



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Dissertação de Mestrado

**Sensibilidade de *Lasiodiplodia theobromae* de pomares
de mamão do Nordeste do Brasil a difenoconazole**

Moara Alexandrino Bandeira

**Recife – PE
2014**

MOARA ALEXANDRINO BANDEIRA

**SENSIBILIDADE DE *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* DE
POMARES DE MAMÃO DO NORDESTE DO BRASIL A
DIFENOCONAZOLE**

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2014**

**SENSIBILIDADE DE *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* DE
POMARES DE MAMÃO DO NORDESTE DO BRASIL A
DIFENOCONAZOLE**

MOARA ALEXANDRINO BANDEIRA

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:

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE) – Orientador

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) – Coorientador

Prof. Dr. Ricardo Brainer Martins (UFAL) – Coorientador

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2014**

Ficha catalográfica

B214s Bandeira, Moara Alexandrino
 Sensibilidade de *Lasiodiplodia theobromae* de
pomares
 de mamão do Nordeste do Brasil a difenoconazole /
Moara
 Alexandrino Bandeira. – Recife, 2014.
 58 f. : il.

 Orientador: Marcos Paz Saraiva Câmara.
 Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) –
Universidade
 Federal Rural de Pernambuco, Departamento de
Agronomia,
 Recife, 2014.
 Referências.

 1. *Carica papaya* 2. Botryosphaeriaceae
 3. Adaptabilidade 4. Resistência a fungicida 5. Podridão
 peduncular I. Câmara, Marcos Paz Saraiva, orientador
 II. Título

CDD 632

**SENSIBILIDADE DE *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* DE
POMARES DE MAMÃO DO NORDESTE DO BRASIL A
DIFENOCONAZOLE**

MOARA ALEXANDRINO BANDEIRA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 25/02/2014

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Marcos Paz Saraiva Câmara (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr. Ailton Reis (CNPQ/EMBRAPA)

Dra. Viviane Jurema Lopes Borges Rodrigues (MAPA)

Dra. Waléria Guerreiro Lima (PNPD/UFRPE)

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2014**

*Aos meus amados irmãos, Poliana,
Yuri, Yves, Giovanna e Kalil. Ao
meu melhor amigo e namorado
Matheus. Aos familiares e amigos,
meus maiores incentivadores*

OFEREÇO

*Aos meus primeiros, e eternos,
orientadores, Elzira Bandeira e
Nonato Bandeira, por me
ensinarem sempre que a educação
é o bem mais precioso que alguém
pode carregar. Pelo amor e
carinho*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao Pai Celestial, por nunca me deixar esmorecer e sempre me proteger nas adversidades.

Aos meus pais Nonato e Elzira, que me ensinaram a perseverar e que apoiaram sempre em minhas decisões, por mais que elas significassem conviver com a saudade.

Ao professor Dr. Marcos Câmara pela orientação e amizade;

Ao professor Dr. Sami Michereff pela orientação, atenção, apoio e paciência;

Ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), pelo apoio institucional, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE pelos ensinamentos transmitidos;

Ao colega Rômulo Diniz, por ser sempre prestativo e me auxiliar nos primeiros dias de desenvolvimento do trabalho;

À Susan Tsuji, meu braço direito, sua ajuda sempre indispensável;

Aos colegas do Laboratório de Micologia, Dra. Waléria Guerreiro, Willie Anderson, Mariote Netto, Tamiris, Eufrázio e Eduardo;

À equipe do Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas, sempre disposta a me ajudar, Kamila, Mayumi, João, José Garcete, Cinthia, Marcondes, Hugo, Yana, Soraya, Rômulo, Barbara e Catarina, sem eles este trabalho seria impossível de ser realizado;

Aos amigos conterrâneos, Claudeana, Jackeline, Michelle, Arinaldo, Luiz Henrique e Luiz Gustavo, pedacinhos da terra amada e a família que adotei.

Aos amigos queridos Matheus Silva, Antônio Neto, Leticia Monteiro, Mercia Cardoso, Wilson Junior, minha vida em Recife seria menos feliz sem eles;

Aos funcionários Darcy Martins e Romildo Angeiras pela colaboração;

Por fim, a todos que fizeram parte desta conquista, o meu MUITO OBRIGADO.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
CAPÍTULO I – Introdução Geral	11
Referências Bibliográficas	24
CAPÍTULO II – Sensitivity of <i>Lasiodiplodia theobromae</i> from Northeastern Brazil papaya orchards to difenoconazole	
Abstract	30
Introduction	32
Materials and methods	36
Results	41
Discussion	42
References	47
CONCLUSÕES GERAIS	57

RESUMO GERAL

A podridão peduncular, causada por *Lasiodiplodia theobromae*, é uma importante doença pós-colheita de mamão no Brasil. Não há dados disponíveis sobre a sensibilidade de *L. theobromae* ao fungicida difenoconazole (grupo dos inibidores da demetilação - DMI), amplamente utilizado em pomares de mamão no Nordeste brasileiro. Assim, a concentração efetiva que resulta em 50 % de inibição do crescimento micelial (CE_{50}) de 107 isolados, representando cinco populações do fungo, foi avaliada *in vitro*. Cinco componentes de adaptabilidade (crescimento micelial em meio sem fungicida, temperatura ótima para o crescimento micelial, produção de esporos, sensibilidade osmótica e virulência em frutos de mamão) foram mensurados para os 10 isolados com valores mais baixos e altos de CE_{50} . Os valores de CE_{50} estimados dos isolados variaram entre 0,01 e 15,40 μg de ingrediente ativo (i.a.) ml^{-1} . Valores de CE_{50} superiores a 10 μg i.a. ml^{-1} ocorreram em 2,8 % dos isolados, enquanto que 64,5 % dos isolados apresentaram valores de CE_{50} entre 0,01 e 1,00 μg i.a. ml^{-1} . Houve diferença significativa ($P=0.02$) no nível de sensibilidade a difenoconazole entre as populações de *L. theobromae*. A população C (Goiana, PE) foi a menos sensível (3,04 μg i.a. ml^{-1}), enquanto a população B (Amaraji, PE) foi a mais sensível (0,28 μg i.a. ml^{-1}). Quando os isolados de *L. theobromae* foram agrupados conforme os extremos de sensibilidade, o valor médio de CE_{50} dos 10 isolados não-sensíveis (NS; 7,27 μg ml^{-1}) foi significativamente ($P=0.0002$) superior ao observado nos 10 isolados sensíveis (S; 0,10 μg ml^{-1}). Não houve diferença ($P>0,05$) entre isolados S e NS para componentes da adaptabilidade, indicando que não houve custo de adaptabilidade para os isolados NS.

Palavras-chave: *Carica papaya*, podridão peduncular, Botryosphaeriaceae, resistência a fungicidas, adaptabilidade.

GENERAL ABSTRACT

Stem-end rot, caused by *Lasiodiplodia theobromae*, is an important postharvest disease of papaya in Brazil. There are no data available on the sensitivity of *L. theobromae* to difenoconazole (demethylation-inhibiting-DMI group), widely used in papaya orchards in Northeastern Brazil. Thus, the effective concentration that results in 50% of mycelial growth inhibition (EC₅₀) of 107 isolates, representing five populations of the pathogen was estimated *in vitro*. Five components of fitness (mycelial growth on fungicide-free agar medium, optimum temperature for mycelial growth, spore production, osmotic sensitivity and virulence on papaya fruits) were measured for the 10 isolates with lower and high values of EC₅₀. The estimated EC₅₀ values of isolates ranged from 0.01 to 15.40 µg active ingredient (a.i.) ml⁻¹. The EC₅₀ values above 10 µg a.i. ml⁻¹ occurred in 2.8% of the isolates, while 64.5% of the isolates had EC₅₀ values between 0.01 and 1.00 µg a.i. ml⁻¹. Significant difference ($P=0.02$) was found in sensitivity level to difenoconazole among of *L. theobromae* populations. The population C (Goiana, PE) was the least sensitive to the fungicide (3.04 µg a.i. ml⁻¹), while the population B (Amaraji, PE) was the most sensitive (0.28 µg a.i. ml⁻¹). When *L. theobromae* isolates were grouped according to the extremes of sensitivity, EC₅₀ mean value of 10 non-sensitive (NS) isolates (7.27 µg ml⁻¹) was significantly ($P=0.0002$) higher than that the observed in the 10 sensitive (S) isolates (0.10 µg ml⁻¹). No difference was found ($P>0.05$) between S and NS isolates for fitness components, indicating that there was no fitness cost for the NS isolates.

Key-words: *Carica papaya*, stem-end rot, Botryosphaeriaceae, fungicide resistance, fitness.

Capítulo I

Introdução Geral

SENSIBILIDADE DE *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* DE POMARES DE MAMÃO DO NORDESTE DO BRASIL A DIFENOCONAZOLE

INTRODUÇÃO GERAL

1. A cultura do mamoeiro

O mamoeiro (*Carica papaya* L.), pertencente à família Caricaceae, é amplamente cultivado no mundo, tipicamente em regiões tropicais e subtropicais, cujo centro de origem é o Noroeste da América do Sul (DANTAS; LIMA, 2001; MENDONÇA; MEDEIROS, 2011).

O mamoeiro possui um rápido crescimento, sendo uma planta tropical semi-lenhosa. O caule é simples, reto e oco, contém folhas com cicatrizes proeminentes, apresenta forte dominância apical com raras ramificações, (SILVA et al., 2007). O sistema radicular é pivotante, com raiz principal bastante desenvolvida, de coloração branco-cremosa. (DANTAS; CASTRO NETO, 2000). A planta apresenta basicamente três tipos de flores que se distribuem, separadamente, em plantas do sexo masculino, feminino e hermafrodita (MARIN, 2004), sendo a última responsável pela produção de frutos de alto valor comercial. De forma geral, no Brasil o cultivo do mamoeiro ocorre pela utilização de populações ginóico-andromonóicas, sendo as principais variedades pertencentes ao grupo Solo e híbridos do grupo Formosa (JACOMINO; BRON; KLUGE, 2003).

O fruto do mamoeiro é consumido preferivelmente *in natura*, apesar de oferecer muitos produtos e subprodutos através da industrialização. Dentre os produtos industriais extraídos do mamoeiro destaca-se a papaína, enzima proteolítica de ação semelhante à da pepsina e tripsina, empregada para os mais variados usos nas indústrias têxteis, farmacêutica, de alimentos e de cosméticos (DANTAS; CASTRO NETO, 2000). O valor nutricional está relacionado com o seu teor de açúcares, pró-vitamina A (β -caroteno) e vitamina C (ácido ascórbico) além de ter uma boa atividade funcional associada à capacidade laxativa (ARAÚJO FILHO et al., 2002).

O mamão é produzido no Brasil durante quase todos os meses do ano, e as perspectivas de comercialização para os mercados interno e externo são bastante favoráveis. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de mamão, superado apenas pela Índia. A produção anual brasileira corresponde a cerca de 17% da produção mundial, que em 2012 foi equivalente a 1,6 milhões de toneladas (FAO, 2014; IBGE, 2014). Desse total, foram

exportadas cerca de 26 mil toneladas, gerando uma receita que excede os 39 milhões de dólares (POLL et al., 2013). As nações da União Européia são os principais importadores de mamão do Brasil e nos últimos 12 anos a comercialização com esse continente teve um crescimento de 600% (FAO, 2014). A região Nordeste é responsável por 60,4% da produção brasileira de mamão, com destaque para o estado da Bahia, que produziu 684 mil toneladas em 2012 (IBGE, 2014).

Para sustentar esse crescimento e expansão do mercado de mamão e atender às exigências dos mercados nacionais e estrangeiros, tem havido grande investimento em práticas agrícolas visando melhorar a qualidade dos frutos, especialmente em relação às condições fitossanitárias. As rigorosas medidas que são impostas pelos mercados para garantir a produção de frutas sadias e de qualidade são devido ao fato de que o mamão é consumido principalmente *in natura*.

2. Doenças do mamoeiro

O mamoeiro é uma planta, que por suas características fisiológicas e morfológicas, é muito sensível ao ataque de doenças e pragas (MENDONÇA; MEDEIROS, 2011). De maneira geral, as doenças de maior importância nas áreas produtoras do Brasil são causadas por fungos e vírus. Entre as doenças foliares destacam-se aquelas causadas pelos vírus como o mosaico do mamoeiro – *Papaya ringspot virus* type P (PRSV-P), a meleira do mamoeiro - *Papaya meleira virus* (PMeV) e o amarelo letal do mamoeiro – *Papaya lethal yellowing virus* (PLYV) e aquelas causadas por fungos como a varíola (*Asperisporium caricae* (Speg) Maulb), a mancha-de-aschochita (*Phoma caricae-papayae* (Tarr:) Punith), o oídio (*Oidium caricae* Noack), a mancha-de-corinespora (*Corynespora cassicola* (Berk & Curt) Wei). Na pós-colheita se destacam as podridões causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maulb., *P. carica-papayae*, *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissler, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *Phytophthora palmivora* Butler e *Rhizopus stolonifer* (Ehreb. Ex Fr.) Lind. (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003).

