



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE
PERNAMBUCO**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de mestrado

Análise do risco de resistência de *Colletotrichum musae* ao tiofanato-metílico.

Anthony Carlos da Silva

Recife – PE

2023

ANTHONY CARLOS DA SILVA

**Análise do risco de resistência de *Colletotrichum musae* ao
tiofanato-metílico.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Orientador: Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara, Ph.D. (DEPA/UFRPE)

Co-orientador: Dr. Willie Anderson dos Santos Vieira (UNB)

RECIFE- PE

JULHO – 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S586a Silva, Anthony Carlos da Silva
Análise do risco de resistência de *Colletotrichum musae* ao tiofanato-metílico / Anthony Carlos da Silva Silva. -
2023.
49 f. : il.
- Orientador: Marcos Paz Saraiva Camara.
Inclui referências.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia,
Recife, 2024.
1. Benzimidazóis. 2. Musa spp.. 3. banana. 4. controle químico. 5. antracnose. I. Camara, Marcos Paz Saraiva, orient.
II. Título

ANÁLISE DO RISCO DE RESISTÊNCIA DE *Colletotrichum musae* AO TIOFANATO-METÍLICO.

ANTHONY CARLOS DA SILVA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 19/07/2023

ORIENTADOR(A):

Prof. Prof. Marcos Paz Saraiva Câmara, Ph.D. (UFRPE)

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Alexandre Sandri Capucho (UNIVASF)

Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

**RECIFE-PE
JULHO – 2023**

A meu pai Antonio Carlos Lopes da Silva, “Seu Garoto”
(*in memoriam*) e a minha mãe Ivaneide Cardoso da Silva,
“Dona Neide” por todo amor, apoio e incentivo durante
essa jornada.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida e pelo suporte para a realização deste trabalho.

Ao professor Marcos Câmara, pela orientação e confiança e pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os professores do PPGF/UFRPE pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

À Romildo, secretário do PPGF, quem sempre auxilia os alunos no que for possível.

A minha mãe e meu pai Ivaneide Cardoso e Antonio Carlos Lopes (*in memoria*) por toda a dedicação na minha criação, amor e carinho indescritível.

A meu irmão Johnny José por sempre me salvar nas situações de desespero.

Ao meu amor maior, Daianire Rocha pelo companheirismo e amizade a todo o momento.

A turma da 5ª série, Ana Gabriele e Ingrid Gomes Duarte e apoio durante todo o curso e amizade para TODA a vida, com vocês os dias ficam mais engraçados.

Aos integrantes do Laboratório de Micologia por compartilharem a rotina do dia-a-dia, a Willie Anderson pela coorientação, pelo conhecimento transmitido e pela enorme colaboração na realização desse trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a construção deste momento da minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	xi
GENERAL ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I.....	7
A cultura da banana	10
Doenças fúngicas da bananeira	11
A antracnose na banana e seu controle.....	12
Controle da antracnose na bananeira	13
Resistência de <i>C. musae</i> a fungicidas dos grupos Metil Benzimidazol Carbamato (MBC) e Análise de risco de surgimento de mutantes resistentes	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO II	21
ABSTRACT.....	23
INTRODUCTION	24
MATERIAL AND METHODS	25
RESULTS	29
DISCUSSION	31
ACKNOWLEDGMENTS	34
REFERENCES.....	35
CAPÍTULO III.....	47
CONCLUSÕES GERAIS	46

RESUMO GERAL

O Brasil é o quinto maior produtor de banana (*Musa* spp.), constituindo mais de 7 milhões de toneladas produzidas anualmente. Entretanto, problemas fitossanitários como a antracnose dos frutos causada por *Colletotrichum* spp. afeta a qualidade e limitam a exportação da fruta, impedindo o transporte de longa distância e a entrada nos mercados internacionais e com isso o uso de fungicidas acaba sendo necessário. Embora o tiofanato-metílico seja um fungicida freqüentemente utilizado em pomares de bananeiras brasileiras para controlar a mancha-da-Sigatoka, populações de *Colletotrichum* spp. Também estão expostas. O presente estudo tem como objetivo analisar o risco da utilização de tiofanato-metílico quanto ao surgimento populações resistentes de *Colletotrichum musae* ao princípio ativo, induzindo a produção de mutantes resistentes *in vitro* e investigando a estabilidade dessa resistência, com o uso de isolados provenientes de pomares comerciais de Estados do Brasil (Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Santa Catarina, and São Paulo). Componentes de adaptabilidade foram avaliadas, tais como taxa de crescimento micelial, produção e germinação de esporos e sensibilidade ao fungicida. Também foram avaliados componentes de patogenicidade e agressividade. Foi observado o surgimento de isolados mutantes em 7 dentre 60 isolados sensíveis testadas (32, AP3, CC4, CC11, DP10, SP9 e XV40), representando um risco de 11,7% de surgimento de mutantes resistentes ao tiofanato-metílico. Os valores de CE_{50} dos isolados mutantes resistentes variou de 114 a $492\mu\text{g ml}^{-1}$, sendo todos classificados como altamente resistentes ao tiofanato-metílico. Comparando os isolados sensíveis com os mutantes resistentes observou-se diferença nos valores de fator de resistência, com destaque ao isolado CC11 que apresentou o maior fator de resistência (5596), ou seja, apresentou a maior diferença de CE_{50} de quando era sensível para quando se tornou mutante. Todos os sete isolados tanto parentais quanto mutantes foram patogênicos a banana. Não houve diminuição significativa dos sintomas da antracnose em frutos tratados com o tiofanato-metílico quando comparado com os frutos não tratados. Não houve diferença significativa (teste t $P \geq 0,05$) entre os isolados mutantes e seus respectivos parentais sensíveis para nenhum dos componentes de adaptabilidade avaliado, o que indica que o incremento positivo na resistência ao fungicida não implica em diminuição da adaptabilidade. Este resultado demonstra que isolados mutantes resistentes são tão adaptados quanto os parentais sensíveis. Caso a utilização de fungicidas em campo seja frequente, isolados mutantes resistentes poderão predominar nas populações de *C. musae*. Nossos resultados oferecem subsídios para o desenvolvimento de estratégias de manejo eficientes de fungicidas para a antracnose no Brasil.

Palavras-chave: Benzimidazóis, *Musa* spp., banana, controle químico, antracnose.

GENERAL ABSTRACT

Brazil is the fifth largest producer of bananas (*Musa* spp.), accounting for over 7 million tons produced annually. However, phytosanitary problems such as fruit anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. affect the quality and limit fruit export, hindering long-distance transportation and entry into international markets. Although thiophanate-methyl is a fungicide frequently used in Brazilian banana orchards to control Sigatoka leaf spot, populations of *Colletotrichum* are also exposed. The present study aims to analyze the risk of using thiophanate-methyl regarding the emergence of resistant populations of *Colletotrichum musae* to the active ingredient, inducing the production of *in vitro* resistant mutants, and investigating the stability of this resistance using isolates from commercial orchards in Brazilian states (Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Santa Catarina, and São Paulo). Components of adaptability were evaluated, such as mycelial growth rate, spore production and germination, and sensitivity to fungicides. Components of pathogenicity and aggressiveness were also assessed. The emergence of mutant isolates was observed in 7 out of 60 tested sensitive isolates (32, AP3, CC4, CC11, DP10, SP9, and XV40), representing a 11.7% risk of emergence of thiophanate-methyl-resistant mutants. The EC₅₀ values of the mutant resistant isolates ranged from 114 to 492 µg ml⁻¹, all classified as highly resistant to thiophanate-methyl. Comparing sensitive isolates with resistant mutants, differences in resistance factor values were observed, with isolate CC11 standing out, presenting the highest resistance factor (5596), in other words, showing the greatest difference in EC₅₀ from when it was sensitive to when it became mutant. All isolates, both parental and mutant, were pathogenic to bananas. There was no significant reduction in anthracnose symptoms in fruits treated with thiophanate-methyl when compared to untreated fruits. There was no significant difference (t-test $P \geq 0.05$) between the mutant isolates and their respective sensitive parents for any of the assessed adaptability components, indicating that the positive increase in fungicide resistance does not imply a decrease in adaptability. This result demonstrates that resistant mutant isolates are as adapted as sensitive parents. If the use of fungicides in the field is frequent, resistant mutant isolates may predominate in *C. musae* populations. Our results provide support for the development of efficient management strategies for anthracnose in Brazil.

Keywords: Benzimidazoles, *Musa* spp., banana, chemical control, anthracnose.

CAPÍTULO I



Introdução Geral

ANÁLISE DO RISCO DE RESISTÊNCIA DE *Colletotrichum musae* AO TIOFANATO-METÍLICO.

INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da banana

A bananeira (*Musa* spp.), pertencente à família *Musaceae*, tem o seu centro de origem no continente asiático, sendo mundialmente cultivada, principalmente em regiões tropicais. É uma cultura presente em mais de 140 países, com área superior a 4 milhões de hectares e uma produção que ultrapassa 100 milhões de toneladas. Está entre as dez principais culturas produzidas em todo o mundo, com a produção concentrada em países como Índia (30 milhões de toneladas), China (11 milhões de toneladas), Indonésia, Brasil e Equador, correspondendo a 55,2% da produção mundial (FAO, 2021). É considerada, em alguns países, como uma das principais fontes de arrecadação e geração de emprego e renda para uma parte expressiva da população, contribuindo para o desenvolvimento das regiões envolvidas em sua (VIEIRA, 2011).

