência a triazóis são A313G, Y136F, H380N, Y463D e D460V. A inexistência das mutações A313G e Y136F nos isolados de *M. musicola* e *M. fijiensis* do presente estudo provavelmente explicam a sensibilidade destes ao propiconazol. Por outro lado, a pré-existência das demais mutações alerta para o risco iminente de surgimento de cepas com alta resistência a este grupo de fungicidas.

Tabela 8 – Mutações no gene CYP51 e sensibilidade a propiconazol de fungos isolados de bananeira com sintomas de Sigatoka. Códon e aminoácidos em vermelho indicam mutações em relação às sequências de isolados sensíveis (selvagens) das espécies *M. musicola* (CBS 116634) e *M. fijiensis* (CIRAD86).

Isolado	Identificação	gene <i>CYP51</i>					
		códon/aminoácido					
		136	313	381	461	462	463
RG1-4	<i>M. musicola</i>	TAC	GCT	GGC	TAC	GGC	CAT
		Y	A	A>G	Y	G	Y>H
SB5-2	<i>M. fijiensis</i>	TAC	GCT	GCT	TAC	GAC	TAT
		Y	A	A	Y	G>D	Y
SB5-3	<i>M. fijiensis</i>	TAC	GCT	GCT	TAC	GGC	GAT
		Y	A	A	Y	G	Y>D

As mutações A381G e Y463H de *M. musicola* e G462D e Y463D de *M. fijiensis* foram relatadas pela primeira vez no Brasil no presente estudo. Brito (2015) relatou a

ocorrência da mutação Y461N em isolados de *M. musicola* tolerantes a triazóis oriundos do município de São João da Aliança, GO.

Os iniciadores desenvolvidos neste estudo para o gene *CYP51* amplificaram somente para as espécies *M. fijiensis* e *M. musicola*. Desta forma, não foi possível inferir correlações entre a sensibilidade *in vitro* dos isolados das demais espécies e seus genótipos. Novos iniciadores baseados em regiões mais conservadas do gene *CYP51* precisarão ser desenvolvidos, uma vez que sequências deste gene para as demais espécies estudadas não estão disponíveis.

O isolado de *M. musae* apresentou uma tolerância maior em comparação a *M. fijiensis* e *M. musicola*. Apesar da  $DL_{50}$  do isolado de *M. musae* estar entre as concentrações de 0,1 a 1 mg/L, este ainda apresentou crescimento de colônias pequenas até na concentração de 10 mg/L (Figura 32).

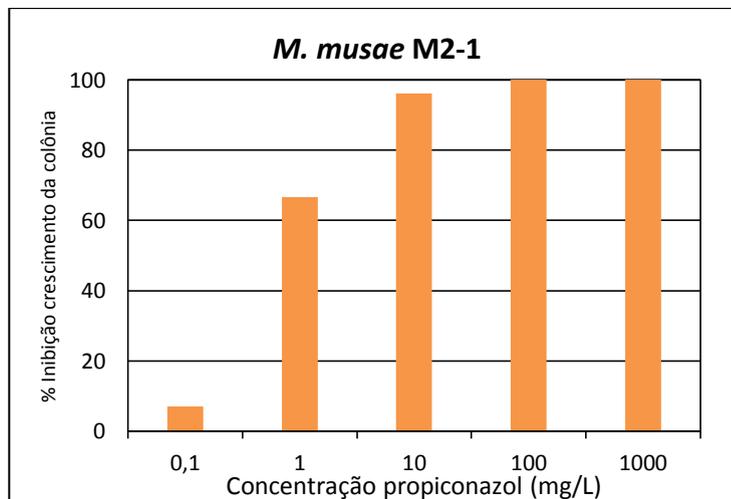


Figura 32 – Inibição do crescimento micelial em teste de sensibilidade *in vitro* com propiconazol para isolado de *M. musae* M2-1.

Os isolados de *M. thailandica* podem ser divididos em dois grupos de tolerância ao fungicida propiconazol, sendo de baixa tolerância os isolados P2-2, P1-1, SB2-1, SB6-3, M3-6, M4-1 e EL1-8 todos com  $DL_{50}$  entre as concentrações de 0,1 a 1 mg/L (Figuras 33 e 34). Os demais isolados, SB1-6, P1-7, SB6-2, M5-3 e EL2-3 apresentaram alta tolerância ao ingrediente ativo propiconazol, se considerarmos os dados da literatura para a espécie *M. fijiensis* (GOMES, 2015), necessitando concentrações iguais ou maiores que 10 mg/L para uma inibição maior que 50% no crescimento de colônias (Figura 34).