A presença de anormalidades morfológicas nos frutos, especialmente lesões causadas por patógenos, implica na inadequação para o mercado consumidor (RITZINGER; SOUZA, 2000). Diante disso, as podridões pós-colheita têm destacada importância para a cadeia produtiva do mamão, influenciando diretamente no rendimento financeiro da produção. Em

geral, os agentes causadores de podridões em pós-colheita apresentam uma característica comum, que é a capacidade de se estabelecerem no fruto imaturo no campo e os sintomas aparecerem na fase de pós-colheita (OLIVEIRA; SANTOS FILHO, 2004).

3. Podridão peduncular do mamoeiro

Dentre as doenças pós-colheita do mamão, a podridão peduncular é uma das mais preocupantes no Brasil (PEREIRA et al., 2012; SANTANA et al., 2007). A podridão peduncular do mamão é causada por um complexo de microrganismos. Este complexo inclui os fungos *C. gloeosporioides*, *F. solani*, *F. verticillioides*, *L. theobromae* e *P. caricae-papayae*, e o oomiceto *P. palmivora* (DANTAS; OLIVEIRA, 2006; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003). No entanto, a podridão peduncular causada por *L. theobromae* é uma das mais frequentes, constituindo importante doença na pós-colheita de mamão no Brasil. Provoca grandes perdas de produção e redução do valor comercial do fruto (DANTAS et al., 2003; NETTO et al., 2014; PEREIRA et al., 2012; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003).

Em épocas de grande intensidade pluviométrica, a incidência em frutos oriundos de lavouras que não adotam medidas de controle pode atingir 100% (REZENDE; MARTINS, 2005; SANTANA et al., 2007). Em estudo sobre o impacto das doenças fúngicas pós-colheita nas perdas de frutos de mamão durante a fase de comercialização, foram analisados frutos comercializados em quatro supermercados localizados na cidade de Recife (Estado de Pernambuco, Brasil), sendo constatado que a podridão-peduncular causada por *L. theobromae* foi responsável por 17% das perdas de frutos do grupo Formosa e 24% de perdas de frutos do grupo Solo (SILVA et al., 2002). Em outro estudo, realizado em cinco pontos de comercialização na Central de Abastecimento de Recife, frutos foram amostrados durante seis meses quanto à incidência de doenças na pós-colheita. A podridão-peduncular foi a principal doença constatada em mamão, sendo registrada em 39,7% dos frutos amostrados (DANTAS et al., 2003).

Embora os sintomas típicos da podridão peduncular causada por *L. theobromae* ocorram durante a pós-colheita, a infecção pelo patógeno ocorre no campo, em frutos imaturos e permanece num estado de quiescência, sem sintomas visuais, até que ocorram condições favoráveis nas quais inicia a colonização do tecido hospedeiro. Quando isso ocorre, normalmente no início de maturidade, os sintomas da doença se tornam aparentes no pedúnculo e se espalham pela superfície do fruto. No pedúnculo, as lesões cobrem uma ampla

margem de tecido, que fica com aspecto encharcado, e sua superfície torna-se rugosa devido aos picnídios formados, os quais são esféricos e agrupados. Com a progressão dos sintomas, as lesões tornam-se marrom-escuras e, em condições de alta umidade, ficam cobertas por um micélio cinza. O tecido parenquimático da área afetada do fruto é gradualmente destruído e o fruto perde sua consistência e turgidez (DANTAS; OLIVEIRA, 2006; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003). Além disso, *L. theobromae* é capaz de infectar os troncos do mamoeiro na região mediana, que em casos graves, pode levar à destruição de pomares inteiros (FREIRE et al., 2004; VIANA et al., 2007).

Lasiodiplodia theobromae ocorre principalmente em regiões tropicais e subtropicais onde causa uma variedade de doenças em mais de 500 espécies de plantas hospedeiras (BURGESS et al., 2006; FARR; ROSSMAN, 2014; PUNITHALINGAM, 1980). A ocorrência de *L. theobromae*, antes considerado um fungo oportunista e comumente associado a plantas estressadas, tem sido associada a podridões de caule e frutos, e vem ocasionando sérios problemas em fruteiras em todo o Brasil (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006; FREIRE et al., 2011). Além do mamoeiro, várias outras culturas de grande importância econômica são afetadas por *L. theobromae* no Brasil, especialmente abacateiro (*Persea americana* Mill.), aceroleira (*Malpighia glabra* L.), ateira (*Annona squamosa* L.), bananeira (*Musa* spp.), cacaueteiro (*Theobromae cacao* L.), cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), citrus (*Citrus* spp.), coqueiro (*Cocos nucifera* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), gravioleira (*Annona muricata* L.), guaranazeiro (*Paullinia cupana* Ducke), mamoneira (*Ricinus communis* L.), mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), mangueira (*Mangifera indica* L.), maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims), melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai), meloeiro (*Cucumis melo* L.) e videira (*Vitis* spp.) (CARDOSO et al., 2009; COSTA et al., 2010; FREIRE et al., 2004; FREIRE et al., 2011; LIMA et al., 2013; MARQUES et al., 2013; MUNIZ et al., 2012; NETTO et al., 2014 ; PEREIRA et al., 2012; TAVARES, 2002).

A disseminação de *L. theobromae* ocorre pelo vento, água, sementes, insetos, animais silvestres e pelo homem, via instrumentos agrícolas. No campo, o fungo pode penetrar na planta por ferimentos causados por insetos, pelo homem, por outros patógenos ou por aberturas naturais. Nos frutos, ocorre a penetração pelo pedúnculo ou por ferimentos (TAVARES, 2002).

4. Características e taxonomia de *Lasiodiplodia theobromae*

Lasiodiplodia theobromae é um membro do filo Ascomycota, classe, Dothideomycetes, ordem Botryosphaeriales e família Botryosphaeriaceae (MYCOBANK, 2014), que é rica em gêneros e contém numerosas espécies com distribuição cosmopolita (CROUS et al., 2006; PHILLIPS et al., 2008; LIU et al., 2012; PHILLIPS et al., 2013).

A identificação morfológica das espécies de Botryosphaeriaceae é complicada, pois os teleomorfos de muitas espécies raramente são encontrados na natureza e os anamorfos muitas vezes apresentam sobreposição de características morfológicas, levando muitas vezes a identificação errônea das espécies. Na última revisão taxonômica da família Botryosphaeriaceae, na qual foi utilizada análise multilocus baseada nas sequências combinadas dos genes ITS, EF1- α , β -tubulina, 18S rRNA (SSU) e 28S rRNA (LSU), 17 gêneros foram reconhecidos filogeneticamente, dentre os quais *Lasiodiplodia* Ellis & Everh. (PHILLIPS et al., 2013). Espécies deste gênero apresentam picnídios simples ou compostos, frequentemente agregados, estromáticos, ostiolados, subovóides para elipsóides-oblongos, com parede espessa e base truncada frequentemente pilosos e podem apresentar extrusão de conídios com aspecto de uma massa preta (MENEZES; OLIVEIRA, 1993). Os conídios variam de subovóide a elipsóide ovóide. Inicialmente os conídios são hialinos e asseptados, permanecendo hialinos por um longo tempo, finalmente tornam-se marrom-escuros e com um septo, havendo depósito de melanina na superfície interna da parede, dispostas longitudinalmente, dando aparência estriada aos conídios (ALVES et al., 2008). Há semelhança dos tamanhos dos conídios entre alguns gêneros de Botryosphaeriaceae. Entretanto, os conídios de *Lasiodiplodia* são asseptados e hialinos quando jovens, tornando-se escuros, septados, mais largos, ovóides e com parede estriada na maturidade (BURGESS et al., 2006). A principal característica morfológica que distingue *Lasiodiplodia* de outros gêneros relacionados é a presença de paráfises picnidiais e de estrias longitudinais em conídios maduros (BURGESS et al., 2006; PHILLIPS, 2007; PHILLIPS et al., 2008; SUTTON, 1980).

Nos últimos anos, estudos baseados nas sequências dos genes ITS e EF1- α levaram à identificação de espécies crípticas dentro do complexo de espécies *L. theobromae* (ALVES et al., 2008; ABDOLLAHZADEH et al., 2010; BEGOUDE et al., 2010; BURGESS et al., 2006; DAMM; CROUS; FOURIE, 2007; ISMAIL et al., 2012; PAVLIC et al., 2004; PAVLIC et al., 2008; ÚRBEZ-TORRES et al., 2012). Atualmente, 23 espécies de *Lasiodiplodia* são

reconhecidas filogeneticamente, dentre as quais *L. theobromae* (PHILLIPS et al., 2013; MACHADO; PINHO.; PEREIRA, 2014; NETTO et al., 2014). Com exceção de *L. theobromae*, todas as demais espécies foram descritas desde 2004 (PHILLIPS et al., 2013).

Até recentemente, dentre as espécies de Botryosphaeriaeae, somente *L. theobromae* havia sido registrada causando podridão peduncular em mamão no Brasil (DANTAS et al., 2003; DANTAS; OLIVEIRA, 2006; FREIRE; CARDOSO; VIANA, 2003; PEREIRA et al., 2012; TAVARES, 2002; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003) e em nível mundial (FARR; ROSSMAN, 2014). No entanto, um estudo com 166 isolados de *Lasiodiplodia* obtidos de pomares do Nordeste brasileiro, combinando análises morfológicas e filogenéticas dos genes ITS e EF1- α , revelou que além de *L. theobromae*, quatro outras espécies causavam podridão peduncular em mamão, sendo duas espécies previamente descritas em outros hospedeiros (*L. hormozganensis* Abdollahzadeh, Zare & A.J.L. Phillips e *L. pseudotheobromae* A.J.L. Phillips, A. Alves & Crous) e duas novas espécies (*Lasiodiplodia brasiliense* M.S.B. Netto, M.W. Marques & A.J.L. Phillips e *Lasiodiplodia euphorbicola* A.R. Machado & O.L. Pereira (syn = *Lasiodiplodia marypalme* M.S.B. Netto, M.W. Marques, A.J.L. Phillips & M.P.S. Câmara). Em relação à distribuição, *L. theobromae* foi a espécie prevalente (69,9 %) nos pomares de mamão do Nordeste brasileiro (NETTO et al., 2014).

5. Manejo da podridão peduncular do mamoeiro

A colonização de fungos em frutos de mamoeiro pode determinar perdas quantitativas e qualitativas, decorrentes dos efeitos da exteriorização do fungo e suas consequências como descolorações, manchas e produção de odores desagradáveis inviabilizando a sua comercialização. Com o objetivo de minimizar as perdas ocasionadas por esses patógenos são empregadas medidas de manejo de doenças, as quais são baseadas em princípios epidemiológicos, ecológicos e econômicos. O manejo das podridões pós-colheita não se resume à aplicação de tratamentos químicos e utilização de técnicas de conservação após a colheita, constitui-se na verdade, no emprego de um conjunto de medidas que envolvem o eficiente controle de fontes de inóculo no pomar (ZAMBOLIM et al., 2002). No caso do mamão são recomendados os seguintes procedimentos para o controle de doenças na pós-colheita: colher frutos no estágio de maturação ideal; evitar ferimentos na epiderme; mantê-los limpos e realizar rigorosa sanitização de todas as instalações; realizar tratamento pós-

colheita, como imersão dos frutos em água quente e/ou fungicidas registrados para a cultura; e armazenamento em condições que retardem ou diminuam o apodrecimento de frutos sem afetar a qualidade dos mesmos (DANTAS; OLIVEIRA, 2006).

O manejo da podridão peduncular consiste em práticas para prevenir a infecção e retardar o desenvolvimento dos sintomas. Para o controle eficiente da doença é necessário que as práticas de manejo se estendam desde o campo até a pós-colheita. As medidas incluem pulverizações periódicas com fungicidas a partir do início da frutificação, evitar ferimentos na superfície dos frutos durante a colheita, tratamento térmico, armazenagem a baixas temperaturas e tratamento químico com fungicidas na pós-colheita (DANTAS; OLIVEIRA, 2006; PEREIRA et al., 2012; SANTANA et al., 2007; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003). O controle químico, quando utilizado isoladamente, não tem demonstrado elevada eficácia no controle da podridão peduncular, sendo então indicada a adoção de uma série de medidas adicionais (PEREIRA; SILVA; RIBEIRO, 2006). Dentre essas medidas, o tratamento hidrotérmico pela imersão dos frutos em água quente a 48°C por 20 minutos, seguido de outra imersão em água fria a 8°C por igual período, tem sido utilizado nos frutos destinados à exportação com resultados variáveis em relação à podridão-peduncular, embora eficiente no controle da antracnose (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2003).