O Brasil é o quinto maior produtor mundial, produzindo cerca de 6,8 milhões de toneladas, em uma área cultivada de 478,765 mil hectares, o que corresponde a 25% do volume total da fruticultura brasileira. Dentre as regiões de destaque no cultivo, estão o Nordeste (34%) e o Sudeste (34%), com produção de 2.285.796 e 2.268.400 toneladas, respectivamente. Em seguida, estão as regiões Sul (15%), Norte (13%) e Centro-Oeste (4%), com 1.035.695, 883.184 e 291.249 toneladas, respectivamente (FAO, 2021). A região Nordeste se destaca na produção de banana no Brasil graças ao estado da Bahia, considerado o segundo maior estado produtor, perdendo apenas para o estado de São Paulo, com 1.073.343 toneladas, em uma área cultivada de 48,3 mil hectares. Outros estados de destaque são Minas Gerais e Santa Catarina, com 791.746 e 708.983 toneladas, respectivamente (IBGE, 2021).

A bananeira é uma planta monocotiledônea, herbácea, perene, com porte de dois a cinco metros, sendo que algumas variedades podem atingir quase oito metros de altura (FARBER *et al.*, 2014). Na evolução das bananeiras comestíveis, cruzamentos interespecíficos entre as espécies selvagens diploides *Musa acuminata* (genoma AA) e *Musa balbisiana* (genoma BB) originaram a maioria dos genótipos de bananeiras (SIMMONDS; SHEPHERD, 1955). Cada cultivar deve conter combinações variadas de genomas dessas espécies parentais, cujas combinações resultam os grupos diploides (AA, BB e AB), triploides (AAA, AAB e ABB) e tetraploides (AAAA, AAAB, AABB e AB BB) (COSTA, 2008). As principais variedades cultivadas do grupo AAA são Prata, Pacovan, Prata Anã, Nanica, Maçã, Mysore e

Cavendish (Banana D'Água ou Caturra), e do grupo AAB, Terra e D'angola (CARVALHO *et al.*, 2011).

Atualmente, existem cerca de 180 variedades de bananas, distribuídas mundialmente. No Brasil são produzidas 35 variedades, sendo a maior parte da produção destinada ao consumo *in natura*, embora seja também destinada ao processamento industrial, nos setores alimentício, farmacêutico e de cosméticos. Para o consumo *in natura*, as bananeiras do tipo Prata, Prata Anã e Pacovan são as mais plantadas (63%), seguidas por nanica (24%) e Maçã (3%). Já as bananeiras do tipo terra (plátanos) são consumidas fritas, cozidas ou assadas, e representam 9% da produção no Brasil. O restante (1%) corresponde a outros tipos de banana (EMBRAPA, 2015). A produção nordestina concentra-se nas variedades Prata e Pacovan, sendo que a Pacovan apresenta maior destaque nos estados do Ceará e Pernambuco, os quais atendem principalmente às capitais nordestinas. No sul da Bahia, encontra-se um polo de produção de Prata Anã, e no estado do Rio Grande do Norte, outro polo com a produção de Nanica e Grand Naine voltada para a exportação, principalmente para o mercado europeu (SENA, 2011).

Os fungos são os principais agentes responsáveis por doenças de pós-colheita em bananas. Em um estudo avaliando a presença de doenças em pós-colheita na cultura, foram identificadas diferentes espécies de fungos tanto em frutos maduros quanto verdes, incluindo *Colletotrichum musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *Penicillium* spp. e *Alternaria* spp. (MORAES; ZAMBOLIM; LIMA, 2006). *C. musae* foi relatado como sendo o agente primário causador de podridões nas frutas. Embora fatores como danos físicos resultantes de lesões mecânicas e desordens fisiológicas sejam significativos na redução da produtividade, danos causados por infecções de microrganismos são um fator limitante, principalmente as causadas por fungos (MAIA *et al.*, 2008).

Doenças fúngicas da bananeira

Dentre as principais doenças fúngicas que ocorrem na bananeira temos a sigatoka amarela (*Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton), sigatoka negra (*Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton) e mal-do-panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Smith) Sn. & Hansen) (CORDEIRO;MATOS; KIMATI, 2016). As doenças na pós-colheita da banana são um dos problemas que mais prejudicam a qualidade do fruto, com perdas que variam de 40 a 60% da produção. Nas doenças de pós-colheita destaca-se a podridão da coroa (*Cephalosporium* sp.; *Fusarium* spp.; *C. musae*; *Deighthoniella torulosa* e *Ceratocystis paradoxa*), e antracnose causada por *C. musae* (CORDEIRO;MATOS; KIMATI, 2016). A antracnose é relatada como a principal doença de pós-colheita, inviabilizando o transporte por

períodos mais longos e a aceitação do produto no destino final por conta dos sintomas característicos (NEGREIROS *et al.*, 2013; PRUSKY *et al.*, 2013).

A antracnose na banana

A antracnose representa um grave problema na pós-colheita de banana e está amplamente distribuída em todas as regiões produtoras desta fruta no mundo (CORDEIRO; MATOS, ; KIMATI, 2016; WARDLAW, 1972). A doença é caracterizada pela formação de lesões deprimidas, com formato irregular e coloração escura, as quais coalescem com o avanço da doença. Sob condições de alta umidade, é possível observar sobre as lesões uma massa mucilaginosa de coloração alaranjada formada sobre os acervulos, onde são encontrados os conídios. O cultivo da bananeira é favorecido pelo clima nas regiões tropicais e subtropicais pela predominância de altas temperaturas, precipitações bem distribuídas e elevada umidade do ar. Entretanto, essas condições também propiciam o desenvolvimento do fungo.

O principal impacto da doença se dá pela capacidade do fungo infectar os frutos ainda verdes, antes da colheita, permanecendo latentes ou quiescentes até o início da maturação. A infecção quiescente ocorre quando o patógeno infecta a planta, porém mantém seu nível metabólico baixo, não ocorrendo o surgimento dos sintomas da doença. Entretanto, algumas condições, como mudança ambiental, estresse nutricional ou estágio de maturação da planta, podem ativar os fatores de patogenicidade, resultando em parasitismo ativo nos tecidos do hospedeiro (PRUSKY *et al.*, 2013).

As condições ideais de temperatura e umidade para a ocorrência da antracnose estão em torno de 25-30 °C e 90 ± 5%, respectivamente. A germinação dos conídios ocorre na superfície de frutos verdes ou maduros, na presença de um filme de água, formando o apressório no período de quatro horas. A penetração se dá após 24-72 h, e os sintomas só aparecem na época de maturação dos frutos (AGRIOS, 2005). A antracnose, geralmente, mantém-se restrita ao pericarpo da fruta, raramente afetando a polpa. Porém, em condições de alta temperatura ou quando as frutas se encontram em estágio avançado de maturação, o fruto pode se tornar impróprio para o consumo, inviabilizando a exportação, transporte, embalagem e comercialização (OLIVEIRA; COELHO FILHO; COELHO, 2013).

Diferentes espécies do gênero *Colletotrichum* causam antracnose, incluindo *Colletotrichum chrysophilum* W.A.S. Vieira, W.G. Lima, M.P.S. Camara and V.P. Doyle, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc, *Colletotrichum karstii* Y.L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai, *C. musae*, *C. paxtonii* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. scovillei* Damm, P.F. Cannon & Crous, *C. siamense* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde, *C. theobromicola*

Delacr. e *C. tropicale* Rojas, Rehner & Samuels (DAMM et al., 2012; VIEIRA et al., 2017c). No entanto, *C. musae* é a espécie prevalente estando presente em todas as regiões produtoras DO MUNDO (PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003).

A sobrevivência do fungo ocorre, geralmente, nos restos vegetais das plantas, como pecíolos e folhas velhas, e nos vestígios florais dos cachos e brácteas. Os conídios são disseminados por respingos da água da chuva ou da irrigação por aspersão e pelo vento, para as flores e frutos novos (CORDEIRO;MATOS; KIMATI, 2016). Nas fases de colheita e pós-colheita é fundamental evitar ferimentos nos frutos. As práticas, incluindo o processo de retirada do cacho e lavagem dos frutos, requerem um manuseio extremamente cauteloso dos frutos, além de medidas rigorosas de assepsia, a fim de controlar a infecção quiescente, evitando infecções secundárias durante o armazenamento e transporte. Outro cuidado é na concentração de etileno, responsável pelo amadurecimento do fruto climatérico, uma vez que esse fito hormônio é produzido tanto pelo hospedeiro quanto pelo fitopatógeno (PLOETZ; THOMAS; SLABAUGH, 2003).

Controle da antracnose na bananeira na pós-colheita

Atualmente, os fungos em pós-colheita são controlados, principalmente, pela aplicação de fungicidas, por imersão ou por atomização dos frutos. Estes tratamentos atuam sobre patógenos em ferimentos ou sobre aqueles de infecção quiescente e possuem a grande vantagem de seu efeito residual (SENHOR *et al.*, 2009). Os sistemas de embalagem e transporte em condições refrigeradas também têm contribuído para a redução dos problemas com *C. musae* (CORDEIRO;MATOS; KIMATI, 2016).

Para o controle da antracnose na banana em pós-colheita, até o momento, apenas dois produtos são registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Os ingredientes ativos são imazalil e tiabendazol, pertencentes aos grupos químicos dos imidazóis e benzimidazóis, respectivamente (MAPA, 2019). Dentre os benzimidazóis registrados para a cultura da bananeira o tiofanato-metílico é registrado para controle da sigatoka amarela, porém em campo o fungicida tem ação a todos os patógenos que estão presentes e não só ao *Pseudocercospora musae*. Desta forma o fungicida pode selecionar populações resistentes não só do organismo alvo como de qualquer outro que esteja no campo. Embora não existam fungicidas registrados para aplicação em campo para controle da antracnose no Brasil, já foi verificada surgimento de populações de *C. musae* resistentes ao tiofanato-metílico em bananeiras no Brasil (VIEIRA *et al.*, 2017a).