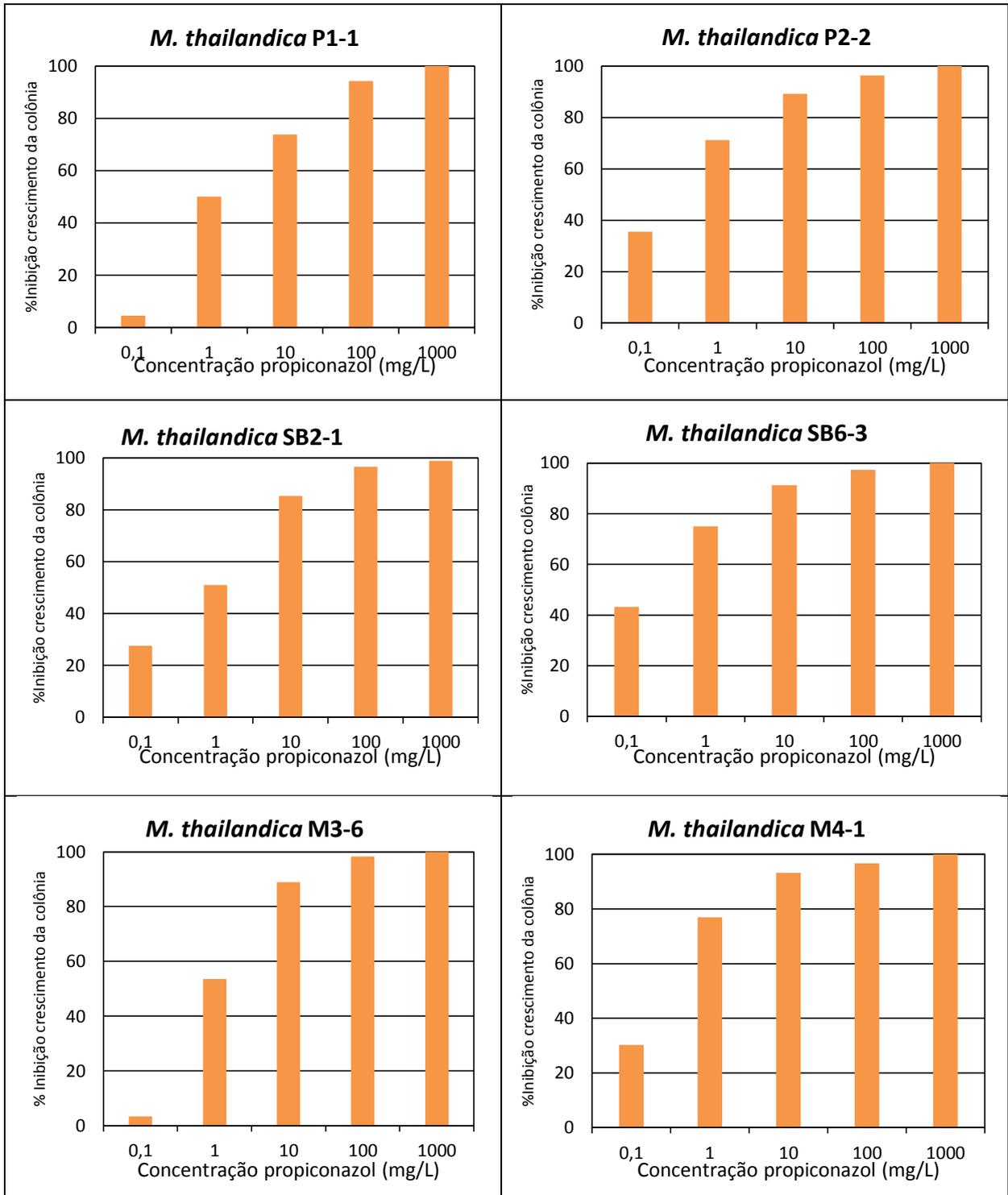


Figura 33 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com propiconazol para os isolados de *M. thailandica* P2-2, P1-1, SB2-1, SB6-3, M3-6 e M4-1.