A adoção do manejo integrado é essencial para o sucesso no controle da podridão peduncular do mamão causada por *L. theobromae*. Entretanto, os produtores tentam minimizar os efeitos dessa doença utilizando medidas de manejo isoladamente, com destaque para o controle químico (PEREIRA et al., 2012; SANTANA et al., 2007).

6. Controle químico de doenças de plantas e resistência a fungicidas

O controle químico de doenças de plantas é talvez uma das medidas mais empregadas na agricultura, pelo fato de prevenir infecções de patógenos que podem se instalar na cultura e/ou erradicar infecções já instaladas nos tecidos da planta hospedeira (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). A utilização deste tipo de controle é muito difundida entre os produtores rurais, pois o uso de fungicidas é considerado eficiente economicamente, assim como essencial para a manutenção da sanidade e alta qualidade dos produtos agrícolas (KIMATI, 2011; MA; MICHAILIDES, 2005).

Os fungicidas podem atuar como inibidores de vários processos metabólicos vitais ou ter ação específica sobre a célula fúngica (GHINI; KIMATI, 2000). A partir da década de

1960, fungicidas com mecanismos de ação específica começaram a ser desenvolvidos e comercializados. Estes processos podem ser exemplificados como a inibição da biossíntese de esteróis, síntese de lipídios e membrana celular, síntese de ácidos nucléicos, inibição da mitose e divisão celular, inibição da síntese de proteínas e aminoácidos, e inibição da respiração (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). Os fungicidas de ação específica são absorvidos pelas plantas dentro das quais se translocam somente no órgão tratado, pelo xilema ou pelo floema. Também são mais seletivos a um número limitado de grupos taxonômicos, podendo a sensibilidade ser restrita a um gênero ou espécie e, mais comumente, a um filo ou classe de fungos (GHINI; KIMATI, 2000).

Dentre os principais grupos de fungicidas sistêmicos, os que atuam na interrupção das funções da membrana celular têm ampla utilização na agricultura. As membranas celulares são essenciais para a vida da célula. A membrana plasmática envolve a célula, define seus limites, e mantém as diferenças essenciais entre o citosol e o meio extracelular. As membranas plasmáticas de eucariotos, dentre os quais os fungos, contêm quantidades particularmente grandes de esterol. As moléculas de ergosterol, presentes na membrana de células fúngicas, aumentam as propriedades de barreira da bicamada lipídica e devido a seus rígidos anéis planos de esteróide, diminuem a mobilidade e tornam a bicamada lipídica menos fluída. A redução na disponibilidade de ergosterol resulta no rompimento da membrana e no extravasamento de solutos iônicos. Como a síntese do ergosterol é uma característica da maioria dos fungos superiores (Ascomycota, Basidiomycota e Fungos Mitospóricos), a inibição da biossíntese de esteróis é a base de alguns compostos fungicidas muito utilizados na atualidade (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007).

Os fungicidas que atuam através da inibição do esterol podem ser divididos em dois grupos: a) os inibidores da demetilação do C-14 e b) os inibidores de D^{8,7} isomerase e D¹⁴ redutase. Os inibidores da demetilação do C-14 (DMIs) compreendem os fungicidas classificados como pirimidinas, piridinas, piperazinas, imidazóis e triazóis. Um composto intermediário na síntese de ergosterol é o lanosterol. Os compostos inibem a passagem do lanosterol para 4,4-dimetil-colesta-8,14,24-trienol. O passo seguinte é a demetilação na posição C-14, que é catalizada pelo citocromo P-450 (enzima esterol-C-14 demetilase). Os fungicidas mencionados inibem esse citocromo, impedindo a demetilação. O processo biossintético de formação de esteróis continua, mas o resultado é que em vez de se formar ergosterol e outros esteróis demetilados, formam-se compostos metilados. Os esteróis metilados cumprem algumas funções na constituição das membranas, mas não conseguem executar outras funções específicas, o que leva a um desequilíbrio entre os lipídios das

membranas, com inibição de fosfolipídios e acúmulo de ácidos graxos livres, que chegam a níveis tóxicos para os fungos. A falta de ações específicas dos esteróis demetilados, mais o desequilíbrio lipídico, levam os fungos à morte. O nível de inibição pelo citocromo P-450 é variável de composto para composto. Por isso, o grau de eficiência dos diversos fungicidas contra diversas espécies de fungos é também variável (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007).

Entre os DMIs encontram-se muitos fungicidas comercialmente bem sucedidos, dentre os quais os pertencentes ao grupo dos triazóis. Os triazóis são fungicidas orgânicos, de ação acropetal (via xilema), que apresentam elevada fungitoxicidade, rápida penetração e translocação nos tecidos vegetais. Possuem ação curativa e elevado efeito residual. Como protetores, apresentam ação tóxica sobre a germinação de esporos, formação do tubo germinativo e do apressório. Entretanto, essa proteção é parcial, uma vez que pode ocorrer a penetração do patógeno em tecidos tratados. Na ação curativa, o desenvolvimento do haustório e/ou o crescimento micelial no interior dos tecidos do hospedeiro são inibidos pela presença do fungicida (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). Os princípios ativos mais importantes do grupo dos triazóis incluem: cyproconazole, difenoconazole, flutriafol, propiconazole, tebuconazole, triadimefon e triadimenol (AZEVEDO, 2007; KUCK; LEADBEATER; GISI, 2012; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007).

No Brasil, somente tiabendazole (grupo dos metil benzimidazol carbamatos - MBC) é registrado para o controle de *L. theobromae* em mamão, mas restrito ao tratamento em pós-colheita (MAPA, 2014). No entanto, vários outros princípios ativos são aplicados nos pomares do Nordeste brasileiro, entre os quais os triazóis difenoconazole e tebuconazole (PEREIRA et al., 2012), registrados para o controle de *A. caricae*, *C. gloeosporioides* e *O. caricae* (MAPA, 2014).

Fungicidas são de grande ajuda no manejo integrado para a manutenção de doenças em níveis economicamente aceitáveis garantindo uma melhor qualidade de produção. No entanto sua efetividade pode ser afetada por diversos fatores, como condições climáticas desfavoráveis, cobertura de pulverização inadequada, dosagem imprópria, erro na tecnologia de aplicação e redução da sensibilidade do fungo-alvo (AZEVEDO, 2007; ZAMBOLIM; VENANCIO; OLIVEIRA, 2007). Entre estes, a redução na sensibilidade, comumente conhecida como resistência, se tornou comum após a introdução de fungicidas com modo específico de ação (AVENOT; MICHAILIDES, 2010; BRENT; HOLLomon, 2007a; BRENT; HOLLomon, 2007b; DZHAVAKHIYA et al., 2012; KUCK; LEADBEATER; GISI, 2012; MA; MICHAILIDES, 2005).

Resistência a fungicida é uma adaptação estável e herdável de um fungo a um fungicida, resultando em reduzida sensibilidade do fungo ao fungicida (BRENT; HOLLomon, 2007a; GHINI; KIMATI, 2000; MA; MICHAILIDES, 2005). A resistência pode resultar de mutações simples ou múltiplas dos genes. Isolados resistentes normalmente surgem de uma taxa muito baixa de mutação genética natural, e esses isolados são menos afetados ou não inibidos totalmente por uma determinada concentração de aplicação de um fungicida. Uma vez que o fungicida pode controlar eficazmente os isolados sensíveis, os isolados resistentes podem se tornar dominantes nas populações dos patógenos sob pressão de seleção do uso de fungicidas com o tempo, portanto, falhas no controle da doença podem ocorrer eventualmente (MA; MICHAILIDES, 2005).

A resistência de fungos a fungicidas também pode ser definida como quantitativa ou qualitativa, e resistência cruzada ou múltipla. A resistência quantitativa ou multigênica é governada por um conjunto de genes com efeitos menores e relaciona-se mais com fungicidas com risco moderado. A resistência qualitativa ou oligogênica é governada por um ou poucos genes dominantes e para muitos fungicidas a mutação em um único gene é suficiente para o surgimento de isolados não sensíveis. A resistência cruzada refere-se à resistência de um fungo a dois ou mais fungicidas com o mesmo mecanismo de ação ou similaridade química, conferida pelo mesmo fator genético. A resistência múltipla refere-se àquela que é conferida por diferentes fatores genéticos, ou seja, a resistência a fungicidas com modo de ação diferente (AZEVEDO, 2007; GHINI; KIMATI, 2000; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007).

Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento de isolados não sensíveis como produto aplicado, intensidade de uso e características do organismo (ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007). A aplicação de fungicida pode ser manipulada em função de estratégias anti-resistência. Estas estratégias são baseadas no princípio de que quando há aplicação do fungicida, também é exercida uma pressão de seleção sobre a população do patógeno, podendo, em longo ou curto prazo, dependendo da resistência genética envolvida, resultar na seleção e predominância de indivíduos não sensíveis na população do fungo alvo (GHINI; KIMATI, 2000). As características do patógeno que contribuem para a ocorrência de isolados não-sensíveis a fungicidas são o tamanho da população do fungo no momento da aplicação (quanto maior a população, maior a chance de ocorrência de isolados não-sensíveis) e a presença de reprodução sexual (a qual pode aumentar as chances de surgir isolados não-sensíveis). Logo após o surgimento de uma nova população em decorrência da utilização de fungicidas, a seleção de isolados não-sensíveis na natureza pode ocorrer em função do próprio

patossistema, devido ao potencial reprodutivo do patógeno, da sua adaptabilidade ao meio e da pressão de seleção exercida sobre a população sensível (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2001).

A velocidade do desenvolvimento de resistência pode ser influenciada por vários fatores, tais como: a base genética da resistência, as características da linhagem resistente, a natureza do patógeno e da doença e a pressão de seleção exercida pelo uso do fungicida com modo de ação específico. A resistência adquirida pela população do patógeno ao produto é diretamente proporcional às doses aplicadas, à frequência de aplicação, ao grau de cobertura obtido, à persistência na cultura ou no solo e ao tamanho da área tratada. Dessa forma, a tomada de decisão de como vai ser feito o controle químico é um dos pontos fundamentais para evitar o surgimento da resistência (GHINI; KIMATI, 2000).

A resistência a fungicidas pode ser conferida por vários mecanismos, incluindo: (a) um sítio-alvo alterado, o que reduz a ligação do fungicida; (b) a síntese de uma enzima alternativa capaz de substituir a enzima-alvo; (c) a superprodução do fungicida-alvo; (d) um efluxo ativo ou redução da absorção do fungicida; (e) uma degradação metabólica do fungicida. No entanto, ainda existem alguns mecanismos desconhecidos que também podem conferir essa resistência a fungicidas (CAPOTE et al., 2012; DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008; MA; MICHAILIDES, 2005).

Um melhor aproveitamento das estratégias de manejo e prevenção da resistência se dá através do entendimento de fatores relacionados com a origem da resistência e de como esta se desenvolveu e se disseminou. A resistência também pode ser um auxiliar importante no entendimento a nível molecular do mecanismo de ação específico de alguns fungicidas (AVENOT; MICHAILIDES, 2010). O conhecimento dos mecanismos moleculares de resistência permite o monitoramento das populações não-sensíveis dos fungos de maneira rápida e eficiente, permitindo direcionar a utilização dos princípios ativos e grupos de fungicidas de maneira eficiente (MA; MICHAILIDES, 2005; SÁNCHEZ-TORRES; TUSET, 2011).

A adaptabilidade, ou seja, a habilidade de uma linhagem do fungo se desenvolver, reproduzir, sobreviver e causar doença, comparada a outras linhagens nas mesmas condições também é um aspecto importante a ser investigado na resistência a fungicidas (MA; MICHAILIDES, 2005; ZAMBOLIM, 2008). Variáveis como taxa de crescimento micelial, potencial reprodutivo e virulência, dentre outros, são apenas alguns exemplos de componentes de adaptabilidade em populações de fitopatógenos (ANTONOVICS; ALEXANDER, 1989; BROWN, 2006; ZHAN; MCDONALD, 2013).

Resistência a fungicidas, por si só, é um importante condicionador de adaptabilidade nos campos em que os fungicidas são aplicados. Neste cenário, os indivíduos resistentes estão em vantagem porque eles superam a "barreira seletiva" exercida pelo uso de fungicidas, completando seus ciclos de vida e deixando mais descendentes do que os indivíduos suscetíveis. No entanto, a resistência pode ter um custo de adaptabilidade, pois na ausência de uma "barreira seletiva" os indivíduos resistentes podem ter menor capacidade competitiva. Em outras palavras, a resistência pode ter um efeito pleiotrópico, resultando em menor adaptabilidade. Alternativamente, isolados resistentes podem ser tão bem adaptados quanto os isolados sensíveis e persistir por um longo tempo, mesmo sem a utilização de fungicidas (MA; MICHAILIDIS, 2005). Em relação a esse aspecto, quando ocorre mutação em um ou poucos genes que conferem características importantes, a adaptabilidade do isolado não-sensível pode ser reduzida, mas se esses genes apresentam características pouco importantes, o isolado não-sensível apresenta alta adaptabilidade (GHINI; KIMATI, 2000).