Resistência de *C. musae* a fungicidas dos grupos Metil Benzimidazol Carbamato (MBC) e Análise de risco de surgimento de mutantes resistentes

A análise de risco de resistência é um procedimento que envolve duas etapas distintas: a avaliação do risco de resistência e o gerenciamento do risco. Durante a avaliação, são examinadas a probabilidade de surgimento de resistência e suas possíveis consequências. Já no gerenciamento, são consideradas estratégias viáveis para prevenir ou retardar o surgimento da resistência, bem como a seleção e implementação de modificações apropriadas. No processo de avaliação do risco de resistência, inicialmente é feita uma avaliação do risco inerente com base nas características do patógeno e do fungicida em questão. Em seguida, é realizada a avaliação do risco não modificado, considerando o risco inerente quando o produto é aplicado sem restrições. No gerenciamento do risco de resistência, é tomada a decisão de aceitar ou não o risco não modificado. Caso seja considerado aceitável, o processo é concluído. Entretanto, se o risco não modificado for considerado inaceitável, são analisadas possíveis modificações para mitigar o risco. Caso sejam identificadas modificações apropriadas, a conclusão da análise de risco de resistência consistirá em uma estratégia de gerenciamento de resistência, que pode incluir uma ou mais modificações, a serem aplicadas durante o uso comercial do produto (EPPO, 2015).

O risco da resistência depende de vários fatores, alguns dos quais associados ao produto e outros ao patógeno. Esses fatores não necessariamente operam isoladamente e não se aplicam a todos os casos. Os fatores associados ao fungicida que podem favorecer o desenvolvimento de resistência incluem atividade persistente, modo de ação e facilidade de metabolismo. Aqueles associados às características dos patógenos alvo que podem favorecer o desenvolvimento de resistência podem incluir, ciclo de vida curto/muitas gerações, alta fertilidade/distribuição generalizada da progênie, alta variabilidade genética (incluindo potencial para mutação espontânea), existência de um mecanismo na praga para metabolizar um gama de substâncias ativas, existência de resistência cruzada e alta aptidão de cepas resistentes. O risco de resistência ao produto químico pode ser aumentado por certas condições de utilização. Este risco agrônomo afeta a pressão de seleção sobre o desenvolvimento da resistência e é influenciado pelas características particulares da cultura, da área geográfica em que o produto é aplicado e do padrão de uso (EPPO, 2015). Os fatores que influenciam o risco agrônomo incluem, cultura amplamente cultivado com rotações curtas, monocultura ou cultivo contínuo, técnicas de aplicação, dependência exclusiva de uma única substância ativa ou necessidade de grande número de aplicações ou longa exposição para obtenção do controle, como é o caso dos fungicidas MBC (FRAC, 2019).

Os fungicidas MBCs, conhecidos como grupo químico dos benzimidazóis (benomil, carbendazim, tiabendazol e tiofanato-metílico). Esses fungicidas inibem a polimerização da β -tubulina necessária para a formação de microtúbulos durante a divisão celular, matando assim as células fúngicas devido à falha mitótica (DAVIDSON *et al.*, 2006; DELEN, N; TOSUN, N, 2004; RODRIGUES, 2006).

O mecanismo de resistência aos fungicidas benzimidazóis tem sido examinado em diferentes fungos fitopatogênicos (DAVIDSE, 1986) e, geralmente, está associada a mutações nos códons 6, 50, 167, 198, 200 e 240 do gene da β -tubulina (MA; MICHAILIDES, 2005). As mutações mais encontradas ocorrem nos códons 198 e 200, dos quais foram verificados níveis diferenciados de resistência. Na β -tubulina, a alta resistência das espécies de *Colletotrichum* aos fungicidas MBC é geralmente atribuída à mutação E198A/K ou à substituição do ácido glutâmico (E) por alanina (A) ou lisina (K) no códon 198 (GAG para GCG ou AAG, respectivamente). A resistência e resistência moderada são geralmente atribuídas à mutação F200Y ou substituição da fenilalanina (F) por tirosina (Y) no códon 200 (TTC para TAC) na β -tubulina (BANNO *et al.*, 2008; BARALDI *et al.*, 2003; KOENRAADT; SOMERVILLE; JONES, 1992; MA; MICHAILIDES, 2005; MA; YOSHIMURA; MICHAILIDES, 2003; MCKAY *et al.*, 1998). Em isolados de *C. gloesporioides* expostos ao benomil e *C. cereale* expostos ao tiofanato-metílico, foram detectadas mutações pontuais no códon 198, gerando isolados resistentes e altamente resistentes, respectivamente, e no códon 200, gerando isolados moderadamente resistentes (CHUNG *et al.*, 2010; PERES *et al.*, 2004; YOUNG *et al.*, 2010). Já em isolados de *C. musae*, observou-se a mutação no códon 200, convertendo o aminoácido fenilalanina em tirosina na região β -tubulina causando resistência e resistência moderada ao fungicida (GRIFFEE, 1973; VIEIRA *et al.*, 2017b).

A ocorrência de mutação em um ou poucos genes que conferem características importantes pode causar alterações na adaptabilidade do isolado resistente. A adaptabilidade é um conceito que pode ser definido como a habilidade de uma linhagem específica em se desenvolver, reproduzir e sobreviver quando comparada a outra linhagem exposta às mesmas condições ambientais (HAWKINS; FRAAIJE, 2018; ISHII, 2015). Após a emergência de indivíduos resistentes dentro de uma população, o aumento na frequência desses indivíduos ocorrerá apenas se eles demonstrarem uma adaptabilidade sólida, ou seja, uma capacidade competitiva notável (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2001). Em muitos casos, isolados resistentes podem ter menor adaptabilidade que isolados sensíveis, levando ao comprometimento da dominância na população na ausência da pressão de seleção do fungicida. Alternativamente, isolados resistentes podem apresentar características semelhantes às de

isolados sensíveis e persistirem durante longo período, mesmo sem utilização dos fungicidas (MA; MICHAILIDES, 2005). A adaptabilidade é influenciada por vários fatores, como a capacidade de infecção, a velocidade de colonização do tecido hospedeiro, a esporulação, a capacidade de sobrevivência e, especialmente, a capacidade de competir com indivíduos sensíveis na ausência de fungicidas (GHINI, R.; KIMATI, H., 2000). Esses fatores desempenham um papel fundamental no sucesso de um indivíduo resistente dentro de uma população.

A adaptabilidade é amplamente determinada pelo gene (ou genes) que sofreu mutação e resultou em resistência. Se o gene estiver envolvido na competitividade, o mutante terá uma baixa adaptabilidade; caso contrário, sua adaptabilidade permanecerá inalterada. A adaptação do mutante está intimamente relacionada ao modo de ação do fungicida, e mutantes altamente adaptados têm maior probabilidade de surgir em resposta a determinados princípios ativos (SILVA JUNIOR; BEHLAU, 2018).

Testes de adaptabilidade em laboratório devem envolver ensaios como taxa de crescimento e grau de esporulação *in vitro* e patogenicidade/virulência em plantas hospedeiras. Falhas ou reduções graves nestas variáveis dos isolados resistentes sugerem que essa resistência pode não resultar em problemas práticos. Experimentos de competição, utilizando isolados sensíveis e resistentes, também podem indicar diferenças de adaptabilidade. Se os resistentes são normais ou melhores do que o normal, no seu crescimento, patogenicidade e esporulação, isso indica um sinal de risco (BRENT, 1995). Tem sido demonstrado que isolados sensíveis a MBC apresentam estabilidade e capacidade de persistir na população, mesmo com o uso descontinuado dos fungicidas (ISHII, 2015; WALKER *et al.*, 2013). Isolados de *C. musae* com reduzida sensibilidade a tiofanato-metílico apresentaram características relacionadas à adaptabilidade (crescimento micelial, germinação e produção de esporos e virulência) semelhantes às de isolados sensíveis (VIEIRA *et al.*, 2017b).