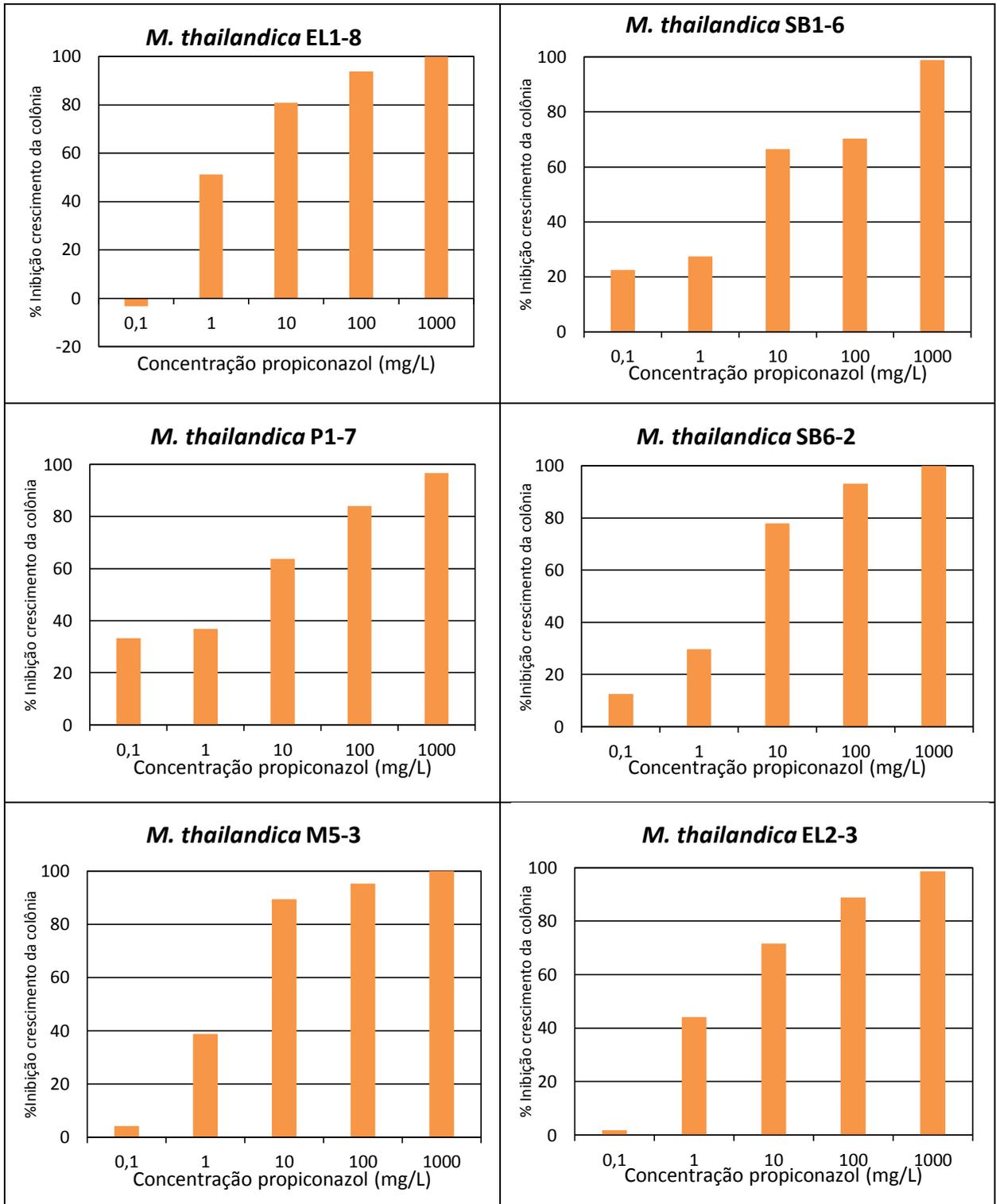


Figura 34 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com propiconazol para os isolados de *M. thailandica* EL1-8, SB1-6, P1-7, SB6-2, M5-3 e EL2-3.

Assim como nos testes para o benzimidazol e estrobilurina, os isolados de *Zasmidium* spp. apresentaram crescimento de uma camada de micélio, e não de colônias isoladas, nas placas contendo o fungicida propiconazol. Comparando o grau de desenvolvimento do micélio nas placas com o fungicida em relação à placa controle sem fungicida, os isolados apresentaram uma gradação de sensibilidade que variou do mais sensível (P2-6) ao mais resistente (EL1-5), ficando os isolados P2-5 e RG2-8 em posições intermediárias. Para os dois isolados mais resistentes (RG2-8 e EL1-5) foi possível observar pequeno crescimento micelial mesmo na concentração de 1.000 mg/L (Figura 35).

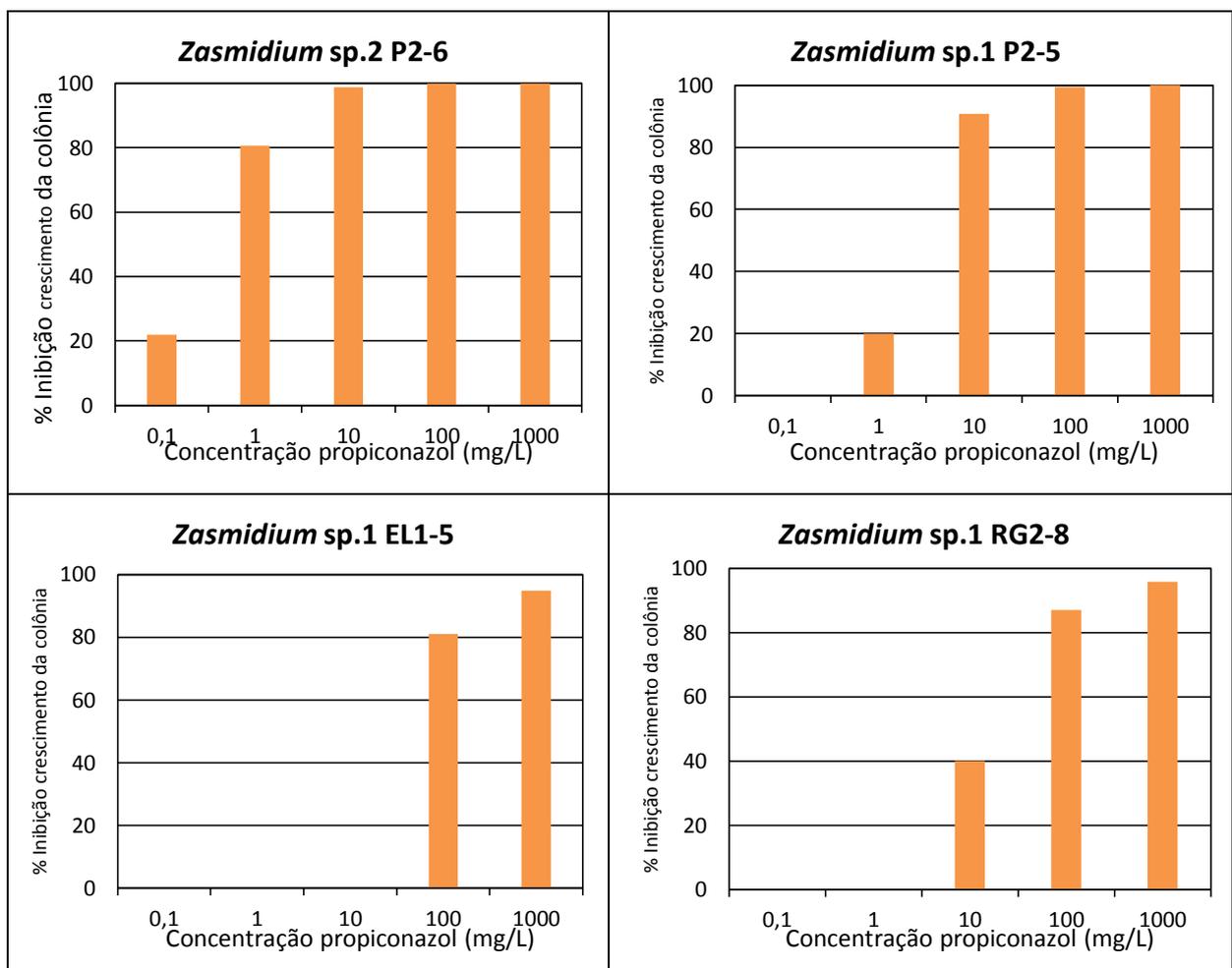


Figura 35 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com propiconazol para os isolados de *Zasmidium* sp.1 P2-5, EL1-5 e RG2-8 e *Zasmidium* sp.2 P2-6.