A utilização de DMIs na agricultura teve início nos anos 1970 e, desde a década de 1980, problemas de resistência com o uso destes têm sido relatados em vários fungos fitopatogênicos (MA et al., 2002; MA; MICHAILIDES, 2005). Os principais mecanismos de resistência em isolados não-sensíveis a DMIs envolvem mutações ou super expressão do gene CYP51, que codifica a esterol 14 α -demetilase, a enzima alvo dos fungicidas DMIs (CAPOTE et al., 2012; KUCK; LEADBEATER; GISI, 2012; MA; MICHAILIDES, 2005; SÁNCHEZ-TORRES; TUSET, 2011).

Uma vez que os fungicidas são amplamente utilizados para o controle de doenças do mamoeiro no Brasil e a quantidade de resíduos de fungicidas é uma das principais limitações para a comercialização do fruto, é necessário investigar a sensibilidade de *L. theobromae* aos principais fungicidas empregados no campo e no período pós-colheita, de modo que as medidas de manejo possam ser conscientemente implementadas. Nesse contexto, recentemente foi realizado um estudo pioneiro no Brasil, e em nível mundial, de avaliação de resistência de *L. theobromae* a fungicidas, dentre os quais ao triazol tebuconazole (PEREIRA et al., 2012). Dentre os 120 isolados de *L. theobromae*, obtidos de pomares de mamoeiro do Nordeste brasileiro, as concentrações efetivas do fungicida para inibir 50% do crescimento micelial (CE₅₀) variaram de 0,14 a 4,05 $\mu\text{g/mL}$, com média de 0,49 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, foram detectados isolados de *L. theobromae* com baixa sensibilidade a tebuconazole, sendo que a CE₅₀ de isolados não-sensíveis (1,18 $\mu\text{g/mL}$) foi significativamente superior à de isolados

sensíveis (0,25 µg/mL). A adaptabilidade de isolados sensíveis e não-sensíveis não foi comparada nesse estudo.

Considerando que o fungicida difenoconazole é intensivamente utilizado em pomares de mamão do Nordeste brasileiro, que o risco de ocorrência de casos de resistência aumenta com o uso contínuo do fungicida ou de outros fungicidas com mesmos mecanismos de ação, e que até o momento não foi investigada a sensibilidade das populações de *L. theobromae* a esse fungicida, os principais objetivos dessa dissertação foram (a) estimar a sensibilidade de isolados de *L. theobromae* de pomares de mamão do Nordeste brasileiro a difenoconazole e (b) determinar a relação entre sensibilidade a esse fungicida e parâmetros relacionados à adaptabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHZADEH, J.; JAVADI, A.; MOHAMMADI-GOLTAPPEH, E.; ZARE, R.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Persoonia**, Leiden, v. 25, p.1-10, 2010.
- ALVES, A.; CROUS, P. W.; CORREIA, A.; PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2008.
- ANTONOVICS, J.; ALEXANDER, H. M. The concept of fitness in plant fungal pathogen systems. In: Leonard, K. J.; Fry, W. E. (Eds.). **Plant disease epidemiology**. New York: McGraw-Hill, 1989. p. 185-214.
- ARAÚJO FILHO, G. C.; PAZ, J. S.; CASTRO, F. A.; SEABRA FILHO, M. **Produtor de mamão**. Fortaleza: Instituto Centro de Ensino Tecnológico, 2002. 72 p.
- AVENOT, H. F.; MICHAILIDES, T. J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (sdhi) fungicides in phytopathogenic fungi. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 6, p. 643-651, 2010.
- AZEVEDO, L. A. S. **Fungicidas sistêmicos: teoria e prática**. Campinas: EMOPI, 2007. 283 p.
- BEGOUDE, B. A. D.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; ROUX, J. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar. **Mycological Progress**, Heidelberg, v. 9, n. 1, p. 101-123, 2010.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e Tropical: conseqüências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 2, p. 119-127, 2001.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?** Brussels: Fungicide Resistance Action Committee, 2007a. 56 p.
- BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance: the assessment of risk**. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee, 2007b. 53 p.
- BROWN, J. K. M. Surveys of variation in virulence and fungicide resistance and their application to disease control. In: COOKE, B. M.; JONES, D. G.; KAYE, B. (Eds.). **The epidemiology of plant diseases**. 2. ed. Dordrecht: Springer, 2006. p. 81-115.
- BURGESS, T. I.; BARBER, P. A.; MOHALI, S.; PEGG, G.; de BEER, W.; WINGFIELD, M. J. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. **Mycologia**, Bronx, v. 98, n. 3, p. 423-435, 2006.
- CAPOTE, N.; PASTRANA, A. M.; AGUADO, A.; SÁNCHEZ-TORRES, P. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: CUMAGUN, C. J. R. (Ed.). **Plant pathology**. Rijeka: InTech, 2012. p. 151-202.

- CARDOSO, J. E.; BEZERRA, M. A.; VIANA, F. M. P.; SOUSA, T. R. M.; CYSNE, A. Q.; FARIAS, F. C. Endophyte occurrence of *Lasiodiplodia theobromae* in cashew tissues and its transmission by vegetative propagules. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 262–266, 2009.
- COSTA, V. S. O.; MICHEREFF, S. J.; LIMA, G. S. A.; MARTINS, R. B.; GAVA, C. A. T.; MIZUBUTI, E. S. G.; CÂMARA, M. P. S. Species of Botryosphaeriaceae associated on mango in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.127, n. 4, p. 509-519, 2010.
- CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F.O.; PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 55, n. 2, p. 235-253, 2006.
- DAMM, U.; CROUS, P. W.; FOURIE, P. H. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. **Mycologia**, Bronx, v. 99, n. 5, p. 664-680, 2007.
- DANTAS, J. L. L.; CASTRO NETO, M. T. Aspectos botânicos e fisiológicos. In: TRINDADE, V. A. (Org.). **Mamão - produção: aspectos técnicos**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 11-14.
- DANTAS, J. L. L.; LIMA, J. F. Seleção e recomendação de variedades de mamoeiro - avaliação de linhagens e híbridos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 617-621, 2001.
- DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A. Doenças do mamão. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAQ, D.; DANTAS, S. A. F.; TAVARES, S. C. C. H. (Eds). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. p. 695-728.
- DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A.; MICHEREFF, S. J.; NASCIMENTO, L. C.; GURGEL, L. M. S.; PESSOA, W. R. L. S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 528-533, 2003.
- DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 286-295, 2008.
- DZHAVAKHIYA, V.; SHCHERBAKOVA, L. ; SEMINA, Y.; ZHEMCHUZHINA, N.; CAMPBELL, B. Chemosensitization of plant pathogenic fungi to agricultural fungicides. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, n. 87, p.1-9, 2012.
- FAO. **FAOSTAT** [on line]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/index.html>>. Acesso em: 20 jan. 2014.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. **Fungal databases: fungus-host distributions** [on line]. Beltsville: Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS-USDA, 2014. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/fungushost/fungushost.cfm>>. Acesso em: 18 jan. 2014.

FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Eds.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília, Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 687 p.

FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; MARTINS, M. V. V. Status of *Lasiodiplodia theobromae* as a plant pathogen in Brazil. **Essentia**, Sobral, v. 12, n. 2, p. 53-71, 2011.

FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SANTOS, A. A. **Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004, 6 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 91).

GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p

IBGE. **SIDRA**: Sistema IBGE de recuperação automática [on line]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2014. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda>>. Acesso em: 18 jan. 2014

ISMAIL, A. M.; CIRVILLERI, G.; POLIZZI, G.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; LOMBARD, L. *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. **Australasian Plant Pathology**, Canberra, v. 41, n. 6, p. 649-660, 2012.

JACOMINO, A. P. BRON, L. U.; KLUGE, R. A. Avanços em tecnologia pós-colheita de mamão. In: MARTINS, D. S. (Ed.). **Papaya Brasil**. Vitória: Instituto Capixapa de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, 2003. p. 283-293.

KIMATI, H. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 343-365.

KUCK, K. H.; LEADBEATER, A.; GISI, U. FRAC mode of action classification and resistance risk of fungicides. In: KRÄMER, W.; SCHIRMER, U.; JESCHKE, P.; WITSCHEL, M. (Eds.). **Modern crop protection compounds**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012. p. 539-558.

LIMA, J. S.; MOREIRA, R. C.; CARDOSO, J. E.; MARTINS, M. V. V.; VIANA, F. M. P. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 39, n. 2, p. 81-88, 2013

LIU, J. -K.; PHOOKAMSAK, R.; DOILOM, M.; WIKKEE, S.; LI, Y. -M.; ARIYAWANSHA, H.; BOONMEE, S.; CHOMNUNTI, P.; DAÍ, D. -Q.; BHAT, J. D.; ROMERO, A. I.; ZHUANG, W. -Y.; MONKAI, J.; JONES, E. B. G.; CHUKEATIROTE, E.; KO-KO, T. W.; ZHAO, Y. -C.; WANG, Y.; HYDE, K. D. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 57, n. 1, p. 149-210, 2012.

MA, Z.; MICHAILIDES, T. J. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. **Crop protection**, Guildford, v. 24, n. 10, p. 853-863, 2005.

MA, Z.; MORGAN, D. P.; FELTS, D.; MICHAILIDES, T. J. Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio to tebuconazole. **Crop Protection**, Guildford, v. 21, n. 9, p. 829–835, 2002.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, Kunming, 2014. (Aceito para publicação, DOI 10.1007/s13225-013-0274-1)

MAPA. **AGROFIT** - Sistema de agrotóxicos fitossanitários [on line]. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 jan. 2014.

MARIN, S. L. D. **Mamão papaya: produção, pós-colheita e mercado**. Fortaleza: Instituto Frutal, 2004. 82 p.

MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MORAIS JUNIOR, M. A.; BARBOSA, M. A. G.; SOUZA, B. O.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunming, v. 61, n. 1, p.181-193, 2013.

MENDONÇA, V.; MEDEIROS, L. F. **Cultura do cajueiro, do coqueiro e do mamoeiro**. Mossoró: Universidade Federal Rural do Semiárido 2011. 81 p. (UFERSA. Boletim Técnico, 3).

MENEZES, M; OLIVEIRA, S. M. A (Eds.). **Fungos fitopatogênicos**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco - Imprensa Universitária, 1993. 277 p.

MUNIZ, C. R.; FREIRE, F. C. O.; VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; CORREIA, D.; JALINK, H.; KEMA, G. H. J.; SILVA, G. F.; , M. I. F. Polyclonal antibody-based ELISA in combination with specific PCR amplification of internal transcribed spacer regions for the detection and quantitation of *Lasiodiplodia theobromae*, causal agent of gummosis in cashew nut plants. **Annals of Applied Biology**, London, v. 160, n. 3, p. 217-224, 2012.

MYCOBANK. **Fungal databases: nomenclature and species bank** [on line]. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, 2014. Disponível em: <<http://www.mycobank.org/>>. Acesso em: 20 jan. 2014

NETTO, M. S. B.; ASSUNÇÃO, I. P.; LIMA, G. S. A.; MARQUES, M. W.; LIMA, W. G.; MONTEIRO, J. H. A.; BALBINO, V. Q.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. **Fungal Diversity**, Kunming, 2014. . (Aceito para publicação, DOI 10.1007/s13225-014-0279-4)

OLIVEIRA, A. A. R.; SANTOS FILHO, H. P. **Podridões pedunculares**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 2 p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Mamão em Foco, 22).

PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T. A.; GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, M. J. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 50, n. 1, p. 313-322, 2004.