Informações sobre a sensibilidade e adaptabilidade de isolados resistentes a fungicidas são essenciais para a avaliação, implementação e redirecionamento de estratégias de manejo de doenças de plantas, além de possibilitarem o melhor entendimento da estrutura populacional do patógeno e dos processos de dispersão do inóculo (BROWN, 2006). Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar o risco de surgimento de populações resistentes ao tiofanato-metílico em populações de *C. musae* expostas a esse princípio ativo, induzir a produção de mutantes resistentes ao tiofanato-metílico de *C. musae* em *in vitro* e investigar a estabilidade da resistência, avaliar componentes de adaptabilidade como crescimento micelial, esporulação,

germinação de conídio, avaliar a patogenicidade e virulência dos isolados resistentes e avaliar a sensibilidade *in vivo* de *C. musae* ao tiofanato-metílico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plant Pathology caused by fungi. In: AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 5 ed. Amsterdam: **Elsevier**, p. 385-614, 2005.
- BANNO, S. *et al.* Genotyping of benzimidazole-resistant and dicarboximide-resistant mutations in *Botrytis cinerea* using real-time polymerase chain reaction assays. **Phytopathology**, v. 98, n. 4, p. 397–404, 2008.
- BARALDI, E. *et al.* Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. **Plant Pathology**, v. 52, n. 3, p. 362–370, 2003.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: consequências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 119–127, 2001.
- BRENT, K. J. Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed? Brussels: **Fungicide Resistance Action Committee**, 1995.
- BROWN, J. K. M. Surveys of variation in virulence and fungicide resistance and their application to disease control. Em: COOKE, B. M.; JONES, D. G.; KAYE, B. (Eds.). **The Epidemiology of Plant Diseases**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p. 81–115.
- CARVALHO, A. V. *et al.* Qualidade pós-colheita de cultivares de bananeira do grupo “maçã”, na região de Belém - PA. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1095–1102, dez. 2011.
- CHUNG, W.-H. *et al.* Specific detection of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* from fruit crops by PCR-RFLP. **New Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 17–24, 28 fev. 2010.
- CORDEIRO Z.J.M.; MATOS A.P.; KIMATI H. Doenças da bananeira. In: AMORIM L.; (Eds.) Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. Ouro Fino, **Agronômica Ceres**, 5ªed. p.109-123. 2016.
- COSTA, J. R. M. Viabilidade agroeconômica de genótipos de bananeira do tipo terra com resíduos orgânicos. 2008.
- DAMM, U. *et al.* The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, n. 1, p. 37–113, 2012.
- DAVIDSE, L. C. Benzimidazole Fungicides: Mechanism of Action and Biological Impact. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, n. 1, p. 43–65, 1986.
- DAVIDSON, R. M. *et al.* Analysis of β -tubulin Gene Fragments from Benzimidazole-sensitive and -tolerant *Cercospora beticola*. **Journal of Phytopathology**, v. 154, n. 6, p. 321–328, 2006.
- DELEN, N; TOSUN, N. Fungicidas: modo de ação e resistência. Parte 2: Fungicidas com modos de ação específicos. **Fungicidas: modo de ação e resistência. Parte 2: Fungicidas com modos de ação específicos.**, v. 12, p. 27–90, 2004.

- EMBRAPA. 2015 . Embrapa mandioca e fruticultura. Base de dados dos produtos. Banana: Desempenho da cultura. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/brasil/banana/banana_brasil_desempenho.htm>. Acesso em: 10 mar. 2022.
- EPPO. 2015. European and Mediterranean Plant Protection Organization. Disponível em: <<https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/banana-group/recommendations-for-bananas>>. Acesso em: 7 maio. 2022.
- FAO. 2021. FAOSTAT, Food and Agricultural Organization of the United Nations. FAOSTAT Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity>. Acesso em: 7 maio. 2022.
- FARBER, J. C. *et al.* Adequação dos custos na cultura permanente. **Revista Ampla de Gestão Empresarial**, São Paulo, v. 3, n. 1, p.179-194, 2014.
- FRAC. 2019. Fungicide Resistance Action Committee Disponível em: <<https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/banana-group/recommendations-for-bananas>>. Acesso em: 7 maio. 2022.
- GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. 2º ed. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2000.
- GRIFFEE, P. J. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 60, n. 3, p. 433-IN4, 1 jun. 1973.
- HAWKINS, N. J.; FRAAIJE, B. A. Fitness Penalties in the Evolution of Fungicide Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 56, p. 339–360, 25 ago. 2018.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola Municipal (2021). Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/sao-paulo/pesquisa/15/0?tipo=ranking&indicador=11885&localidade1=29>>. Acesso em: 7 maio. 2022.
- ISHII, H. Stability of Resistance. Em: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. (Eds.). Fungicide Resistance in Plant Pathogens: Principles and a Guide to Practical Management. Tokyo: **Springer. Japan**, p. 35–48, 2015.
- 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, n. 11, p. 1348–1354, 1992.
- MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, v. 24, n. 10, p. 853–863, 1 out. 2005.
- MA, Z.; YOSHIMURA, M. A.; MICHAILIDES, T. J. Identification and Characterization of Benzimidazole Resistance in *Monilinia fructicola* from Stone Fruit Orchards in California. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7145–7152, dez. 2003.
- MAIA, V. M. *et al.* Tipos e intensidade de danos mecânicos em bananas “prata-anã” ao longo da cadeia de comercialização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 2, p. 365–370,

jun. 2008.

MAPA. 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit - Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 22 maio. 2022.

MCKAY, G. J. *et al.* Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based method. **Mycological Research**, v. 102, n. 6, p. 671–676, 1 jun. 1998.

MORAES, W. D. S.; ZAMBOLIM, L.; LIMA, J. D. Incidência de fungos em pós-colheita de banana 'Prata anã' (*Musa AAB*). **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 67–70, mar. 2006.

NEGREIROS, R. J. Z. D. *et al.* Controle da antracnose na pós-colheita de bananas-'prata' com produtos alternativos aos agrotóxicos convencionais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 1, p. 51–58, mar. 2013.

OLIVEIRA, J. M.; COELHO FILHO, M. A.; COELHO, E. F. Crescimento da bananeira Grande Naine submetida a diferentes lâminas de irrigação em tabuleiro costeiro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1038–1046, out. 2013.

PERES, N. A. R. *et al.* Benomyl Sensitivity of Isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from Citrus. **Plant Disease**, v. 88, n. 2, p. 125–130, fev. 2004.

PLOETZ, R. C.; THOMAS, J. E.; SLABAUGH, W. R. Diseases of banana and plantain. **Diseases of tropical fruit crops**, CABI Books. p. 73–134, jan. 2003.

PRUSKY, D. *et al.* Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 155–176, 2013.

RODRIGUES, M. A. T. [UNESP. Classificação de fungicidas de acordo com o mecanismo de ação proposto pelo FRAC. **Aleph**, p. xxxix, 249 f. : il. color., 13 jan. 2006.

SENA, J. V. C. Aspectos da produção e mercado da banana no Nordeste. **Banco do Nordeste**, Brasília, v. 5, n. 10, 2011.

SENHOR, R.F.; SOUZA, P.A. de; NETO, R.C.A.; MARACAJÁ, P.B.; NASCIMENTO, F.J. Manejo de doenças pós-colheita. **Revista verde**, Mossoró, v.4, n.1, p. 0-13, 2009.

SILVA JUNIOR, G.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Princípios e Conceitos. **Ceres**, Minas Gerais, p. 259, 2018.

SIMMONDS, N. W.; SHEPHERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. **Journal of the Linnean Society of London, Botany**, v. 55, n. 359, p. 302–312, 1955.

VIEIRA, L.M. Banana. In: VIEIRA, L.M. (Coord.). Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2010-2011. Florianópolis: **Epagri-Cepa**, p.23-29, 2011.

VIEIRA, W. A. DOS S. *et al.* Thiophanate-Methyl Resistance and Fitness Components of *Colletotrichum musae* Isolates from Banana in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1659–1665, set. 2017a.

VIEIRA, W. A. DOS S. *et al.* Thiophanate-Methyl Resistance and Fitness Components of

Colletotrichum musae Isolates from Banana in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1659–1665, set. 2017b.

VIEIRA, W. A. S. *et al.* The impact of phenotypic and molecular data on the inference of *Colletotrichum* diversity associated with *Musa*. **Mycologia**, v. 109, n. 6, p. 912–934, 2017c.

WALKER, A.-S. *et al.* French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). **Pest Management Science**, v. 69, n. 6, p. 667–678, jun. 2013.

WARDLAW, C. W. Other fruit diseases. In: WARDLAW, C. W. Banana diseases. 2nd ed. London: **Longman Group Limited**. p. 509-551. 1972.

YOUNG, J. R. *et al.* Two Mutations in β -Tubulin 2 Gene Associated with Thiophanate-Methyl Resistance in *Colletotrichum cereale* Isolates from Creeping Bentgrass in Mississippi and Alabama. **Plant Disease**, v. 94, n. 2, p. 207–212, fev. 2010.

CAPÍTULO II

Risk analysis of resistance emergence by using thiophanate-methyl in controlling sensitive populations of *Colletotrichum musae*.

Risk analysis of resistance emergence by using thiophanate-methyl in controlling sensitive populations of *Colletotrichum musae*

A.C. Silva¹, W.A.S. Vieira¹, Duarte¹, A.G.G. Amaral¹, J.S. Veloso¹, M.P.S. Câmara¹

¹ Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil; corresponding author e-mail: marcos.camara@ufrpe.br.

² Departamento de Fitopatologia, Bloco C, Instituto de Ciências Biológicas, Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília. CEP 70910-900. Brasília, Distrito Federal - Brazil.

ABSTRACT

Anthrachnose, caused by *Colletotrichum musae*, is the most important post-harvest banana disease occurring in all production areas in Brazil. Although the use of thiophanate-methyl is frequent used to in Brazil for Sigatoka disease control, *Colletotrichum* populations are also exposed, resulting in the evolution of resistance to MBC fungicides and consequent risk of decreased ability to manage anthracnose in banana by MBC fungicides. Sixty isolates of *C. musae*, previously characterized as sensitive to thiophanate-methyl, were investigated for the risk of thiophanate-methyl resistance *in vitro*. After exposing 60 isolates to 0, 5, 10, 50, 100, 300, 500, and 1000 µg ml⁻¹ of thiophanate-methyl for 30 days, seven resistant mutants were obtained with EC₅₀ values ranging from 114.61 to 492.53 µg ml⁻¹. Applications of thiophanate-methyl formulation on banana fruits at the manufacturer's recommendations (500 µg ml⁻¹) showed low efficacy in controlling resistant isolates *in vivo*, as all mutant isolates were pathogenic in the presence of the fungicide. However, there is no indication of a reduction in fitness associated with fungicide resistance, as sensitive and resistant isolates did not differ in terms of mycelial growth rate (P = 0.16 to 0.49), conidial production (P = 0.16 to 0.44), conidial germination (P = 0.32 to 0.50), and virulence (P = 0.32 to 0.50). Our results revealed the absence of an adaptability cost for resistant isolates, suggesting that they may become dominant in the population if the product continues to be applied, leading to the inefficiency of MBC fungicides in controlling anthracnose in banana.