Os isolados do gênero *Ochroconis* demonstraram diferenças acentuadas no teste de sensibilidade com propiconazol. Enquanto o isolado P1-4 apresentou alta sensibilidade, com inibição maior que 50% desde a concentração 0,1 mg/L, o isolado P2-3 apresentou mais de 50% de inibição somente em concentração igual ou superior de 100 mg/L (Figura 36).

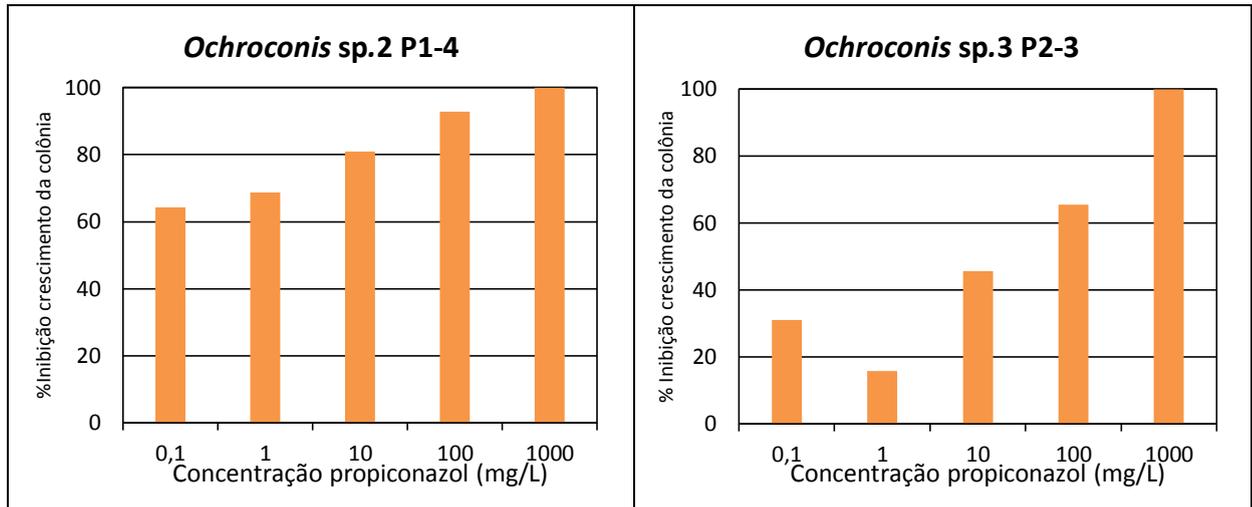


Figura 36 – Inibição do crescimento micelial em testes de sensibilidade *in vitro* com propiconazol para os isolados de *Ochroconis* sp.2 P1-4 e *Ochroconis* sp.3 P2-3.

Cools et al. (2013) afirmaram que as mutações no *CYP51* afetam a resistência a triazóis em diferentes níveis, dependendo do princípio ativo analisado. Dessa forma, a resistência cruzada em toda a classe é dificilmente encontrada. AGUIRRE (2016) encontrou inúmeras mutações no gene *CYP51* em isolados de *M. fijiensis* proveniente de diversos países, concluindo que essas contribuem para a resistência, mas não de maneira completa ao grupo dos triazóis, pois o nível de resistência parece depender de um equilíbrio entre a atividade catalítica da proteína *CYP51* e o ingrediente ativo do fungicida. Assim, a resistência a fungicidas do grupo químico dos triazóis pode ser manejada mediante o ajuste de doses ou da rotação do ingrediente ativo. Com essa informação, observar alta sensibilidade de um isolado a um ingrediente ativo do grupo dos triazóis, não é uma informação conclusiva. Recomenda-se que os isolados obtidos nesse estudo sejam analisados com diferentes ingredientes ativos, além de propiconazole.

## 6 CONCLUSÕES

Foi constatado que, além de *M. musicola* e *M. fijiensis*, outras espécies do mesmo gênero, *M. musae* e *M. thailandica*; e espécies dos gêneros *Zasmidium*. e *Ochroconis* também ocorrem em lesões de bananeiras com sintomas de Sigatoka. A determinação do papel destas espécies na doença Sigatoka ainda necessita da realização de testes de patogenicidade em folhas de bananeira.

O isolamento pelo método da descarga de ascósporos favoreceu a obtenção de uma maior diversidade de espécies de fungos associados a lesões de Sigatoka. Por outro lado, a aplicação deste método para a avaliação da resistência a fungicidas, conforme preconizado pelo FRAC, é comprometida justamente por não garantir que os ascósporos observados sejam somente das espécies *M. musicola* ou *M. fijiensis*.

Apesar do número reduzido de isolados avaliados, resistência a benzimidazol e sensibilidade reduzida a estrobilurina foram observadas para *M. musicola*, paralelamente à presença de mutações nos genes da beta-tubulina e citocromo oxidase b mitocondrial, o mesmo não tendo sido observado para *M. fijiensis*. Estas diferenças podem explicar a maior dificuldade no controle da Sigatoka amarela relatada por alguns bananicultores do Vale do Ribeira.

Os isolados de *M. musicola* e *M. fijiensis* não apresentaram resistência ao propiconazol, entretanto, a presença de mutações no gene da CYP51 que junto com outras mutações ainda não detectadas podem resultar em resistência, alertam para esse risco iminente. As mutações A381G e Y463H de *M. musicola* e G462D e Y463D de *M. fijiensis* foram relatadas pela primeira vez no Brasil no presente estudo.

Este é o primeiro relato da presença de *M. thailandica* no Brasil, além da presença de mutações relacionadas às resistências ao benzimidazol e à estrobilurina nessa espécie. Embora a patogenicidade desta espécie à bananeira seja desconhecida, a elevada frequência de isolados resistentes a fungicidas com mutações subjacentes indicam que ela já deve estar sob pressão de seleção por período prolongado no Vale do Ribeira.