- PAVLIC, D.; WINGFIELD, M. J.; BARBER, P.; SLIPPERS, B.; HARDER, G. E. S.; BURGESS, T. I. Seven new species of the Botryosphaeriaceae from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, Bronx, v. 100, n. 6, p. 851-866, 2008.
- PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 6, p. 572-578, 2006.
- PEREIRA, A. V. S.; MARTINS, R. B.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, M. B.; CÂMARA, M. P. S. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, V. 132, n. 4, p. 489-498, 2012.
- PHILLIPS, A. J. L. **Key to the various lineages in "Botryosphaeria"** [on line]. Lisboa: Centro de Recursos Microbiológicos/Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa, 2007. Disponível em: <http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site/key.htm>. Acesso em: 05 jan. 2014.
- PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z.; CROUS, P. W. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 76, n. 1, p. 51-167, 2013.
- PHILLIPS, A. J. L.; ALVES, A.; PENNYCOOK, S. R.; JOHNSTON, P. R.; RAMALEY, A.; AKULOV, A.; CROUS, P. W. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. **Persoonia**, Leiden, v. 21, n. 1, p. 29-55, 2008.
- POLL, H.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; REETZ, E. R.; CARVALHO, C.; SILVEIRA, D. N. (Eds.). **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2013**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2013. 140p.
- PUNITHALINGAM, E. **Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae***. Vaduz: Pat. J. Cramer, 1980. 123 p.
- REZENDE, J. A. M.; MARTINS, M. C. Doenças do mamoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 435-443.
- RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. Fitossanidade na exportação de mamão. In: RITZINGER, C. H. S. P.; SOUZA, J. S. (Eds.). **Mamão: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p. 9-11.
- SÁNCHEZ-TORRES, P.; TUSET, J. J. Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 159-165, 2011.
- SANTANA, E. N.; MARTINS, M. V. V.; LIMA, I. M.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; VIEIRA, P. Manejo das doenças do mamoeiro. In: NÚCLEO DE ESTUDOS EM FITOPATOLOGIA - UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. **Manejo Integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007. p. 107-127.

SILVA, C. F. B.; MICHEREFF, S. J.; ALBUQUERQUE, H. S.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, S. M. A.; DANTAS, S. A. F. Epidemiologia de enfermidades fúngicas poscolheita em frutos de papaya. **Boletín Micológico**, Valparaíso, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2002.

SILVA, J. A. T.; RASHID, Z.; NHUT, D. T.; SIVAKUMAR, D.; GERA, A.; SOUZA JR, M. T.; TENNANT, P. F.; Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology. **Tree and Forestry Science and Biotechnology**, Tokyo, v. 1, n. 1, p. 47-63, 2007.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

TAVARES, S. C. C. H. Epidemiologia e manejo integrado de *Botryodiplodia theobromae* - situação atual no Brasil e no mundo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 3, p. 46-52, 2002.

ÚRBEZ-TORRES, J. R.; PEDUTO, F.; STRIEGLE, R. K.; URREA-ROMER, J. E. O.; RUPE, J. C.; CARTWRIGHT, R. D.; GUBLER, W. D. Characterization of fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases in Arkansas and Missouri. **Fungal Diversity**, Kunning, v. 52, n. 1, p. 169-189, 2012.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Manejo das doenças do mamoeiro. In: MARTINS, D. S.; COSTA, A. F. S. (Eds.). **A cultura do mamoeiro**: tecnologias de produção. Vitória: Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, 2003. p. 231-267.

VIANA, F. M. P.; CARDOSO, J. E.; SOUZA, R. N. M.; HOLANDA, V. O. **Controle da podridão-da-haste-do-mamoeiro no estado do Ceará**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 133).

ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas. In: Zambolim, L.; Picanço, M. C.; Silva, A. A.; Ferreira, L. R.; Ferreira, F. A. (Orgs.). **Produtos fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas)**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2008. p. 213-262.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; VALE, F. X. R. Controle de doenças pós-colheita de frutas tropicais. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado**: fruteiras tropicais – doenças e pragas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2002. p. 443-511.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S.; OLIVEIRA, S. H. F. (Eds.). **Manejo da resistência de fungos a fungicidas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 168 p.

ZHAN, J.; MCDONALD, B. A. Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 131-153, 2013.

Capítulo II

Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Northeastern Brazil papaya orchards to difenoconazole

Submissão: **Journal of Phytopathology**
Berlin, Alemanha
JCR = 1,23

Lasiodiplodia theobromae sensitivity to difenocnazole

Department of Agronomy, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Northeastern Brazil papaya orchards to difenoconazole

Moara Alexandrino Bandeira¹, Susan Satie Tsuji¹, Ricardo Brainer Martins², Sami Jorge Michereff¹ and Marcos Paz Saraiva Câmara¹

1 Department of Agronomy, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, 52171-900, Pernambuco, Brazil

2 Arapiraca Campus, Federal University of Alagoas, Arapiraca, 57309-005, Alagoas, Brazil

Correspondence

S.J. Michereff, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: sami@depa.ufrpe.br

Abstract

Stem-end rot, caused by *Lasiodiplodia theobromae*, is an important postharvest disease of papaya in Brazil. There are no data available on the sensitivity of *L. theobromae* to difenoconazole (demethylation-inhibiting-DMI group), widely used in papaya orchards in Northeastern Brazil. Thus, the effective concentration that results in 50% of mycelial growth inhibition (EC_{50}) of 107 isolates, representing five populations of the pathogen was estimated *in vitro*. Five components of fitness (mycelial growth on fungicide-free agar medium, optimum temperature for mycelial growth, spore production, osmotic sensitivity and virulence on papaya fruits) were measured for the 10 isolates with lower and high values of EC_{50} . The estimated EC_{50} values of isolates ranged from 0.01 to 15.40 $\mu\text{g a.i. ml}^{-1}$. The EC_{50} values higher than 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ occurred in 2.8% of the isolates, while 64.5% of the isolates had EC_{50} values between 0.01 and 1.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The mean EC_{50} value for the non-sensitive (NS) isolates (7.27 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was significantly ($P = 0.0002$) higher than that for the sensitive (S) isolates (0.10 $\mu\text{g ml}^{-1}$). No difference was found ($P > 0.05$) between S and NS isolates for fitness components, indicating that there was no fitness cost for the NS isolates.

Keywords *Carica papaya*, Botryosphaeriaceae, fitness, fungicide resistance, stem-end rot.

Introduction

Papaya (*Carica papaya* L.) is produced in Brazil for almost every month of the year and the prospects of trade in the domestic and/or export market are quite favorable. The annual production in Brazil corresponds to about 17% of overall global production, which in 2012 was equivalent to 1.6 million tons (Food and Agriculture Organization 2014). Of that

total, about 26 thousand tons were exported, generating revenues in excess of US\$ 39 million (Poll et al. 2013). The nations of the European Union are Brazil's main export partners, and in the last 13 years the commercialization of papaya to the EU has grown 600% (Food and Agriculture Organization 2014).

The Northeast region is responsible for 60.4% of the Brazilian papaya production (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2014). In order to sustain the growth and expansion of the papaya market to meet the demands of both domestic and foreign markets, there has been significant investment in practices aimed at improving the fruit quality, especially in relation to the phytosanitary conditions and management of fungicide residues. The strict measures which are imposed by the markets to ensure the production of healthy and quality fruit are due to the fact that papaya is mainly consumed fresh (Ritzinger and Souza 2000).

Abnormalities of papaya fruit such as spots and lesions caused by inadequate transportation and storage or pathogen can depreciate the product and reduce its price. Losses caused by postharvest diseases are one of the main problems in the marketing channel, especially for fruit destined for export (Ritzinger and Souza 2000; Santana et al. 2007). Stem-end rot, caused by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl, is an important postharvest disease of papaya in Brazil and worldwide, as it causes production losses and reduction in the commercial value of the fruit (Paull et al. 1997; Freire et al. 2004; Ventura et al. 2004; Dantas and Oliveira 2006; Pereira et al. 2012). In periods of high rainfall, the disease incidence on fruits harvested from orchards that do not adopt any control measures may reach 100% (Rezende and Martins 2005; Santana et al. 2007).

Stem-end rot of papaya starts in the field, where the pathogen is established in immature fruit and remains quiescent stage without onset of symptoms until favorable conditions occur for the beginning of the infection process. Symptoms begin in the stem region and advance to the entire fruit. The pathogen causes dark lesions on fruit that with the

progression of the disease have a wide margin of soaked tissue. It is a fast-growing fungus, usually promoting rot and mummification of a large part of the fruit. The parenchymal tissue of affected area of the fruit is gradually destroyed and the fruit loses its consistency and turgidity (Ventura et al. 2004; Rezende and Martins 2005; Dantas and Oliveira 2006). *Lasiodiplodia theobromae* is also capable to infecting the trunks of the papaya in the mid region, which in severe cases can lead to the destruction of entire orchards (Freire et al. 2004; Viana et al. 2007).

Papaya stem-end rot management consists in practices to prevent infection and delay symptom development. Therefore, for effective control of the disease it is necessary to extend management practices from the field to postharvest activities. These measures include: regular spraying with fungicides from early fruiting, preventing injuries on the fruit surface during harvest, heat treatment, storage at low temperatures and chemical treatment with postharvest fungicides (Ventura et al. 2004; Dantas and Oliveira 2006; Santana et al. 2007).

In Brazil, only thiabendazole (methyl benzimidazole carbamate-MBC group) is registered for the control of *L. theobromae* in papaya, and is limited to postharvest treatment (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2014). However, other active ingredients are applied in orchards located in Northeastern Brazil, among them the difenoconazole and tebuconazole (Pereira et al., 2012), registered for control of *Asperisporium caricae* and *Colletotrichum gloeosporioides* (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2014).

Chemical control has not proved highly effective in the control of stem-end rot in tropical fruits (Pereira et al. 2006). Factors such as unfavorable weather conditions, inadequate timing of chemical application, improper dosage as well as low sensitivity of the target fungus can lead to unfavorable results when plant diseases are managed with fungicides. Among them, the low sensitivity, commonly known as resistance, has become commonplace in agriculture after the introduction of fungicides with a specific mode of action

(Ma and Michailides 2005; Brent and Hollomon 2007a,b; Avenot and Michailides 2010; Kuck et al. 2012).

Demethylation-inhibiting (DMIs) are examples of fungicides with specific mode of action, because they inhibit the sterol 14 α -demethylase, a critical enzyme in the sterol biosynthesis pathway, resulting in an imbalance between lipid membranes, with inhibition of phospholipids and accumulation of free fatty acids that reach levels toxic to fungi (Zambolim et al. 2007; Kuck et al. 2012). Triazoles are one of five chemical groups within DMI, and are organic fungicides, with acropetal action, have high fungitoxicity, rapid penetration and translocation in plant tissues. The most important active principles of the group of triazoles include cyproconazole, difenoconazole, flutriafol, propiconazole, tebuconazole, triadimefon and triadimenol (Zambolim et al. 2007; Kuck et al. 2012).

Fungicide resistance is a stable, inheritable adjustment by a fungus to a fungicide, resulting in reduced sensitivity of the fungus to the fungicide. The ecological fitness of fungicide-resistant fungal isolates will determine the persistence of resistant genotypes once they are selected (Ma and Michailides 2005). Fitness is the ability of a fungal isolate to develop, reproduce, survive and cause disease, compared to other isolates under the same conditions. Variables such as mycelial growth, reproductive potential and virulence, among others, are just some examples of fitness components in populations of plant pathogens (Skylakakis 1987; Antonovics and Alexander 1989; Peever and Milgroom 1994; Zhan and McDonald 2013). Although DMI fungicides act on a vital process, there is controversy about the relationship between resistance and fitness (Ma and Michailides 2005).

Since fungicides are widely used for the control of papaya stem-end rot in Brazil, and the amount of fungicide residue is one of the main limitations for fruit commercialization, it is necessary to investigate the sensitivity of *L. theobromae* to the main fungicides employed in the field and the postharvest period so that management measures may be consciously implemented. In this context, recently a pioneering study was conducted in Brazil and

worldwide, on evaluation of resistance of *L. theobromae* to fungicides, among which the tebuconazole (Pereira et al. 2012). Among 120 isolates of *L. theobromae* from Brazilian papaya orchards, the effective concentrations of the fungicide to inhibit 50% of mycelial growth (EC_{50}) ranged from 0.14 to 4.05 $\mu\text{g ml}^{-1}$, with a mean of 0.49 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Therefore, were detected *L. theobromae* isolates with low sensitivity to tebuconazole, and the EC_{50} of non-sensitive isolates (1.18 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was significantly higher than in sensitive isolates (0.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$). The fitness of sensitive and non-sensitive isolates was not compared in this study.

The aims of this study were to estimate the sensitivity of *L. theobromae* isolates from papaya to difenoconazole and to determinate the relationship between sensitivity to this fungicide and fitness-related variables. The following specific hypotheses were tested: i) Populations of *L. theobromae* from Brazilian papaya orchards have the same level of difenoconazole sensitivity; and ii) Sensitivity of *L. theobromae* populations to difenoconazole is associated with fitness parameters.

Materials and Methods

Fungal isolates

One hundred and seven isolates of *L. theobromae*, collected from 15 papaya orchards in Northeastern Brazil in 2006 and 2007 (Pereira et al. 2012), were used to assess sensitivity to the fungicide difenoconazole. Isolates represented five papaya populations (A to E) based on the geographical distance between orchards of origin of the isolates. Orchards over 35 km away were considered to belong to different populations (Fig. 1). Only the orchards of population C did not receive any fungicide applications. All other orchards received at least one spray with triazoles during each of the last two growing seasons before sampling of papaya fruits (Table 1). The isolates were identified through phylogenetic inference based on

the partial sequences of the elongation factor 1- α gene (EF1- α) and complete sequence of the internal transcript space (ITS) by Netto et al. (2014). The isolates were maintained at the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” (CMM) at the Federal Rural University of Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil) and stock cultures were stored in PDA slants at 5°C in the dark.