Keywords: Anthracnose, benzimidazoles, *Musa* spp., banana, chemical control.

INTRODUCTION

Brazil is the fifth largest world producer of bananas (*Musa* spp. L.), surpassed only by India, China, the Philippines, and Ecuador. The annual banana production in the country represented approximately 6.8% of global production in 2021, amounting to 7 million tons of fruit from a harvested area of 478,765 ha (FAO, 2021). However, the occurrence of plant diseases has affected negatively this production.

Anthrachnose caused by *Colletotrichum musae* is the most important banana post-harvest disease and is present in all production areas worldwide. Although the disease can occur at any time during the growing season, it is more frequent in ripe bananas (Simmonds & Mitchell, 1940). The pathogen starts as a quiescent infection in green fruit, while symptoms generally develop in mature fruits at high temperatures (Meredith, 1960; Lim *et al.*, 2002). The pathogen can limit the exportation of Brazilian fruits, hindering long-distance transportation and preventing entry into their destination (Peres, 1998; Prusky & Plumbley, 2013).

The management of anthracnose aims to prevent infection and retard symptom development by reducing the inoculum at its source (Zambolim *et al.*, 2018). This includes frequent banana leaf removal and the removal of harvest debris. It is also necessary to avoid fruit injuries during harvesting to minimize anthracnose development (Cordeiro, 1997). Fruit treatment with fungicides, especially benzimidazoles, is commonly used for post-harvest disease control (Eckert & Ogawa, 1985), which limits isolate exposure in the field and prevents the emergence of fungicide resistance.

Although thiabendazole is the only registered methyl benzimidazole carbamate (MBC) fungicide licensed for post-harvest treatment of bananas in Brazil (MAPA, 2019), another MBC fungicide, thiophanate-methyl, is commonly applied in Brazilian banana orchards to control sigatoka disease. Although this fungicide is not used in the field for anthracnose control, populations of *C. musae* are exposed leading to selective pressure for the evolution of resistance to thiophanate-methyl and other fungicides in the same group.

According to Vieira *et al.* (2017), nearly all isolates of *C. musae* are characterized as sensitive because, in most areas, the application of thiophanate-methyl is not intense (except in cultivation areas intended for exportation). However, recent reports show that exposure to this fungicide use can induce the emergence of mutant isolates resistant to the fungicide, where stable mutants of *Colletotrichum* with high resistance to fludioxonil were obtained in the laboratory (Gao *et al.*, 2018).

Thiophanate-methyl is applied in Brazilian banana orchards to control yellow Sigatoka leaf spot. However, we hypothesize that populations of *C. musae* are indirectly affected resulting in the emergence of fungicide-resistant isolates and the imminent breakdown of the ability to control post-harvest banana anthracnose. Thus, the aim of this study was: i) to induce in vitro the production of thiophanate-methyl-resistant mutants and evaluate the risk of emergence of resistant populations of *C. musae*; ii) to investigate the stability of resistance; iii) to assess the in vivo sensitivity of *C. musae* to thiophanate-methyl of the resistant mutants ; iv) to evaluate adaptability components, including pathogenicity and aggressiveness, of the resistant isolates.

MATERIAL AND METHODS

Obtaining isolates

Sixty isolates of *Colletotrichum musae* previously characterized as sensitive to thiophanate-methyl by Vieira *et al.* (2017) from the private collection of the mycology laboratory at the Federal Rural University of Pernambuco were used, These isolates were collected from commercial banana orchards in 11 Brazilian states (Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Santa Catarina, and São Paulo) during the years 2012-2013 (Table 1).

In vitro generation of thiophanate-methyl resistant mutant isolates of *C. musae* and calculation of EC50

To obtain thiophanate-methyl resistant mutants, two mycelial plugs of 5mm diameter

were taken from the edges of 7 day old colonies and transferred to plates containing potato, dextrose, and agar (PDA) supplemented with $5\mu\text{g ml}^{-1}$ of thiophanate-methyl (Cercobin 700 WP, 700 g kg^{-1} active ingredient, Iharabras, São Paulo, SP, Brazil). The cultures were kept in the dark for 30 days, and the presence of sectorial growth (mutant) was inspected. The mutants were sub cultivated in plates containing the same thiophanate-methyl concentration. Surviving mutants were transferred to plates containing higher concentrations of thiophanate-methyl (10, 50, 100, and $500\mu\text{g ml}^{-1}$). Isolates that grew at the $500\mu\text{g ml}^{-1}$ concentration were subcultured three times in culture medium containing thiophanate-methyl at the same concentration to stabilize the resistance. Once the resistance was stabilized, isolates mutants were transferred to plates containing thiophanate-methyl at concentrations of 0, 5, 10, 50, 100, 300, 500, and $1000\mu\text{g ml}^{-1}$. Two orthogonal measurements were taken from the colonies after four days of incubation. The percentage of inhibition of mycelial growth compared to the control was calculated for all fungicide concentrations, and the fungicide concentration that inhibited fungal development by 50% (EC_{50}) was determined for each individual isolate using 3 plates (triplicates) for each concentration. The isolates were classified according to three different phenotypes of active ingredient response, based on the EC_{50} range: sensitive for EC_{50} below $10\mu\text{g ml}^{-1}$; moderately resistant for EC_{50} between 10 and $100\mu\text{g ml}^{-1}$; and highly resistant for EC_{50} above $100\mu\text{g ml}^{-1}$. The level of resistance was represented by the resistance factor: $\text{RF} = \text{EC}_{50} \text{ of mutant} / \text{EC}_{50} \text{ of its parent}$ (Pang *et al.*, 2013).

Stability of Resistance

To assess resistance stability of resistant mutants, 5mm diameter discs were taken from the expansion margins of seven-day old colonies grown on PDA and transferred to the center of PDA plates repeatedly 10 times on PDA plates without fungicide every 7 days. In the tenth transfer, the EC_{50} of the isolates was calculated. The RFs (Resistance Factors) of the mutants were calculated after the first and tenth transfer. The stability of resistance was represented by the FSC value (factor of sensitivity change): $\text{FSC} = \text{RF value of the mutant in the 1st transfer} /$

RF value of the mutant in the 10th transfer (Pang *et al.*, 2013). All experiments were conducted with three replicates per isolate.

***In vivo* thiophanate-methyl sensitivity**

The sensitivity to thiophanate-methyl was assessed *in vivo* by quantifying the disease severity in banana fruits treated with the manufacturer's recommendations of thiophanate-methyl. The assay was conducted on stage four immature bananas (Ministério da integração nacional, 2000) that were not previously treated with any fungicide. The fruits were washed with running water, the surface was disinfected with 1.5% hypochlorite for 3 minutes, and then rinsed with sterile distilled water. The fruit surface was punctured at two points using a set of pins to a depth of 3 mm. The commercial formulation of thiophanate-methyl was dissolved in sterile distilled water at the label rate (500µg of active ingredient per mL). The previously punctured fruits were completely immersed in the fungicide solution for 10 seconds and kept at room temperature until fully dried (untreated fruits were immersed in sterile distilled water). Treated and untreated fruits were inoculated with 40µL of conidia suspension (106 conidia mL⁻¹) onto the lesions and kept in a humid chamber at 25°C. The humid chamber was removed 24 hours after inoculation, and the fruits were kept at the same temperature. The experiment was performed in triplicate for each isolate, with each replicate representing a fruit inoculated at two different points.

The disease severity was evaluated by measuring the average radial diameter of the lesions in all replicates. Differences in disease severity between fruits with sensitive and mutant isolates were determined for each reaction phenotype through one way analysis of variance (ANOVA), and the means of each treatment were compared using the Student's t-test ($p = 0.05$) with Statistix v.10 software (Analytical Software, Tallahassee, USA).

Analysis of fitness components

The fitness components of sensitive parental isolates and resistant mutant isolates was evaluated based on the following components: mycelial growth rate, conidia production, *in vitro*

conidia germination, and pathogenicity. For all assays, the isolates were transferred to PDA plates (five plates per isolate) and incubated for seven days at 25°C under continuous fluorescent light to enhance sporulation. All fitness tests were conducted with three replicates per isolate.

Mycelial growth rate

Mycelial plugs of 5mm were transferred to new PDA plates and incubated as described above. Four radial measurements were taken from the plug edge to the colony margin on the second, third, and fourth day of incubation, resulting in four radial measurements per replicate. The average of the four measurements was used to compare the growth of resistant isolates with that of their sensitive parents.

Conidial production

Twenty milliliters of sterile distilled water were added to Petri dishes with active conidial colonies. The culture surface was carefully scraped using a sterile microscope blade, and the conidial suspension was filtered through a double-layered gauze. The concentration of conidia in the suspension was measured using a hemocytometer and expressed as the number of conidia per milliliter of suspension. Three replicates were used, with each represented by an sporulation plate per isolate. The concentration of the suspension was subsequently calibrated to 10^6 conidia ml^{-1} for use in the conidial germination assay.

Conidial Germination

Fifty microliters of the conidial suspension were transferred to four equidistant points on Petri dishes containing 2% water agar. Each aliquot was covered with a coverslip, and the plates were incubated for 12 hours at 25°C in the dark. One hundred conidia were examined under a compound light microscope to determine the percentage of germination. A conidium was considered germinated when the germ tube had a length equal to or greater than the length of the conidia.