Os fungos dos gêneros *Zasmidium* e *Ochroconis* encontrados no presente estudo merecem estudos posteriores em função da resistência aos fungicidas observada em alguns de seus isolados.

## 7 REFERÊNCIAS

AGUIRRE, P. A. C. The origin, versatility and distribution of azole fungicide resistance in the banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis*. Thesis, Wageningen University, 2016.

ALBERTINI, C.; GRETT, M.; LEROUX, P. Mutations of the b-tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acutormis*. Pestic. Biochem. Physiol. v. 64, p. 17-23, 1999.

AMIL, A.; COOK, A.; STANGER, C.; KNIGHT, S.; WIRZ, M.; SHAW, M. Las dinámicas de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a estrobilurinas (Qol's) en Costa Rica. In: Acorbat. Memorias XV reunión. Cartagena de Indias, Colombia. 2002. Medellín. Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA, 2002.

ARAÚJO, A. G.; BORGES, A. D. V.; SOARES, J. D. R.; RODRIGUES, F. A.; PASQUAL, M.; ROCHA, H. S.; ASMAR, S. A.; CORDEIRO, Z. J. M.; SILVA, S. O. 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, v. 8, p. 1200-1209, 2014.

ARZANLOU, M.; GROENEWALD, J. Z.; FULLERTON, R. A.; ABELN, E. C. A.; CARLIER, J.; ZAPATER, M-F.; BUDDENHAGEN, I. W.; VILJOEN, A.; CROUS, P. W. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. Persoonia, v. 20, p. 19-37, 2008.

AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., STRUHL, K. Short Protocols in Molecular Biology, 3<sup>rd</sup> Ed. New York: John Wiley and Sons Inc, 1997.

BOLAÑOS, L. M.; ORTIZ, D. T.; MACIEL, J. C. R.; AGUILERA, A. M.; ÁNGEL, D. N.; FLORES, J. I. C.; SÁNCHEZ, D. M.; DIAZ, C. N.; AGUAYO, G. S. Resistencia a fungicidas en poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis* del sureste Mexicano. Agrociencia, v. 46, p. 707-717, 2012.

BOLFARINI, A. C. B. Estudos epidemiológicos e moleculares da Sigatoka-negra na cultura da banana – Polo Regional da APTA - Vale do Ribeira, Laboratório de Sanidade Animal e Vegetal, 2012. 50 f. Relatório de Estágio Curricular Profissionalizante para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo, Campus Experimental de Registro, Universidade Estadual Paulista, Registro, 2012.

BRITO, F. S. D. Diversidade genética de populações de *Mycosphaerella musicola* e caracterização do efetor LYSM em *Mycosphaerella graminicola*. 2015. 169 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

CAÑAS-GUTIÉRREZ, G. P.; PATIÑO, L. F.; RODRIGUEZ-ARANGO, E.; ARANGO, R. Molecular characterization of benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia. *J. Phytopathology*, v. 154, p. 403–409, 2006.

CAÑAS-GUTIÉRREZ, G. P.; ANGARITA-VELÁSQUEZ, M. J.; RESTREPO-FLÓREZ, J. M.; RODRÍGUEZ, P.; MORENO, C. X.; ARANGO, R. Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, v. 65, p. 892-9, 2009.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, v. 91, p. 553-556, 1999.

CAVALCANTE, M. J. B.; SÁ, C. P.; GOMES, F. C. R.; GONDIM, T. M. S.; CORDEIRO, Z. J. M.; HESSEL, J. L. Distribuição e impacto da sigatoka-negra na bananicultura do estado do Acre. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 544-547, 2004.

COOLS, H. J.; HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathology*, v. 62, p. 36-42, 2013.

CORDEIRO, Z. J. M. Aspectos gerais e diferenças entre sigatoka amarela e negra da bananeira. *Simpósio Brasileiro sobre Bananicultura*, 4, 1998. Jaboticabal. Anais, 2001. p 552.

CROUS, P. W. Taxonomy and phylogeny of the genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Fungal Diversity*, v. 38, p. 1-24, 2009.

CROUS, P. W. *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of *Eucalyptus*. *Mycologia Memoirs*, v. 21, p. 1-170, 1998.

CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; PONGPANICH, K.; HIMAMAN, W.; ARZANLOU, M.; WINGFIELD, M. J. Cryptic speciation and host specificity among *Mycosphaerella* spp. occurring on Australian *Acacia* species grown as exotics in the tropics. *Stud. Mycol.*, v. 50, p. 457-469, 2004.

DAVIDSE, L. C.; ISHII, H. Biochemical and molecular aspects of the mechanisms of action of benzimidazoles, N-phenylcarbamates and N-phenylformamidoximes and the mechanisms of resistance to these compounds in fungi. In: LYR, H. (Ed). *Modern Selective Fungicides*. 2nd edition. Verlag: Berlin, 1995, p.305-322.

DELYE, C.; LAIGRET, F.; CORIO-COSTET, M. F. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, a "recalcitrant" fungus. *Current Genetics*, v. 34, p. 399-403, 1998.

ESSOH, J. N.; RIEUX, A.; ZAPATER, M. F.; MEHL, A.; RAVIGNÉ, V.; CARLIER, J.; BELLAIRE, L.de L. A more reliable biological method to assess fungicide resistance in *Mycosphaerella fijiensis* une method biologique plus performante pour evaluer la resistance aux fongicides chez *Mycosphaerella fijiensis*, XX Reunião Internacional da Associação para a Cooperação em Pesquisa e Desenvolvimento Integral das Musáceas (Bananas e Plátanos), Fortaleza/CE. Acorbat, 2013.