In vitro sensitivity to difenoconazole

In this study, were used all of the *L. theobromae* isolates and a commercial formulation of difenoconazole (Score, 250 g l⁻¹ active ingredient (a.i.) EC, Syngenta Crop Protection, São Paulo, Brazil). Fungicide was solubilized in 100% ethanol and added to molten (45°C) PDA medium at seven concentrations: 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 and 3.0 $\mu\text{g a.i. ml}^{-1}$. Mycelial plugs (5 mm in diameter) were removed from the margins of 4-day-old cultures and transferred to the center of the PDA plates amended with the different fungicide concentrations. Petri plates containing medium without fungicide were used as controls. Four replicates of each isolate were used to test each fungicide concentration and control. The entire experiment was conducted twice. After a 42-h incubation period at 30°C in the dark, the diameter of each colony was measured in two perpendicular directions, and the original mycelial plug diameter (5 mm) was subtracted from this measurement. The percentage of mycelial growth inhibition related to the control was calculated for all the fungicide concentrations. The effective fungicide concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$) to inhibit 50% of mycelial growth (EC₅₀) was calculated for individual isolates by linear regressions of the mycelial growth inhibitions versus the log₁₀ transformation of the fungicide concentrations. Four additional concentrations of difenoconazole at 5, 10, 20 and 30 $\mu\text{g a.i. ml}^{-1}$ were prepared to test less sensitive isolates using similar procedures to those described above. Petri plates containing medium without fungicide were used as controls.

One-way analyses of variance (ANOVA) of the EC₅₀ values from two experiments were conducted. They indicated that the results of the two experiments did not differ statistically ($P > 0.05$); thus, the average EC₅₀ values from two experiments for each isolate were used in the data analysis. Frequency distributions of the isolates between the intervals of EC₅₀ values were established. The EC₅₀ values of the five isolate populations were compared using the Fisher's LSD test ($P = 0.05$). Then, isolates were grouped according to degree of sensitivity to difenoconazole and 10 isolates with minor and major EC₅₀ values were grouped and denominated as sensitive (S) and non-sensitive (NS), respectively. The difference between the sensitive and non-sensitive isolates was determined using a Student's *t*-test ($P = 0.05$). The statistical analyses were performed with the SAS[®] version 8.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Fitness components of sensitive and non-sensitive isolates

The following fitness components were determined for difenoconazole sensitive and non-sensitive isolates of *L. theobromae*: (a) mycelial growth rate, (b) optimum temperature for mycelial growth, (c) spore production, (d) osmotic sensitivity, and (e) virulence. In all experiments, 10 sensitive isolates and 10 non-sensitive isolates to the fungicide were used. The experiments were conducted twice.

To measure the mycelial growth rate, a mycelial plug (5 mm in diameter) was removed from the margin of a 4-day-old culture of each selected isolate and was transferred to the center of a Petri plate containing fungicide-free PDA. The plates were incubated in the dark at 30°C. Five replicate plates per isolate were used. The colony diameter was measured at 24 h and 36 h in two perpendicular directions and averaged to calculate the mycelial growth rate (MGR) as mm per hour.

To determine the optimum temperature for mycelial growth of the isolates, a mycelial plug (5 mm in diameter) was removed from the margin of 4-day-old culture of each isolate and transferred to the center of a Petri plate containing fungicide-free PDA, which was incubated in the dark at temperatures ranging from 10°C to 40°C in 5°C intervals. Five replicate plates per isolate-temperature combination were used. After a 36-h incubation period, the colony diameter (mm) was measured in two perpendicular directions. Colony diameters were plotted against temperatures and a curve was fitted by a cubic polynomial regression ($y=a+bx+cx^2+dx^3$). Optimal temperature (OPT; °C) was estimated from the regression equation and numeric summary with TableCurve™ 2D version 5.01 (SYSTAT Software Inc., Chicago, IL, USA). Optimum temperature was defined as the temperature that produced the maximum mycelial growth.

To determine the spore production, a mycelial plug (5 mm in diameter) was removed from the margin of 4-day-old culture of each isolate and transferred to the center of a Petri plate containing fungicide-free 2% water agar (WA). Then, four autoclaved pine needles (30 mm) were placed next to the mycelial plug on WA surface and the plates were incubated at 30°C under a 12 h daily photoperiod with near-ultraviolet (NUV) light (Slippers et al. 2004). Five replicate plates per isolate were used. After a 3-week incubation period, colonized pine needles were removed from WA surface, transferred to sterilized mortar and flooded with 20 ml of sterile water. The pycnidia were crushed with a sterile pestle, the resulting slurry filtered through a double layer of sterile cheesecloth and the filtrate centrifuged at 9.5x g for 2 min. The supernatant was discarded to leave 5 ml remaining suspension, which was vortexed to re-suspend the conidia and their concentration determined with the aid of a hemacytometer, expressed as number of spore per milliliter of the suspension (ESP). Four replicate droplets were counted for each plate and five plates were used per isolate.

To determine the osmotic sensitivity, mycelial plugs (5 mm in diameter) were removed from the margins of 4-day-old cultures of each isolate and transferred to the center

of the PDA plates amended with 1, 2, 4, 6 or 8% (wt vol⁻¹) NaCl. Petri plates containing medium without NaCl were used as controls. Five replicate plates per isolate-NaCl concentration combination were used. After a 36-h incubation period at 30°C in the dark, the diameter of each colony was measured in two perpendicular directions, and the original mycelial plug diameter (5 mm) was subtracted from this measurement. The percentage of mycelial growth inhibition related to the control was calculated for all the concentrations of the NaCl. The effective NaCl concentration (%) to inhibit 50% of mycelial growth (EC₅₀N) was calculated for individual isolates by linear regressions of the mycelial growth inhibitions versus the log₁₀ transformation of the NaCl concentrations.

For the virulence analysis, papaya fruits (cv. Golden) at stage four of maturation (Ministério da Integração Nacional 2000), which were not treated with fungicides, were surface disinfested with detergent, rinsed with distilled water, immersed for 5 min in 1% NaOCl and rinsed again with distilled water. After drying, the epidermis of each fruit was punctured at four equidistant points. Lesions were 3 mm in depth and made with a sterilized pin. A mycelial plug (5 mm in diameter) was removed from the margin of a 4-day-old culture of each selected isolate and was transferred to each lesion site. Papayas were then placed on plastic trays and covered with plastic bags. The bottom of each tray was lined with a paper towel soaked in distilled water to increase humidity. Trays were kept at 30°C in the dark. Five replicates (4 fruits per replicate) per isolate were used. The plastic bag and paper towel were removed after 24 h, and papaya fruits were kept at the same temperature for an additional 24-h period. The lesion diameter (LED; mm) was measured 48 h after inoculation in two perpendicular directions and was averaged.

Analyses of variance (ANOVA) of the MGR, OPT, ESP, EC₅₀N and LED values from two experiments were conducted. They indicated that the results of the two experiments did not differ statistically ($P > 0.05$); thus, the average values of two experiments were used in the data analysis. For each variable, differences between the difenoconazole sensitive and non-

sensitive isolates of *L. theobromae* were determined using a Student's *t*-test ($P=0.05$). The statistical analyses were performed with the SAS.

Results

In vitro sensitivity to difenoconazole

The sensitivity response to difenoconazole varied among isolates of *L. theobromae*. The estimated EC_{50} values of isolates ranged from 0.01 to 15.40 $\mu\text{g a.i. ml}^{-1}$. The EC_{50} values between 0.01 and 1.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ occurred in 64.5% of the isolates, 24.0% of the isolates had EC_{50} values between 1.01 and 3.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$, 3.7% of the isolates between 3.01 and 10.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and EC_{50} values higher than 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ occurred in 2.8% of the isolates (Fig. 2).

Significant difference ($P = 0.0435$) was found in sensitivity level to difenoconazole among of *L. theobromae* populations associated with papaya orchards. The populations D and E were the least sensitive to the fungicide, while population B was the most sensitive (Table 2).

When *L. theobromae* isolates were grouped according to the extremes of sensitivity, EC_{50} values of 10 sensitive isolates ranged from 0.01 to 0.16 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and mean (0.10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was significantly ($P = 0.0002$) lower to the observed (7.27 $\mu\text{g ml}^{-1}$) in the 10 non-sensitive isolates, wherein EC_{50} values ranged from 2.31 to 15.40 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Among the 10 isolates classified as sensitive to difenoconazole, 30% belonged to population A, 50% of population B and 20% of population C. Among the 10 isolates classified as non-sensitive, 10% belonged to population A, 50% of population D and 40% of population E.

Fitness components of sensitive and non-sensitive isolates

Five fitness components were measured for 20 *L. theobromae* isolates belonging to two different groups of the difenoconazole sensitivity. No difference was found ($P > 0.05$) between the difenoconazole-sensitive (S) and non-sensitive (NS) isolates for mycelial growth on fungicide-free agar medium (MGR), optimum temperature for mycelial growth (OPT), spore production (ESP), osmotic sensitivity (EC_{50N}) and virulence on papaya fruits (LED). The MGR values were 1.29 mm h^{-1} (standard error = 0.03) and 1.26 mm h^{-1} (0.05) for the S and NS isolates ($P = 0.6663$), respectively. The OPT values were 30.6°C (0.50) and 30.1°C (0.46) for the S and NS isolates ($P = 0.3263$), respectively. The ESP values were 7.8×10^3 conidia ml^{-1} (1.22×10^3) and 6.5×10^3 conidia ml^{-1} (0.98×10^3) for the S and NS isolates ($P = 0.2371$), respectively. The EC_{50N} values were 2.60% NaCl (0.19) and 2.55 % NaCl (0.13) for the S and NS isolates ($P = 0.6785$), respectively. The LED values were 12.7 mm (1.34) and 12.1 mm (1.53) for the S and NS isolates ($P = 0.8339$), respectively.

Discussion

This is the first report on the sensitivity of *L. theobromae* populations from papaya orchards to difenoconazole and the influence of this fungicide on the fitness component in sensitive and non-sensitive isolates.

Difenoconazole is not registered in Brazil for the control of *L. theobromae* in papaya, however it is registered for the control of *A. caricae* and *C. gloeosporioides* (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2014), which is why it is used to control *L. theobromae* in papaya orchards of the Northeast region of Brazil (Pereira et al. 2012). The range of EC_{50} values for difenoconazole sensitivity in *L. theobromae* isolates ($0.01 \mu\text{g ml}^{-1}$ to $15.40 \mu\text{g ml}^{-1}$) was wider when compared with the distribution reported in *Alternaria* spp.

(Olaya et al. 2008), *Cercospora beticola* (Karaoglanidis and Thanassouloupoulos 2003), *Colletotrichum coccodes* (Olaya et al. 2010), *Didymella bryoniae* (Thomas et al. 2012), and *Phoma ligulicola* (Jones et al. 2007). The EC₅₀ values for difenoconazole observed here are high in comparison to the EC₅₀ reported for tebuconazole in *L. theobromae* from papaya (0.14 to 4.05 µg ml⁻¹) (Pereira et al. 2012) and grapevine (0.17 µg ml⁻¹) (Bester et al. 2007), and for species phylogenetically related to *L. theobromae*, such as *Botryosphaeria dothidea* (0.021 µg ml⁻¹ to 0.291 µg ml⁻¹), *Diplodia seriata* (syn. *Botryosphaeria obtusa*) (0.036 µg ml⁻¹) and *Botryosphaeria protearum* (1.32 µg ml⁻¹) (Parker and Sutton 1993; Arauz and Sutton 1990; Ma and Michailides 2002; Ma et al. 2002; Denman et al. 2004). The EC₅₀ values reported for *L. theobromae* from papaya for other DMIs (imazalil and prochloraz) do not surpass 2.27 µg ml⁻¹ (Pereira et al. 2012), as well as EC₅₀ values reported for *B. dothidea* and *D. seriata* for other DMIs do not surpass 0.5 µg ml⁻¹ (Parker and Sutton 1993; Arauz and Sutton 1990; Ma and Michailides 2002; Denman et al. 2004). In other studies, isolates of *D. bryoniae* (Keinath and Hansen 2013) and *Venturia inaequalis* (Kunz et al. 1997) were approximately four to eight times more sensitive to difenoconazole than to tebuconazole.

The average EC₅₀ values for *L. theobromae* sensitive isolates (0.10 µg ml⁻¹) and non-sensitive isolates (7.27 µg ml⁻¹) to difenoconazole were lowest and higher, respectively, than those found by Pereira et al. (2012) for populations of *L. theobromae* sensitive (0.25 µg ml⁻¹) and non-sensitive (1.18 µg ml⁻¹) to tebuconazole. These values become more relevant when considering that difenoconazole is not a fungicide registered to control *L. theobromae* on papaya orchards in Brazil. Thus, we may assume that low sensitivity to difenoconazole may be the result of exposure of the *L. theobromae* populations to fungicides used to control other pathogens.