Pathogenicity and aggressiveness in banana fruit

The pathogenicity of *C. musae* was determined using bananas of similar size at stage four of ripeness (Ministério da integração nacional, 2000) and not previously treated with any fungicide. The bananas were washed three times with sterile distilled water, dried at room temperature, and transferred to plastic boxes lined with three layers of sterile gauze saturated with sterile distilled water to maintain high humidity. The fruits were inoculated with 10 μ L of conidial suspension and kept in a humid chamber at 25°C. After 48 hours, the humid chamber was removed, and the fruits were maintained at 25°C. Pathogenicity and aggressiveness were evaluated 4 days after inoculation. Pathogenicity was confirmed by the presence or absence of symptoms. Aggressiveness was quantified by measuring the radial diameter of the lesions and represented by the average of two diameters per fruit (Jin *et al.* 2007).

Statistical analyses

The means of adaptability and aggressiveness component values were subjected to ANOVA. Mutant isolates resistant was compared to their respective sensitive parents using the Student's t-test at a significance level of 5% using Statistix v.10 software (Statistix 2013).

RESULTS

In vitro generation of thiophanate-methyl resistant mutant isolates of *C. musae* and calculation of EC₅₀

With repeated exposure to thiophanate-methyl, a total of seven fungicide-resistant mutants were obtained (DP10, SP9, XV40, 32, CC4, CC11, and AP3). The EC₅₀ values were 114.61, 180.07, 125.20 152.17, 144.24, 492.53 and 290.21 μ g ml⁻¹ for the respective isolates, all classified as highly resistant to thiophanate-methyl (Table 2). When comparing the sensitive isolates with the resistant mutants, there were differences in the resistance factor values, with isolate CC11 standing out with the highest resistance factor of 5596, indicating the greatest difference in EC₅₀ from when it was sensitive to when it became a mutant.

Stability of thiophanate-methyl resistance

The resistant isolates degenerated after the 5th generation in all replicates (Figure 1). In

the 5th transfer on fungicide-free PDA, the resistance of the mutants to thiophanate-methyl showed little variation ($FSC \approx 1$), indicating that the resistance of these mutants is stable, at least until the 5th generation (Table 3). The EC_{50} values for the seven resistant isolates of *C. musae* were above $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, and the resistance factors (RF) were above 1000, indicating that these isolates exhibited a high level of resistance stability to thiophanate-methyl.

Analysis of fitness components

The mycelial growth for each thiophanate-methyl resistant mutant did not show significant differences compared to the parental isolate, with the P-values: 0.37, 0.39, 0.49, 0.33, 0.16, 0.49, and 0.38. The conidial production capacity of resistant mutants and their parental isolates was compared on PDA plates. All resistant mutants produced similar quantities of conidia compared to their parental isolates, with the P-values: 0.16, 0.34, 0.37, 0.44, 0.42, 0.16, and 0.17. The conidial germination rate did not show significant differences between the resistant mutants and their respective parent isolates, with the P-values: 0.42, 0.44, 0.36, 0.50, 0.37, 0.32, and 0.50 (Table 4).

Pathogenicity and aggressiveness in banana fruit

The in vivo pathogenicity test showed that the thiophanate-methyl resistant mutants did not have a significant difference in pathogenicity compared to their parental isolates ($P \geq 0.05$), indicating that all of them were pathogenic on banana fruits. After a 4-day inoculation, each parental isolate produced typical lesions on tomato leaves, just like their resistant mutants, with no significant differences observed, with the P-values: 0.50, 0.44, 0.36, 0.38, 0.32, 0.41, and 0.50 (Table 4).

***In vivo* Sensitivity**

Fruit inoculated with sensitive isolates developed typical symptoms of anthracnose, while no symptoms were observed in fruits treated with thiophanate-methyl (Figure 2). The resistant isolates caused anthracnose symptoms in both treated and untreated bananas. There was no significant difference in disease severity between treated and untreated fruits for

resistant isolates ($P=0.46$) (Table 5).

DISCUSSION

Our results indicate an 11.7% risk of the emergence of mutant isolates if populations of *C. musae* are continuously exposed to thiophanate-methyl. Previous studies have reported resistance to other MBC fungicides in *Colletotrichum* populations from other countries and in Brazil (Griffiee, 1973; Quimio, 1976; Slabaugh & Grove, 1982 Hostachy, B. *et al.*, 1990; Johanson & Blazquez, 1992; de Lapeyre de Bellaire & Dubois, 1997; Vieira *et al.*, 2017; Gao *et al.*, 2018).

The seven thiophanate-methyl-resistant isolates came from three states in Brazil: Pernambuco, Distrito Federal, and Santa Catarina, with five of them originating from Pernambuco. Most of the sampled areas, which primarily produce for domestic markets, did not adopt a regular fungicide application schedule due to low level of farm technology used in this production areas. In Pernambuco, there is irregular use of fungicides, including thiophanate-methyl, for managing Sigatoka leaf spot in the highly susceptible "Prata" banana cultivar. Fungicides registered for Sigatoka control in Brazil (MAPA, 2019) are applied following a regular schedule, regardless of disease pressure. While fungicide applications aim to control Sigatoka leaf spot, our results indicate that the use of thiophanate-methyl for Sigatoka leaf spot control can lead to the emergence of resistant populations of *C. musae* in the field.

Fungicide resistance is uncommon in populations that have not been subjected to fungicide application, as resistance-associated alleles are rare or absent. However, these alleles increase in frequency in the presence of fungicides, depending on the frequency and strength of selection (Brent & Hollomon, 2007). Factors related to increased fungicide efficacy, higher frequency of fungicide applications, and a greater difference in sensitivity between resistant and sensitive individuals in the field can lead to increased selective pressure (Bergamin Filho & Amorim, 2001). We observed a significant difference in fungicide sensitivity between sensitive

isolates and their resistant mutants in vitro. Sensitive isolates were inhibited by concentrations above $0.5\mu\text{g ml}^{-1}$, while resistant mutants continued to grow when exposed to concentrations up to $1000\mu\text{g ml}^{-1}$. The resistance factor analyses showed that resistant mutant isolates ranged from 1273 to 5596, indicating a large difference in EC_{50} values compared to before the mutation. The need for high thiophanate-methyl concentrations to inhibit the growth of resistant isolates, combined with high-frequency fungicide applications, may lead to resistant isolates becoming dominant in the *C. musae* population in Brazilian orchards.

In vivo results revealed low efficacy of thiophanate-methyl in controlling resistant isolates of *C. musae* in fruits. While thiophanate-methyl efficiently controlled banana anthracnose when inoculated with sensitive isolates, there was no reduction in disease severity when fruits were inoculated with resistant mutants. Previous studies have also demonstrated the loss of efficacy of MBC fungicides, such as for *C. musae* from banana-growing areas in Mexico and Brazilian orchards (Vieira et al., 2017; Amaral, 2019). This result may have practical implications for post-harvest anthracnose control. Banana fruits produced in orchards that are destined for other countries are treated with carbendazim to prevent the development of anthracnose symptoms during transportation and marketing. However, since carbendazim is also an MBC fungicide, this treatment may not be effective, and symptomatic fruit may be rejected at international borders.

Studies on the resistance components of resistant and sensitive fungal mutants to fungicides are useful for determining disease management strategies and preventing resistance development (Antonovics & Alexander, 1989; Ma & Michailides, 2005; Wu et al., 2015; Gao et al., 2018). Fungicide resistance is a genetically inherited trait that can impose a fitness penalty, which can negatively affect the growth, reproduction, or pathogenicity of fungi (Brent and Hollomon, 2007). Fitness components such as growth rate and virulence can reflect the pathogenic potential of isolates in the field. On the other hand, spore production and germination can reflect the potential of isolates to reproduce, disseminate, and establish new

infections. The mutant isolates did not show significant differences in any of the fitness components compared to the sensitive isolates. These data support the results presented by Vieira *et al.* (2017) involving *C. musae* mutants in Brazilian orchards. Our results indicate that the evolution of thiophanate-methyl resistance has long-term fitness implications, as the mutant isolates did not grow beyond the fifth generation in stability of resistance tests. However, before the fifth generation, both the sensitive and moderately resistant isolates have an equal probability of survival in banana orchards. This suggests that resistant isolates of *C. musae* have a higher likelihood of persisting in banana orchards where there is selective pressure from multiple applications of thiophanate-methyl than in orchards where this pressure does not exist.

The risk of *C. musae* isolates developing resistance to thiophanate-methyl in banana production regions with regular fungicide application in Brazil is a reality. Although fungicide resistance management can attenuate the emergence of non-sensitive isolates in field populations (Brent and Hollomon, 2007), there is still little monitoring and data collection on fungicide applications in banana orchards in Brazil. *Colletotrichum* species are considered to have a medium risk of resistance development (FRAC, 2019) and are associated with a high risk of benzimidazole resistance. The risk of *C. musae* resistance to thiophanate-methyl may be moderate, and resistance management should be considered.

Since sensitive isolates and resistant mutants have very similar adaptive potential, the first management strategy to be adopted is the use of fungicides with different modes of action than benzimidazoles. Additional strategies for the chemical control of MBC fungicides include the application of a mixture or alternation of fungicides with different modes of action and no cross-resistance, following the manufacturer's recommended effective doses, applying a maximum of three applications of MBC fungicides, applying them at the beginning of the annual disease progress curve and under low disease pressure, and ensuring a minimum interval of 3 months between fungicide applications from this group. Other disease management practices include the removal of crop residues in the field, prevention of surface fruit injuries

during harvesting, and post-harvest chemical treatment of fruits.