FAO – Food and Agriculture Organization. *Crop water management: Banana*, 2002. Disponível em: < <http://www.fao.org/ag/aGL/aglw/cropwater/banana.stm>.> Acesso em: 30 jun. 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). *FAOSTAT: Produção*. Roma, 2013. Disponível em:< <http://www.revistacampoenegocios.com.br/brasil-e-o-terceiromaior-produtor-de-banana/>> Acesso em:07 NOV. 2016.

FERRARI, J. T.; NOGUEIRA, E. M. C. Como identificar e combater a sigatoka negra da bananeira. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/Sigatoka/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Sigatoka/index.htm)>. Acesso em: 13 set. 2017.

FOURÉ, E. Stratégies de lutte contre la cercosporiose noire des bananiers et plantains provoquée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. L'avertissement biologique au Cameroun. Evaluation des possibilités d'évaluation. Fruits, v. 43, p. 269-274, 1988.

FOURÉ, E. Leaf spot disease of banana and plantain caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis*. In: International network for the improvement of banana and plantain. [S.l.: s.n.], 1994. p. 47-53.

FRAAIJE, B. A.; BUTTERS, J. M.; COELHO, J. M.; JONES, D. R.; HOLLOMON, D. W. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative allele- specific real-time PCR measurements with fluorescent dye SYBR Green I. Plant Pathology, v. 51, p. 45-54. 2002.

FRAC – Fungicide Resistance Action Committee. Disponível em <<http://www.frac.info>> Acesso em: 05 de Março de 2016.

GASPAROTTO, L; PEREIRA, J. C. P.; HANADA, R. E.; MONTARROYOS, A. V. V. Sigatoka negra da bananeira. Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, 2006. 177 p.

GELMINI, G. A. Controle da Sigatoka Negra na cultura da bananeira: indicações básicas. Campinas: Coordenadoria de Defesa Agropecuária, 2004. 32 p.

GISI, U.; CHIN, K. M.; KNAPORA, G.; FÄRBER, R. K.; MOHR, U.; PARISI, S.; SIEROTSKI, H.; STEINFELD, B. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. Crop Protection, v. 19, p. 863-872, 2000.

GOMES, L. I. S.; BIBIANO, L. B. J.; SILVA, G. F.; HANADA, R. E.; MIZUBUTI, E. S. G. Baseline sensitivity of Brazilian *Mycosphaerella fijiensis* isolates to protectant and systemic fungicides. Tropical Plant Pathology, v. 39, p. 172-177, 2014.

GOMES, L. I. S.; DOUHAN, G. W.; BIBIANO, L. B. J.; MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. *G. Mycosphaerella musicola* identified as the only pathogen of the Sigatoka disease complex present in Minas Gerais State, Brazil. *Plant Disease*, v. 97, p. 1537-1543, 2013.

GOMES, L. I. S.; DOUHAN, G. W.; LEHNER, M. S.; BIBIANO, L. B. J.; MIZUBUTI. Yellow sigatoka epidemics caused by a panmitic population of *Mycosphaerella musicola* in Brazil. *Plant Pathology*, 2017 Set 21. [Epub ahead of print].

HALL, T. A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, v. 41, p. 95-98, 1999.

HOLLOMON D. W.; BUTTERS, J. A.; KENDALL, S. J. In: SJUT, V. J. Ed., *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals*. Springer, Berlin, 1997. p. 1-20.

IBGE. Produção agrícola municipal. Culturas temporárias e permanentes. *Prod. agric. munic.*, Rio de Janeiro, v. 40, p. 1-102, 2013.

IBGE/LSPA, Projeções do agronegócio. Projeções de longo prazo. Brasil 2016/17. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília,. 8ª edição Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI, Agosto 2017.

ICICT. A controvérsia sobre o uso seguro de agrotóxicos. Grala Portela e Raíza Tourinho, janeiro 2016. Disponível <<https://www.icict.fiocruz.br/content/controv%C3%A9rsia-sobre-o-uso-seguro-de-agrot%C3%B3xicos>> Acesso em 20 ago. 2017.

IFOAM, 2007. Disponível em <https://www.ifoam.bio/> Acesso em 15 jul. 2017.

ISSA, E. A. Cercosporiose da bananeira. *O Biológico*, São Paulo, v. 19, p. 65-73, 1953.

JONES, R. D. The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. p.25-42. In: *Proceedings of 2nd International Workshop on Mycosphaerella Leaf Spot Disease of Bananas*, Costa Rica. 2002.

KOENRAADT, H.; SOMERVILLE, S. C.; JONES, A. L. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology*, v. 82, p. 1348–1354, 1992.

KÖLLER, W.; WILCOX, W. F. Evaluation of tactics for managing resistance of *Venturia inaequalis* to sterol demethylation inhibitors. *Plant Disease*, v. 83, p. 857-863, 1999.

LESEMANN, S. S.; SCHIMPKE, S.; DUNEMANN, F.; DEISING, H. B. Mitochondriale heteroplasmie für das cytochrom-b-gens kontrolliert die strobilurinresistenz des erregers des echten apfelmehtaus, *Podosphaera leucotricha* (ELL. & Ev.) E.S. Salmon. *Journal of Plant Diseases and Protection*, v. 113, p. 259-266, 2006.

MA, Z.; YOSHIMURA, M.; HOLTZ, B. A.; MICHAILIDES, T. J. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. *Pest. Manag. Sci.* v. 61, p. 449-457, 2005.

MANICA, I. *Fruticultura tropical 4. Banana*. Porto Alegre: Cinco Continentes, 1997. 485 p.

MARIN, D. H.; ROMERO, R. A.; GUZMAN, M.; SUTTON, T. B. Black Sigatoka an increasing threat to banana cultivation. *Plant Dis.*, v. 87, p. 208-222, 2003.

MARÍN, D. H.; ROMERO, R. A. *El Combate de la Sigatoka Negra*. Costa Rica: Corporación Bananera Nacional, 1992. 20 p. (CORBANA. Boletín, 4).