This study indicated that the effectiveness of difenoconazole in controlling *L. theobromae* isolates from papaya in northeastern Brazil may be low in some orchards. This conclusion was drawn after having seen the occurrences of non-sensitive isolates even after

using a high concentration of the active ingredient ($\geq 3 \mu\text{g a.i. ml}^{-1}$). DMI fungicides inhibit a precursor of ergosterol in fungi, sterol C-14 α -demethylation of 24-methylenedihydrolanosterol, and plant pathogen resistance to DMI fungicides is most commonly conferred by mutations in the CYP51 gene encoding the target enzyme sterol 14 α -demethylase, overexpression of the CYP51 gene, and energy-dependent drug efflux (Ma and Michailides 2005; Deising et al. 2008; Capote et al., 2012; Kuck et al. 2012; Fungicide Resistance Action Committee 2013). DMI fungicides are rated as having a medium risk for development of fungicide resistance, which is lower than the high risk for strobilurins and the medium-to-high risk for succinate dehydrogenase inhibitors (Brent and Hollomon 2007b; Kuck et al. 2012; Fungicide Resistance Action Committee 2013). This risk difference may be due to single-gene mutations conferring insensitivity to the latter two fungicide groups, whereas multiple mechanisms are thought to be required for reduced sensitivity to DMI fungicides (Brent and Hollomon 2007a,b; Villani and Cox 2011). This more complex mechanism for reduced sensitivity to DMI fungicides also may contribute to the continued sensitivity to this fungicide class in *L. theobromae*. The rate of change in population genotype caused by resistance is determined by the epidemiology of the pathogen and the frequency or duration of the selection pressure applied (Ma and Michailides 2005; Brent and Hollomon 2007a,b). Among the major factors that lead to greater selection pressure are: (i) increased efficacy of the fungicide, (ii) increased frequency of fungicide application, (iii) better coverage and greater persistence of the fungicide, (iv) greater difference in sensitivity between resistant and susceptible individuals and (v) lower entry and/or maintenance of sensitive individuals in the field considered (Bergamin Filho and Amorim 2001). Therefore, the populations D and E, that showed the lower sensitivity to difenoconazole, over time may have been subjected to selection pressure by the frequent use of this fungicide to control of *L. theobromae* or other pathogens.

Information on fitness components of resistant and sensitive fungi to fungicides is useful for preventing the development of resistance, and also to determine certain disease management strategies (Antonovics and Alexander 1989; Ma and Michailides 2005). Fungicide resistance is a genetically inherited trait that may impose a fitness penalty, or negative effect on fungal growth, reproduction, or pathogenicity (Brent and Hollomon 2007b). Significant differences were detected between the extremes of sensitivity to difenoconazole in *L. theobromae* isolates from Brazilian papaya orchards, however there was no statistical evidence to support the conclusion that isolates non-sensitive to difenoconazole suffered a fitness penalty when compared to sensitive isolates, based on the parameters of mycelial growth rate, optimum temperature for mycelial growth, spore production, osmotic sensitivity and virulence in papaya fruits. The fitness of DMI-resistant fungal isolates varies significantly. Some resistant isolates showed reduced fitness (Fuchs and Drandarevski, 1976; Al-Mughrabi and Gray, 1995), but high fitness in DMI-resistant isolates has also been documented (Peever and Milgroom 1994; McGrath 1996). On the other hand, Ma et al. (2002) reported that there were no significant differences in virulence to pistachio between tebuconazole resistant and sensitive isolates of *B. dothidea*.

The ecological fitness of fungicide-resistant fungal isolates will determine the persistence of resistant genotypes once they are selected. In many instances, since resistant isolates may have lower fitness than sensitive isolates, they cannot survive well in the absence of fungicide selection pressure. In this case, the frequencies of resistant isolates in pathogen populations will decrease once the fungicide applications cease. Alternatively, resistant isolates can be as fit as sensitive isolates and persist for a long time even without any use of the fungicides (Ma and Michailides 2005). This study shows that difenoconazole non-sensitive isolates of *L. theobromae* are as fit as sensitive isolates and are, thus, equally capable of surviving and persisting in a papaya orchard.

Forty percent of non-sensitive *L. theobromae* isolates to difenoconazole were collected in the main Brazilian pole of papaya production for export (population E), located in the state of Rio Grande do Norte. The above results are of great concern due to the potential economic impact of occurrence of non-sensitive isolates to fungicides DMIs and the ineffective disease control based on the application of these fungicides in a major export area.

Differences in sensitivity to difenoconazole were found among populations of *L. theobromae* from Brazilian papaya orchards. These differences are consistent with the pattern of resistance development to DMIs in other pathosystems observed in recent studies (May-de-Myo et al. 2011; Mocioni et al. 2011; Thomas et al. 2012; Chen et al. 2013; Keinath and Hansen 2013; Yuan et al. 2013). The relatively wider range of EC₅₀ values for difenoconazole indicates that there may be great variation within the unexposed *L. theobromae* population with respect to sensitivity to this fungicide. Thus, establishment of a program of sensitivity monitoring could be effective for early detection of reduced sensitivity to difenoconazole in *L. theobromae* before significant loss of disease control is observed.

The occurrence of *L. theobromae* isolates with low sensitivity to difenoconazole in important Brazilian poles of papaya production is a reality. The fungicide management can mitigate the emergence of non-sensitive isolates in field populations (Brent and Hollomon 2007a), but to date there are no studies on the most appropriate strategies for the management of fungicide resistance in papaya orchards. However, some strategies could be adopted for resistance management to difenoconazole, such as: a) application of this fungicide in mixture with one or more fungicides with different action mechanism; b) restrict the number of treatments applied per season, and apply only when strictly necessary; c) use other fungicides with different action mechanisms both beforehand and subsequently to difenoconazole; d) use the fungicide dose recommended by manufacturers, avoiding the fungicide application at reduced or very high rates; and e) use of other disease management practices, including

removal of symptomatic fruits in the papaya orchard, prevention of injuries on the fruit surface during harvest, heat treatment and storage at low temperatures.

References

- Al-Mughrabi KI, Gray AB. (1995) Competition between triadimefon- sensitive and triadimefon-resistant isolates of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis* 79:709–712.
- Antonovics J, Alexander HM. (1989) The concept of fitness in plant fungal pathogen systems. In: Leonard KJ, Fry WE. (eds) *Plant Disease Epidemiology*, Vol. 1. New York, NY, USA, McGraw-Hill, pp 185–214.
- Arauz LF, Sutton TB. (1990) Protectant and after infection activity of fungicides against *Botryosphaeria obtusa* on apple. *Plant Dis* 74:1029–1034.
- Avenot HF, Michailides TJ. (2010) Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Prot* 29:643–651.
- Bergamin Filho A, Amorim L. (2001) Comparative epidemiology between temperate and tropical pathosystems: its consequences for fungicide resistance. *Fitopatol Brasil* 26:119–127.
- Bester W, Crous PW, Fourie PH. (2007) Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australas Plant Path* 36:73–77.
- Brent KJ, Hollomon DW (2007a). *Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can it be Managed?* Brussels, Belgium, Fungicide Resistance Action Committee.
- Brent KJ, Hollomon DW. (2007b) *Fungicide Resistance: The Assessment of Risk*. Brussels, Belgium, Fungicide Resistance Action Committee.

- Capote N, Pastrana AM, Aguado A, Sanches-Torres P. (2012) Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In: Cumagun CJR. (ed) Plant Pathology. Rijeka, Croatia, InTech, pp 151–202.
- Chen FP, Fan JR, Zhou T, Liu XL, Liu JL, Schnabel G. (2012) Baseline sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the DMI fungicide SYP-Z048 and analysis of DMI-resistant mutants. Plant Dis 96:416–422.
- Chen F., Liu X, Chen S, Schnabel E, Schnabel G. (2013) Characterization of *Monilinia fructicola* strains resistant to both propiconazole and boscalid. Plant Dis 97:645–651.
- Dantas SAF, Oliveira SMA. (2006) Doenças do mamão. In: Oliveira SMA, Terão D, Dantas SAF, Tavares SCCH. (eds) Patologia Pós-Colheita: Frutas, Olerícolas e Ornamentais Tropicais. Brasília, DF, Brazil, Embrapa Informação Tecnológica, pp 695–729.
- Deising HB, Reimann S, Pascholati SF. (2008) Mechanisms and significance of fungicide resistance. Braz J Microbiol 39:286–295.
- Denman S, Crous PW, Sadie A, Wingfield MJ. (2004) Evaluation of fungicides for the control of *Botryosphaeria protearum* on *Protea magnifica* in the Western Cape Province of South Africa. Australas Plant Path 33:97–102.
- Food and Agriculture Organization. (2014) FAOstat. Internet Resource: <http://faostat3.fao.org/home/index.html> (verified Jan 15, 2014).
- Freire FCO, Viana FMP, Cardoso JE, Santos AA. (2004) Novos hospedeiros do fungo *Lasiodiplodia theobromae* no Estado do Ceará. Internet Resource: http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Ct_091.pdf (verified Jan 15, 2014).
- Fuchs A, Drandarevski CA. (1976) The likelihood of development of resistance to systemic fungicides which inhibit ergosterol biosynthesis. Neth J Plant Path 82:85–87.
- Fungicide Resistance Action Committee. (2013) FRAC List of plant pathogenic organisms resistant to disease control agents. Internet Resource:

http://www.frac.info/publication/anhang/List-of-resistant-plant-pathogens_2013.pdf

(verified Jan 15, 2014).

- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2014) Sidra: Sistema IBGE de recuperação automática. Internet Resource: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda> (verified Jan 15, 2014).
- Jones S, Pethybridge S, Hay F, Groom T, Wilson C. (2007) Baseline sensitivity of Australian *Phoma ligulicola* isolates from pyrethrum to azoxystrobin and difenoconazole. *J Phytopathol* 155:377–380.
- Karaoglanidis GS, Thanassouloupoulos CC. (2003) Cross-resistance patterns among sterol biosynthesis inhibiting fungicides (SBIs) in *Cercospora beticola*. *Eur J Plant Pathol* 109:929–934.
- Keinath AP, Hansen ZR. (2013) Isolates of *Didymella bryoniae* from South Carolina remain sensitive to DMI fungicides despite multiyear exposure. *J Phytopathol* 161:315–323.
- Kuck K-H, Leadbeater A, Gisi U. (2012) FRAC mode of action classification and resistance risk of fungicides. In: Krämer W, Schirmer U, Jeschke P, Witschel M. (eds) *Modern crop Protection Compounds*, 2nd ed. Weinheim, Germany, Wiley-VCH Verlag, pp 539–558.
- Kunz S, Deising H, Mendgen K. (1997) Acquisition of resistance to sterol demethylation inhibitors by populations of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 87:1272–1278.
- Ma Z, Michailides TJ. (2002) Characterization of *Botryosphaeria dothidea* isolates collected from pistachio and other plant hosts in California. *Phytopathology* 92:519–526.
- Ma Z, Michailides TJ. (2005) Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot* 24:853–863.
- Ma Z, Morgan DP, Felts D, Michailides TJ. (2002) Sensitivity of *Botryosphaeria dothidea* from California pistachio to tebuconazole. *Crop Prot* 21:829–835.

- May-De Mio LL, Luo Y, Michailides TJ. (2011) Sensitivity of *Monilinia fructicola* from Brazil to tebuconazole, azoxystrobin, and thiophanate-methyl and implications for disease management. *Plant Dis* 95:821–827.
- McGrath MT. (1996) Increased resistance to triadimefon and to benomyl in *Sphaerotheca fuliginea* populations following fungicide usage over one season. *Plant Dis* 80:633–639.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014) Agrofit: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Internet Resource: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons (verified Jan 15, 2014).
- Ministério da Integração Nacional (2000). Frutiseries 7: mamão. Internet Resource: http://www.bnb.gov.br/content/Aplicacao/ETENE/Rede_Irrigacao/Docs/FrutiSeries-MG_7_Mamao.PDF (verified Ago 10, 2013).
- Mocioni M, Gullino ML, Garibaldi A. (2011) Sensitivity of *Sclerotinia homoeocarpa* isolates from turfgrass in Italy to demethylation-inhibiting (DMI) fungicides and iprodione. *Phytopathol Mediterr* 50:408–413.
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, Marques MW, Lima WG, Monteiro JHA, Balbino VQ, Michereff SJ, Phillips AJL, Câmara MPS. (2014) Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Divers* (Accepted for publication, DOI 10.1007/s13225-014-0279-4)
- Olaya G, Bounds R, Tally A. (2008) Sensitivity to azoxystrobin, difenoconazole and cyprodinil of *Alternaria* spp. isolates causing *Alternaria* leaf spot on almonds. *Phytopathology* 98:S116.
- Olaya G, Cochran A, Gudmestad N. (2010) Difenoconazole baseline sensitivity distribution of *Colletotrichum coccodes* isolates from potatoes. *Phytopathology* 100:S93.