ACKNOWLEDGMENTS

Anthony Carlos da Silva acknowledges “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq” for the master’s scholarship. Marcos P. S. Câmara acknowledges CNPq for the research productivity fellowship. Willie A. S. Vieira acknowledge the “Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior – CAPES” and the “Programa Nacional de Pós-Doutorado/CAPES – PNPd/CAPES” for the postdoctoral fellowships.

REFERENCES

- Amaral, AGG, 2019. Sensibilidade de *Colletotrichum musae* provenientes de áreas de cultivo do México a fungicidas metil benzimidazol carbamatos e habilidade competitiva de isolados. Dissertation, Pernambuco, Universidade federal rural de Pernambuco.
- Antonovics, J, Alexander, HM, 1989. The concept of fitness in plant fungal pathogen systems. In: K. J. Leonard & W. E. Fry, W.E. (Eds.), Plant disease epidemiology (pp. 185-214). New York: McGraw-Hill
- Bergamin Filho A, Amorim L, 2001. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: consequências para a resistência a fungicidas. Fitopatologia Brasileira 26, 119–127.
- Brent, KJ, Hollomon, D. W. 2007. Fungicide resistance: The assessment of risk. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee.
- Cordeiro, ZJM, 1997. Doenças e nematóides. In: Alves, E. J. et al. (Ed.). Banana para exportação: aspectos técnicos da produção. 2. ed. Brasília: EMBRAPA-SPI. p. 69-86.
- Eckert JW, Ogawa JM, 1985. The Chemical Control of Postharvest Diseases: Subtropical and Tropical Fruits. Annual Review of Phytopathology 23, 421–454.
- FAO. 2021. FAOSTAT, Food and Agricultural Organization of the United Nations. FAOSTAT Available at: https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. [Accessed 7 may. 2022].

- FRAC. 2019. Fungicide Resistance Action Committee Available at:
<https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/banana-group/recommendations-for-bananas>. [Accessed 7 may. 2022].
- Gao Y, He L, Mu W, Li B, Lin J, Liu F, 2018. Assessment of the baseline sensitivity and resistance risk of *Colletotrichum acutatum* to fludioxonil. European Journal of Plant Pathology 150, 639–651.
- Griffee PJ, 1973. Resistance to benomyl and related fungicides in *Colletotrichum musae*. Transactions of the British Mycological Society 60, 433-IN4.
- Hostachy, B, Vegh, I, Leroux, P, Jacquemot, E, Foucher, S, Pigou, R, 1990. Bananes de la Martinique. Incidence des problèmes fongiques sur la qualité [Bananas in Martinique. The effect of fungal problems on productivity]. Bananes de la Martinique. Incidence des problèmes fongiques sur la qualité, 37–43.
- Jin, LH, Chen, CJ, Wang, JX, Chen, Y, Zhou, MG, 2007. Impact of alternative respiration on response of conidial germination and mycelial growth of *Colletotrichum capsici* to azoxystrobin. Phytopathologica Sinica, v.6, p. 55–81.
- Johanson A, Blazquez B, 1992. Fungi associated with banana crown rot on field-packed fruit from the Windward Islands and assessment of their sensitivity to the fungicides thiabendazole, prochloraz and imazalil. Crop Protection 11, 79–83.
- de Lapeyre de Bellaire L, Dubois C, 1997. Distribution of Thiabendazole-Resistant *Colletotrichum musae* Isolates from Guadeloupe Banana Plantations. Plant Disease 81, 1378–1383.
- Lim J, Lim T, Cha B, 2002. Isolation and Identification of *Colletotrichum musae* from Imported Bananas. The Plant Pathology Journal 18.

- 384 Ma Z, Michailides TJ, 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide
385 resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi.
386 Crop Protection 24, 853–863.
- 387 MAPA. 2019. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit - Sistema de
388 agrotóxicos fitossanitários. Available at:
389 https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. [Accessed 7
390 may. 2022].
- 391 Meredith DS, 1960. Studies on *Gloeosporium musarum* cke. & massee causing storage rots of
392 jamaican bananas.: i. Anthracnose and its chemical control. Annals of Applied
393 Biology 48, 279–290.
- 394 Ministério da Integração Nacional (2000). Frutiséries. Available at:
395 <http://www.mi.gov.br/infraestruturahidrica/publicacoes/frutiseries.asp>. [Accessed on
396 10 February 2022.]
- 397 Pang Z, Shao J, Chen L et al., 2013. Resistance to the novel fungicide pyrimorph in
398 *Phytophthora capsici*: risk assessment and detection of point mutations in CesA3 that
399 confer resistance. PloS One 8, e56513.
- 400 Peres NAR, 1998. Caracterização patogênica, morfológica, cultural e molecular de
401 *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum* spp. em frutas pós-colheita. M.Sc. thesis.
402 Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual de São Paulo,
403 Botucatu, Brazil.
- 404 Prusky, D, Plumbley, RA, 2013 Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and
405 subtropical fruit. In: *Colletotrichum*: Prusky, D; Alkan, N; Mengiste, T; Fluhr, R.

- 406 Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development.
 407 Annual Review of Phytopathology, v. 51, p.155-176.
- 408 Quimio, TH, 1976. Variability in *Colletotrichum musae* (Berk. et Curt.) V. Arx and its
 409 significance in chemical control. Phillip. Phytopathol. 12:40-50
- 410 Simmonds JH, Mitchell RS, 1940. Black end and anthracnose of the banana: with special
 411 reference to *Gloeosporium musarum* Cke. and Mass. Melbourne: T. Rider,
 412 government printer.
- 413 Slabaugh, W. R., and Grove, M. D. 1982. Postharvest diseases of bananas and their control.
 414 Plant Disease. 66:746-750
- 415 Vieira WA dos S, Lima WG, Nascimento ES et al., 2017. Thiophanate-Methyl Resistance and
 416 Fitness Components of *Colletotrichum musae* Isolates from Banana in Brazil. Plant
 417 Disease 101, 1659–1665.
- 418 Wu D-X, Zhang R-S, Han X, Wang J-X, Zhou M-G, Chen C-J, 2015. Resistance risk
 419 assessment for fludioxonil in *Stemphylium solani*. Annals of Applied Biology 167,
 420 277–284.
- 421 Zambolim L, Ventura JA, Vale FXR do, Costa H, Monteiro AJA, 2018. Controle de doenças
 422 de plantas fruteiras.

Table 1 Distribution of *Colletotrichum musae* isolates collected in 11 states of Brazil.

ISOLATE	STATE	CITY	BANANA CULTIVAR
GM20	Alagoas	Maragogi	Maçã
ZP1	Bahia	Bom Jesus da Lapa	Prata
ZP2	Bahia	Bom Jesus da Lapa	Prata
ZP3	Bahia	Bom Jesus da Lapa	Prata
ZP4	Bahia	Bom Jesus da Lapa	Prata
AP1	Distrito Federal	Planaltina	Prata
AP2	Distrito Federal	Planaltina	Prata
AP3^Z	Distrito Federal	Planaltina	Prata
AP4	Distrito Federal	Planaltina	Prata
OT1	Espírito Santo	Colatina	Comprida
OT2	Espírito Santo	Colatina	Comprida
OT3	Espírito Santo	Colatina	Comprida
YM1	Goiás	Itapuranga	Maçã
YM3	Goiás	Itapuranga	Maçã
MP4	Minas Gerais	Paracatu	Prata
MP5	Minas Gerais	Paracatu	Prata
MP6	Minas Gerais	Paracatu	Prata
MP7	Minas Gerais	Paracatu	Prata
MP8	Minas Gerais	Paracatu	Prata
MP9	Minas Gerais	Paracatu	Prata
FP2	Pará	São Felix do Xigu	Prata
FP3	Pará	São Felix do Xigu	Prata
FP4	Pará	São Felix do Xigu	Prata
5	Paraná	Guaratuba	Prata
6	Paraná	Guaratuba	Prata
7	Paraná	Guaratuba	Prata
G1	Paraná	Guaratuba	Prata
SP7	Pernambuco	São Vicente Férrer	Prata
SP8	Pernambuco	São Vicente Férrer	Prata
SP9^Z	Pernambuco	São Vicente Férrer	Prata
SP10	Pernambuco	São Vicente Férrer	Prata
CC3	Pernambuco	Cortês	Comprida
CC4^Z	Pernambuco	Cortês	Comprida
CC5	Pernambuco	Cortês	Comprida
CC6	Pernambuco	Cortês	Comprida
CC10	Pernambuco	Cortês	Comprida
CC11^Z	Pernambuco	Cortês	Comprida
CC12	Pernambuco	Cortês	Comprida
XV35	Pernambuco	Machados	Pacovan
XV37	Pernambuco	Machados	Pacovan

Continuation

ISOLATE	STATE	CITY	BANANA CULTIVAR
XV38	Pernambuco	Machados	Pacovan
XV39	Pernambuco	Machados	Pacovan
XV40^z	Pernambuco	Machados	Pacovan
DP5	Pernambuco	Petrolina	Prata
DP6	Pernambuco	Petrolina	Prata
DP7	Pernambuco	Petrolina	Prata
DP8	Pernambuco	Petrolina	Prata
DP9	Pernambuco	Petrolina	Prata
DP10^z	Pernambuco	Petrolina	Prata
29	Santa Catarina	Luiz Alves	Prata
30	Santa Catarina	Luiz Alves	Prata
31	Santa Catarina	Luiz Alves	Prata
32^z	Santa Catarina	Luiz Alves	Prata
33	Santa Catarina	Luiz Alves	Prata
IP1	São Paulo	Iguape	Prata
IP2	São Paulo	Iguape	Prata
IP3	São Paulo	Iguape	Prata
IP4	São Paulo	Iguape	Prata
IP5	São Paulo	Iguape	Prata
IP6	São Paulo	Iguape	Prata

^z The isolates in bold were resistant to thiophanate-methyl.