MATTHIESEN, M. L.; BOTEON, M. Análise dos principais polos produtores de banana no Brasil. Hortifruti/CEPEA, ESALQ, Piracicaba-SP, 2003.

MORAES, W. S. Fungos causadores de doenças foliares da bananeira (*Musa* spp.). In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 13, 2005, Registro, SP. Anais. Registro: Instituto Biológico, 2005. p. 17-26.

MCKAY, G. J.; COOKE, L. R. A PCR-based method to characterize and identify benzimidazole resistance in *Helminthosporium solani*. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 152, p. 371-378, 1997.

MORAES, W. S.; MENDONÇA, J. C.; FUKUDA, E.; MENDES, C. DA S.; LIMA, J. D. SANTOS, A. J. Dominância da Sigatoka-negra em bananais do Vale do Ribeira. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, p. 193. 2005b.

MORAES, W. S. et al. Behaviour of black sigatoka in banana plantations of the Ribeira Valley, São Paulo, Brazil. In: *Anais da XVII Reunião Internacional da Associação para a Cooperação em Pesquisas sobre Banana no Caribe e América Tropical (ACORBAT)*. Joinville, SC, Brazil: [s.n.], 2006. p. 656 661.

NGANDO, J. E.; RIEUX, A.; NGUIDJO, O.; PIGNOLET, L.; DUBOIS, C.; MEHL, A.; ZAPATER, M.-F.; CARLIER, J.; BELLAIRE, L. L. A novel bioassay to monitor fungicide sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, v. 71, p. 441-451, 2014.

OROZCO-SANTOS, M. Manejo Integrado de la Sigatoka-negra Del Plátano. Mexico, DF: INIBAP. Folheto Técnico, 1998. 95 p.

PEIXOUTO, Y. S.; BRAGANÇA, C. A. D.; ANDRADE, W. B.; FERREIRA, C. F.; HADDAD, F.; OLIVEIRA, S. A. S.; BRITO, F. S. D.; MILLER, R. N. G.; AMORIM, E. P. Estimation of genetic structure of a *Mycosphaerella musicola* population using inter-simple sequence repeat markers. *GMR Genetics and Molecular Research*. v. 14, p. 8046-8057, 2015.

PEREIRA, J. C. R.; GASPAROTTO, L.; COELHO, A. F. da S.; URBEN, A. F. Ocorrência da Sigatoka negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 23 (Supl.), p. 295. 1998 (Resumos).

PEREIRA, L. V.; CORDEIRO, Z. J. M.; FIGUEIRA, A. R.; HINZ, R. H.; MATOS, A. P. Doenças da bananeira. *Informe Agropecuário*, v. 20, p. 37-47, 1999.

PEREIRA, T. G.; MORAES, W.da S.; SOUSA, R. de M.; MALAVASI, L. G.; SILVA, S. H. M. G. Quantificação do inoculo de *Mycosphaerella fijiensis* em diferentes posições da folha na bananeira. UNESP, Registro, 2010. (Não publicado)

PÉREZ, L. V. Epidemiología de la Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) em Cuba. I. Prognóstico Bio-Climático de los Plátanos de los Tratamientos de Fungicidas en Bananos (*Musa acuminata* AAA). Revista Mexicana de Fitopatología 18, 15-26, 2000.

PÉREZ, L. V. Morfología, distribución, aspectos bioecológicos y lucha contra *Mycosphaerella musicola* Leach, agente causal de la sigatoka de los plátanos. Tese (Doutorado em Ciências Agrícolas) – Instituto Superior de Ciências Agropecuarias de La Habana, 1980.

PÉREZ, L. V. Manual para el Manejo Integrado de Sigatoka-negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y Sigatoka-amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder) en Banano y Plátano. Habana, Cuba: Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, 1996. 49 p.

PLOETZ, R. La más importante enfermedad de la fruta más importante; la Sigatoka negra del banano. 1999.

PONT, W. Three leaf speckle diseases of the banana in Queensland. Queensl. J. Agr. Sci., v. 17, p. 273-309, 1960.

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

SALAS, J. E. M. Efecto de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* sobre la eficacia biológica de fungicidas sistémicos utilizados contra la sigatoka negra. Trabalho final de graduación presentado a la Escuela de Agronomía. Instituto tecnológico de Costa Rica sede regional San Carlos. 2015.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences USA., v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, A. C. F. Discussões sobre alimentos orgânicos no Brasil e outros países. Revista Faculdade Montes Belos (FMB), v. 7, p 53-63, 2014.

SANTOS, D. W.; PADOVAN, A. C.; MELO, A. S.; GONÇALVES, S. S.; AZEVEDO, V. R.; et al. Molecular identification of melanised non-sporulating moulds: a useful tool for studying the epidemiology of phaeohyphomycosis. *Mycopathologia*, v. 175, p. 445–454, 2013.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry*, v. 354, p. 311-313, 2006.

SENHOR, R. F.; CARVALHO, J. N.; SOUZA, P. A. de; CAMPOS SILVA, M.; LUZIA da SILVA, F. Manejo integrado de Sigatoka negra. *Revista Verde (Mossoró-RN-Brasil)*, v. 4, p. 7-20, 2009.

SIEROTZKI, H.; PARISI, S.; STEINFELD, U.; TENZER, I.; POIREY, S.; GISI, U. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science*, v. 56, p. 833–841, 2000.

SOUSA, B. S. Investigação do potencial ansiolítico de Magnésio e Vitamina B6 em uma única administração em humanos. 2013. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

STAHEL, G. The banana leaf speckle in Surinam caused by *Chloridium musae* nov. spec. and another related banana disease. *Tropical Agriculture*, v. 14, p. 42-44, 1937.

STOVER, R. H. Banana, plantain and abaca disease. Washington, USA, 1972. 316 p.