- Parker KC, Sutton TB. (1993) Effect of temperature and wetness duration on apple fruit infection and eradicant activity of fungicides against *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Dis* 77:181–185.
- Paull R.E, Nishijima W, Reyes M, Cavaletto CC. (1997) Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biol Tech* 11:165–179.
- Peever TL, Milgroom MG. (1994) Lack of correlation between fitness and resistance to sterol biosynthesis-inhibiting fungicides in *Pyrenophora teres*. *Phytopathology* 84:515–519.
- Pereira AVS, Martins RB, Michereff SJ, Silva MB, Câmara MPS. (2012) Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *Eur J Plant Pathol* 132:489–498.
- Pereira AL, Silva GS, Ribeiro VQ. (2006) Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. *Fitopatol Bras* 31:572–578.
- Poll H, Kist BB, Santos CE, Reetz ER, Carvalho C, Silveira DN. (2013). *Anuário Brasileiro da Fruticultura 2013*. Santa Cruz do Sul, RS, Brazil, Editora Gazeta.
- Rezende JAM, Martins MC. (2005) Doenças do mamoeiro. In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA. (eds) *Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas*, 4rd ed. São Paulo, SP, Brazil, Agronômica Ceres, pp 435–443.
- Ritzinger CHSP, Souza JS. (2000) *Mamão: Fitossanidade*. Brasília, DF, Brazil, Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia.
- Santana EM, Martins MVV, Lima IM, Costa H, Ventura JA, Vieira P. (2007) Manejo das doenças do mamoeiro. In: Núcleo de Estudos em Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras. (ed) *Manejo Integrado de Doenças de Fruteiras*. Brasília, DF, Brazil, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, pp 107–112.

- Skyllakakis G. (1987) Changes in the composition of pathogen populations caused by resistance to fungicides. In: Wolfe WS, Caten CE. (eds) Populations of Plant Pathogens: Their Dynamics and Genetics. Oxford, England, Blackwell Scientific, pp 222–237.
- Slippers B, Crous PW, Denman S, Burgess T, Coutinho TA, Wingfield BD, Wingfield MJ. (2004) Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83–101.
- Thomas A, Langston Jr DB, Stevenson KL. (2012) Baseline sensitivity and cross-resistance to succinate-dehydrogenase-inhibiting and demethylation-inhibiting fungicides in *Didymella bryoniae*. *Plant Dis* 96:979–984.
- Ventura JA, Costa H, Tatagiba JS. (2004) Papaya diseases and integrated control. In: Naqvi SAMH. (ed) Diseases of Fruits and Vegetables, Vol. 2. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic, pp 201–268.
- Viana FMP, Cardoso JE, Souza RNM, Holanda VO. (2007) Controle da podridão-da-haste-do-mamoeiro no Estado do Ceará. Internet Resource: http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Ct_133.pdf (verified Jan 15, 2014).
- Villani SM, Cox KD. (2011) Characterizing fenbuconazole and propiconazole sensitivity and prevalence of ‘Mona’ in isolates of *Monilinia fructicola* from New York. *Plant Dis* 95:828–834.
- Yuan N-N, Chen S-N, Zhai L-X, Schnabel G, Yin L-F-, Luo C-X. (2013) Baseline sensitivity of *Monilia yunnanensis* to the DMI fungicides tebuconazole and triadimefon. *Eur J Plant Pathol* 136:651–655.
- Zambolim L, Venâncio WS, Oliveira SHF. (2007) Manejo da Resistência de Fungos a Fungicidas. Viçosa, MG, Brazil, Universidade Federal de Viçosa.
- Zhan J, McDonald BA. (2013) Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. *Annu Rev Phytopathol* 51:131–153.

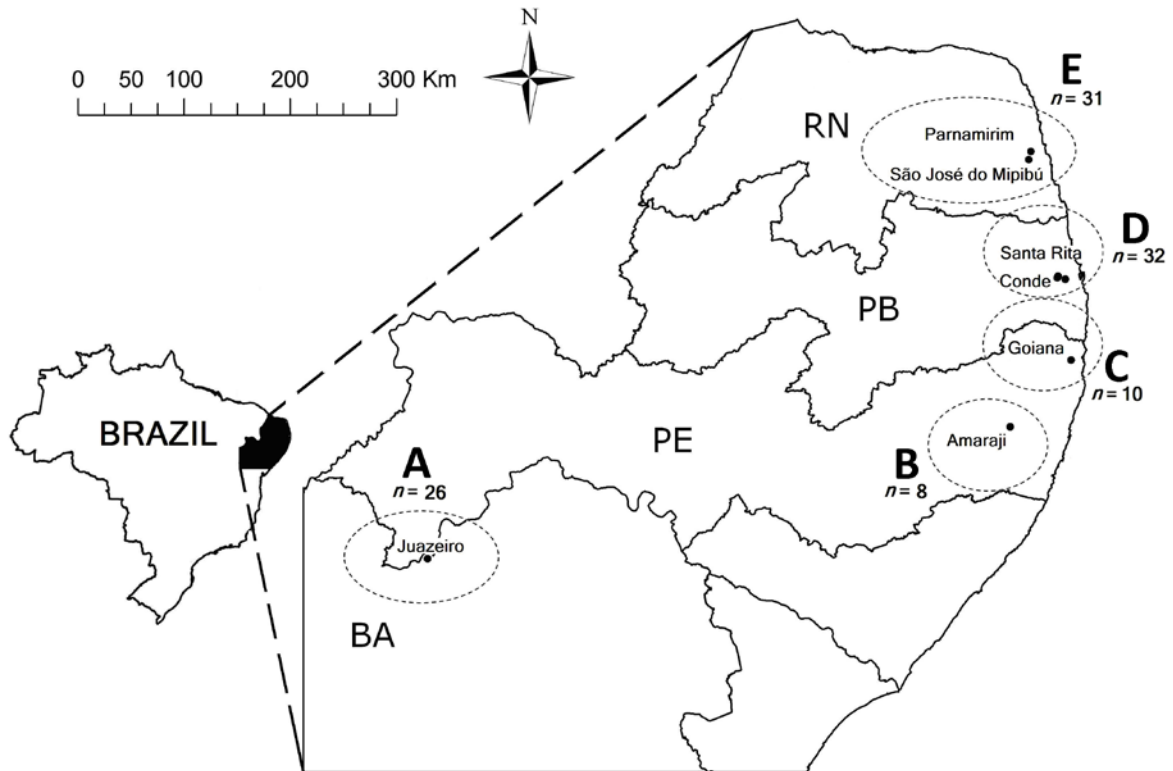


Fig. 1 Collection sites of *Lasiodiplodia theobromae* isolates from Brazilian papaya orchards, located in the states of Bahia (BA), Pernambuco (PE), Paraíba (PB) and Rio Grande do Norte (RN). The names next to the dots correspond to the cities corresponding to the sampled orchards. Dotted semi-circles represent the populations defined for this study; the letter beside each semi-circle corresponds to the coding attributed to the population; n=number of isolates in each population.

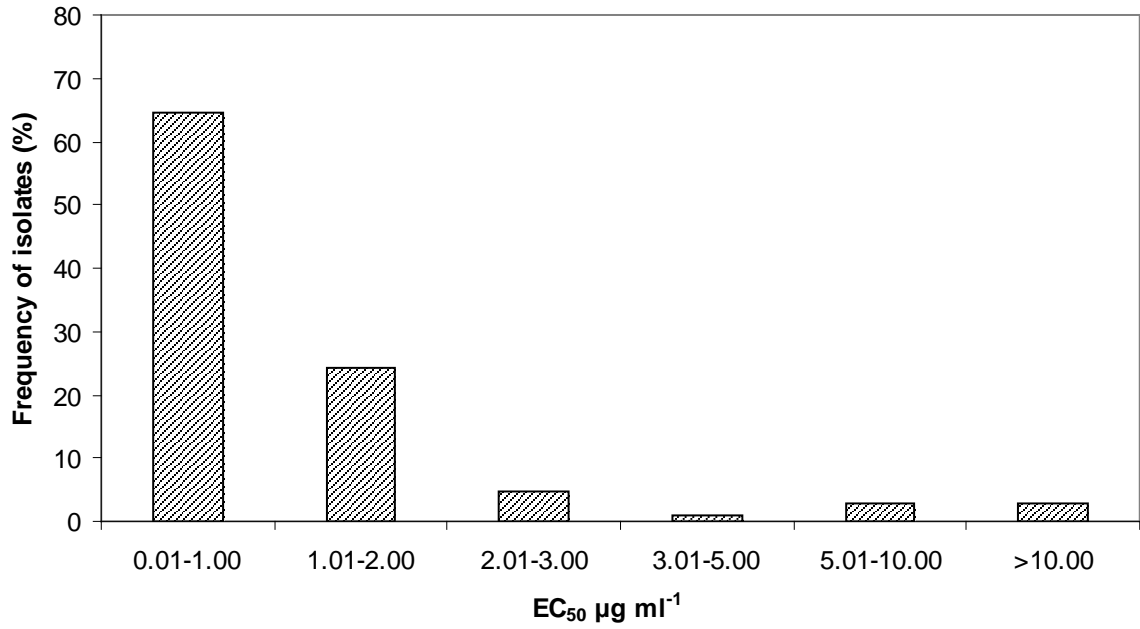


Fig. 2 Frequency distributions of effective difenoconazole concentrations to inhibit 50% of the mycelial growth (EC₅₀) for 107 *Lasiodiplodia theobromae* isolates collected from Brazilian papaya orchards.

Table 1 Fungicides used to diseases control in Brazilian papaya orchards (populations)

Active ingredient	Chemical group	Mode of action /Target site ^a	Populations ^b
Azoxystrobin	Methoxyacrylate	Respiration / Complex III: cytochrome bc1 (ubiquinol oxidase) at Qo site (<i>Cyt b gen</i>)	D, E
Copper oxychloride	Inorganic	Multi-site contact activity / Multi- site contact activity	A, D
Difenoconazole	Triazole	Sterol biosynthesis in membranes / C14-demethylase in sterol biosynthesis (<i>erg11/cyp51</i>)	D, E
Mancozeb	Dithiocarbamate	Multi-site contact activity / Multi- site contact activity	A, B, E
Pyraclostrobin	Methoxycarbamate	Respiration / Complex III: cytochrome bc1 (ubiquinol oxidase) at Qo site (<i>Cyt b gene</i>)	E
Tebuconazole	Triazole	Sterol biosynthesis in membranes / C14-demethylase in sterol biosynthesis (<i>erg11/cyp51</i>)	A, B, E
Thiophanate-methyl	Thiophanate	Mitosis and cell division / β -tubuline assembly in mitosis	A, B, D, E

^a According to Kuck et al. (2012).

^b Each population was defined based on the geographical distance between orchards of origin of the isolates. Population areas are as indicated in Fig. 1.

Tabela 2 Comparison of effective difenoconazole concentration to inhibit 50% of mycelial growth (EC₅₀) between five populations of *Lasiodiplodia theobromae* isolates from Brazilian papaya orchards

Population ^a	No. of isolate	EC ₅₀ (µg i.a ml ⁻¹) ^b
A	26	1.04 b (±0,047)
B	8	0.20 c (±0,085)
C	10	0.86 b (±0,076)
D	32	1.65 a (±0,043)
E	31	1.75 a (±0,043)

^a Each population was defined based on the geographical distance between orchards of origin of the isolates. Population areas are as indicated in Fig. 1.

^b Values (µg ml⁻¹) are means from two independent experiments because there were no significant differences ($P > 0.05$) between the two experiments according to analyses of variance (ANOVA). Values within columns followed by the same letter do not differ significantly according to Fisher's LSD test ($P = 0.05$). Values (±) in parentheses represent standard errors.

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. As populações de *L. theobromae* oriundas dos pomares de mamoeiro do Nordeste brasileiro apresentaram diferentes níveis de sensibilidade ao fungicida difenoconazole;
2. A presença de isolados não-sensíveis a difenoconazole é um dado relevante, pois no Brasil este fungicida não está registrado para o controle de *L. theobromae* no mamoeiro, o que indica a ocorrência de pressão de seleção sobre a população do patógeno pelo fungicida utilizado para controle de outros patógenos;
3. Os isolados de *L. theobromae* não-sensíveis a difenoconazole não tiveram custos de adaptabilidade, indicando serem capazes de reproduzir, sobreviver e causar doença em pomares de mamão como os isolados sensíveis ao fungicida.