Table 2 Variables of sensitivity to thiophanate-methyl in isolates of *Colletotrichum musae*.

Variables of sensitivity to		Isolates						
Thiophanate-methyl.		DP10	SP9	XV40	32	CC4	CC11	AP3
EC ₅₀ (µg/ml) ^b	Sensitive	0.09	0.12	0.10	0.11	0.11	0.09	0.19
	Resistant	114.61	180.07	125.20	152.17	144.24	492.53	290.21
	Resistance factor (RF)	1273.48	1513.21	1317.89	1383.24	1276.44	5596.96	1511.54

^b EC₅₀ = effective concentration for 50% inhibition of mycelial growth

Table 3 Level and stability of resistance to tiofanate-methyl for resistant isolates of *Colletotrichum musae*.

Isolates ^a	Reaction Phenotype	EC ₅₀ (µg/ml) ^b		RF ^c		FSC ^d
		1st	5th	1st	5th	
DP10	Sensitive	0.09 A	0.09 A	-	-	-
	Resistant	114.61 A	101.31 A	1273.48	1160.51	0.91
SP9	Sensitive	0.12 A	0.11 A	-	-	-
	Resistant	180.07 A	123.83 A	1513.21	1476.02	0.98
XV40	Sensitive	0.10 A	0.09 A	-	-	-
	Resistant	125.20 A	103.99 A	1317.89	1142.02	0.87
32	Sensitive	0.11 A	0.11 A	-	-	-
	Resistant	152.17 A	111.72 A	1383.24	1299.00	0.94
CC4	Sensitive	0.11 A	0.10 A	-	-	-
	Resistant	144.24 A	109.53 A	1276.44	1092.757	0.86
CC11	Sensitive	0.09 A	0.08 A	-	-	-
	Resistant	492.53 A	321.73 A	5596.96	4991.44	0.89
AP3	Sensitive	0.19 A	0.17 A	-	-	-
	Resistant	290.21 A	181.62 A	1511.54	1463.25	0.97

a Values in each line (isolate class) followed by the same letter are not significantly different according to Student's t-test (P=0.05).

b EC₅₀ = effective concentration for 50% inhibition of mycelial growth at the 1st transfer and the 5th transfer.

c RF = resistance factor, a ratio of EC₅₀ for a fungicide resistant mutant relative to the EC₅₀ for the parental isolate.

d FSC = the ratio of RF values at the 1st and 5th transfers

Table 4 Comparison of mycelial growth rates (MGR), conidial production (CP), conidial germination (CG) and aggressiveness (lesion diameter) in banana fruits (AGR) between *Colletotrichum musae* isolates sensitive (S) and resistant (R) to thiophanate-methyl.

Fitness components		Isolates						
		DP10	SP9	XV40	32	CC4	CC11	AP3
MGR (mm/dia) ^h	S	6.11 (0.62)	4.74 (0.22)	6.38 (0.36)	6.01 (0.84)	3.10 (0.37)	5.09 (0.97)	6.10 (0.42)
	R	5.98 (1.84)	3.83 (1.74)	5.28 (2.14)	5.86 (1.54)	3.40 (1.62)	4.11 (2.01)	4.80 (1.25)
	<i>P</i>	0.37	0.39	0.49	0.33	0.16	0.49	0.38
CP (x10 ⁶ esporos/mL) ^h	S	15.00 (2.08)	7.50 (1.36)	12.50 (2.14)	7.50 (1.38)	12.50 (1.25)	12.50 (1.46)	42.00 (3.44)
	R	10.00 (2.87)	10.00 (1.25)	21.00 (3.01)	5.00 (1.47)	20.00 (2.54)	17.50 (2.17)	37.50 (3.54)
	<i>P</i>	0.16	0.34	0.37	0.44	0.42	0.16	0.17
CG (%) ^h	S	94 (1)	90 (2)	92 (2)	90 (2)	89 (3)	91 (2)	94 (2)
	R	92 (2)	94 (3)	92 (2)	88 (3)	91 (2)	94 (2)	95 (2)
	<i>P</i>	0.42	0.44	0.36	0.50	0.37	0.32	0.50
AGR (mm) ^h	S	19.20 (0.5)	21.85 (0.4)	19.83 (0.2)	17.67 (0.4)	17.62 (0.3)	22.36 (0.5)	20.12 (0.3)
	R	18.85 (0.5)	21.10 (0.3)	20.23 (0.3)	18.59 (0.3)	18.63 (0.4)	21.5 (0.2)	19.92 (0.3)
	<i>P</i>	0.50	0.44	0.36	0.38	0.32	0.41	0.50

^h Reaction phenotypes values for each variable do not differ significantly according to Student's t-test (P=0.05). Values (±) in parentheses represent standard errors.

Table 5 Disease severity (lesion diameter in mm) in detached banana trees treated with thiophanate-methyl formulated at the indicated rate and inoculated with sensitive (S) and resistant (R) isolates of *Colletotrichum musae*.

Isolates	Reaction Phenotype	Lesion diameter (mm)	
		Without fungicide	With fungicide
DP10	S	19.20 (2.54)	0
	R ^h	18.84 (2.36) A	18.37 (2.94) A
SP9	S	21.48 (2.41)	0
	R ^h	21.08 (3.01) A	20.94 (2.47) A
XV40	S	19.82 (2.47)	0
	R ^h	20.23 (2.69) A	19.37 (3.17) A
32	S	18.66 (2.08)	0
	R ^h	18.59 (2.10) A	18.56 (2.87) A
CC4	S	17.62 (1.99)	0
	R ^h	18.63 (2.64) A	17.96 (2.83) A
CC11	S	22.36 (3.12)	0
	R ^h	21.50 (2.41) A	19.42 (2.18) A
AP3	S	18.92 (2.14)	0
	R ^h	22.87 (3.41) A	23.22 (3.14) A

h Values in each line (isolate class) followed by the same letter are not significantly different according to Student's t-test (P=0.05). Values (±) in parentheses represent standard errors.

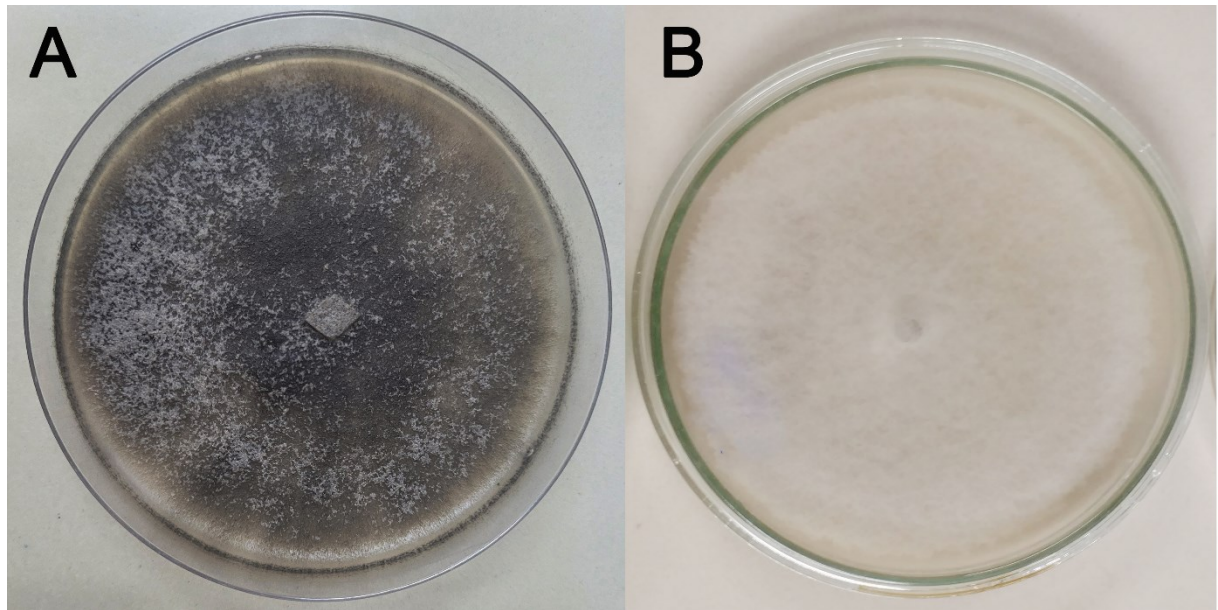


Figure 1 Degeneration of *Colletotrichum musae* mutant isolate in resistance stability test. (A) Isolate in the first generation, (B) Mutant isolate in the fifth generation.



Figure 2 Efficacy of thiophanate-methyl in controlling sensitive (A, B) and resistant (C, D) isolates of *Colletotrichum musae* in banana fruits. A and C represent fruits not treated with thiophanate-methyl. B and D represent fruits treated with thiophanate-methyl.

CAPÍTULO III

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

- O risco da resistência de *C. musae* ao tiofanato metílico é moderado;
- O tiofanato-metílico, na sua dosagem comercial, não é eficaz no controle de isolados de *C. musae* mutantes resistentes em frutos de bananeira;
- A resistência ao tiofanato-metílico é estável em isolados de *C. musae* mutantes resistentes;
- Não há diferença significativa nos componentes de adaptabilidade nos isolados sensíveis e seus mutantes resistentes;