STOVER, R. H. Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella musicola*: associated Ascomycetous fungi. *Canadian Journal of Botany*, v. 41, p. 1481-1485, 1963.

STOVER, R. H. *Mycosphaerella musae* and *Cercospora* “non-virulentum” from Sigatoka leaf spots are identical. *Fruits*, v. 49, p. 187-190, 1994.

STOVER, R. H. Sigatoka leaf spots of banana and plantains. *Tropical Agriculture. Research Services*, v. 64, p. 750-756, 1980.

STOVER, R. H. The effect of temperature on ascospore germ tube growth of *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Fruits*, v. 38, p. 625-628, 1983.

STOVER, R. H.; SIMMONDS, N. W. *Bananas*. 3rd Edition. Wiley, 1987. 468 p.

STOVER, R. H. The *Mycosphaerella* species associated with banana leaf spots. *Trop. Agric. Trin.*, v. 46, p. 325- 331, 1969.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

UCHÔA, C. N. Estudos epidemiológicos e diagnose molecular da Sigatoka-negra. Lavras. 2010. 106 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - UFLA, Lavras, 2010.

VICENTE, L. P. Morfologia de las espécies de *Mycosphaerella* associadas a manchas de las hojas em *Musa* ssp. *Fitosanidad, Cuba*, vol. 6, p. 3-9, 2002. <https://es.slideshare.net/miguelangelcastano90/mycosphaerella-fijiensis-asociada-a-las-manchas-de-las-hojas-del-platano>

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKI, J. J.; WHITE, T. J (Ed.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York, 1990. p. 315-322

ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas, Palestra, Departamento de Fitopatologia, UFV, 2010. Disponível em <<http://www.summanet.com.br/summanet-site/congressos/2010/palestras/p14.htm>> Acesso em 15 mar. 2016.

ZHENG, D.; OLAYA, G.; KÖLLER, W. Characterization of laboratory mutants of *Venturia inaequalis* resistant to the strobilurin-related fungicide kresoxim-methyl. *Curr. Genet.*, v. 38, p. 148-155, 2000.

**ANEXO A – QUESTIONÁRIO REALIZADO COM PRODUTORES,  
AVIAÇÃO AÉREA E CONSULTORES.**

**Levantamento das populações de *Mycosphaerella spp.* em bananais comerciais do  
Vale do Ribeira (SP) visando avaliação da resistência a fungicidas**

**Aluna: JULIA ROSSI  
MALIMPENSA**

**Orientador: Dr. Ricardo Harakava (APTA - Instituto Biológico)**

**Co-orientador: Dr. Wilson da Silva Moraes (APTA Vale do  
Ribeira)**

Nome do Proprietário: \_\_\_\_\_

Telefone Fixo: (    ) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_                      Telefone Celular: (    ) \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

E-mail: \_\_\_\_\_

Localização da propriedade: \_\_\_\_\_

Tempo de cultivo de banana: \_\_\_\_\_

Variedade cultivada (A): \_\_\_\_\_ Área cultivada: \_\_\_\_\_

Variedade cultivada (B): \_\_\_\_\_ Área cultivada: \_\_\_\_\_

Outras variedades: \_\_\_\_\_ Área cultivada: \_\_\_\_\_

**PRINCIPAL PROBLEMA FITOSSANITÁRIO:**

Sigatoka negra     Sigatoka amarela     Mal-do-Panamá     Broca     Trips   

Outro: \_\_\_\_\_

**DEFENSIVOS AGRÍCOLAS UTILIZADOS:**

Para **Sigatoka amarela**

(Fungicida/Dose): \_\_\_\_\_

Intervalo de aplicação: \_\_\_\_\_ Nº de aplicações/ano: \_\_\_\_\_

Desde quando: \_\_\_\_\_ Sequência de aplicação: \_\_\_\_\_

Para **Sigatoka negra**

(Fungicida/Dose): \_\_\_\_\_

Intervalo de aplicação: \_\_\_\_\_ Nº de aplicações/ano: \_\_\_\_\_

Desde quando: \_\_\_\_\_ Sequência de aplicação: \_\_\_\_\_

Quem recomenda a aplicação de fungicida? \_\_\_\_\_

Onde compra os fungicidas? \_\_\_\_\_

### TÉCNICA DE APLICAÇÃO DE FUNGICIDA UTILIZADA:

Como é feita a aplicação de fungicida?

( ) Avião ( ) Atomizador costal motorizado ( ) Atomizador tratorizado ( ) Axila da folha

Qual o volume de calda/Ha? \_\_\_\_\_

Se de avião, qual empresa: \_\_\_\_\_

Se de atomizador, como prepara a calda? \_\_\_\_\_

Como decide o momento da aplicação do fungicida? \_\_\_\_\_

Conhece a Técnica de Monitoramento da Sigatoka? ( ) Sim ( ) Não ( ) Ouviu falar

Se pratica a técnica de monitoramento, quem realiza? ( ) Agrônomo/Técnico

( ) Funcionário

Se Agrônomo/Técnico, identificá-lo: \_\_\_\_\_

Onde foi capacitado sobre a Técnica de Monitoramento? ( ) APTA Vale do Ribeira

( ) Outro

Em que circunstancia sentiu que o controle químico da Sigatoka não foi bem sucedido:

\_\_\_\_\_

Sabe que uso irracional/indevido do fungicida pode induzir o aparecimento de populações resistentes? ( ) Sim ( ) Não

Conhece algum bananicultor que esta com dificuldade de controlar a doença? Quem?

\_\_\_\_\_

Usa fungicida Protetor? ( ) Sim ( ) Não

Qual: \_\_\_\_\_ Quando? \_\_\_\_\_ Frequência \_\_\_\_\_



SECRETARIA DE  
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE  
**SÃO PAULO**  
TRABALHANDO POR VOCÊ