



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



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FITOPATOLOGIA**

Tese de Doutorado

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE *LASIODIPLODIA*
THEOBROMAE DE MAMOEIRO A FUNGICIDAS**

Susan Satie Tsuji

**Recife – PE
Fevereiro - 2016**

SUSAN SATIE TSUJI

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE *LASIODIPLODIA*
THEOBROMAE DE MAMOEIRO A FUNGICIDAS**

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

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

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

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

Prof. Dr. Guido Schnabel (CLEMSON UNIVERSITY) – Coorientador

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2016**

Ficha catalográfica

T882m Tsuji, Susan Satie
Mecanismos de resistência de *Lasiodiplodia theobromae*
de mamoeiro a fungicidas / Susan Satie Tsuji. – Recife, 2016.
81 f. : il.

Orientador: Sami Jorge Michereff.
Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife,
2016.

Referências.

1. Carica papaya 2. Podridão peduncular 3. Resistência a
fungicidas 4. Mecanismos de resistência 5. MBC 6. QoI 7.

DMI
I. Michereff, Sami Jorge, orientador II. Título

CDD 632

**MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE *LASIODIPLODIA*
THEOBROMAE DE MAMOEIRO A FUNGICIDAS**

SUSAN SATIE TSUJI

Tese defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 23/02/2016.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE)

EXAMINADORES:

**RECIFE – PE
FEVEREIRO – 2016**

*Aos meus pais, Shinichiro Tsuji e
Izabel de Oliveira Tsuji por
toda paciência e apoio*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Izabel e Shinichiro, por não imporem limites aos meus sonhos;

Ao Prof. Dr. Sami J. Michereff pela orientação, amizade e apoio;

To Dr. Guido Schnabel for all support and guidance in my year abroad in his lab at Clemson University;

Ao Prof. Dr. Marcos P. S. Câmara pelo apoio e momentos de descontração no Lab. de Micologia;

Ao Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo apoio institucional, à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, pela concessão da bolsa de estudo, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior, pela concessão da bolsa-sanduíche;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da UFRPE, pelos ensinamentos e amizade ao longo dos últimos anos;

À Dra. Janaína M. Marque que me abriu as portas do mundo da Fitopatologia;

À toda equipe do Lab de Epidemiologia de Doenças de Plantas, especialmente à Mayumi, Moara, Soraya, Kamila, Cíntia e João por toda ajuda nesse trabalho;

Aos amigos, Willie (sempre meu apoio por telefone, no matter where I live), Michelle, Claudeana, Neto, Conrado, Raycenne, Alain, Meridiana, Mariote, e tantos outros que me ajudaram nessa jornada;

I also want to thank to the amazing Schnabel Lab members: Shu Ning Chen, Madeline Dowling, Zhen Fan, Harriet Boatwright, Simon Li, Julie, Linus Smith, Jenny Wilson and Dr. Hideo Ishii, for all friendship and funny moments. A special thank you to Dr. Mengjun Hu, for all his support, patience and helpfulness. My thanks also go to Karen Bryson, our wonderful technician for all advices and technical support;

I would like to thank to friends I made in Clemson: Qi Zhou, Yuheng Du, Duha Anbari, Cherry, Liane, Pauline, Vivian, Rose, Jaqueline and Dr. Paula Agudelo.

À Darcy Martins pela amizade e suporte tanto burocrático quanto no cafezinho;

Por fim, a todos que de alguma forma fizeram parte de mais esse capítulo.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO GERAL	vii
GENERAL ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I – Introdução Geral	10
Referências Bibliográficas	24
CAPÍTULO II – Sensitivity of <i>Lasiodiplodia theobromae</i> from Brazilian papaya orchards to azoxystrobin and thiophanate-methyl and investigation of molecular mechanisms of resistance.....	31
Abstract	33
Resumo	34
Introduction	35
Materials and methods	37
Results	40
Discussion	41
Acknowledgements	44
Literature cited	45
CAPÍTULO III – Mechanisms of difenoconazole resistance in <i>Lasiodiplodia theobromae</i> from papaya by comparing sequences and expression levels of <i>CYP51</i> gene	59
Abstract	61
Resumo	62
Introduction	63
Materials and methods	64
Results	67
Discussion	68
Acknowledgements	69
References	71
CONCLUSÕES GERAIS	81

RESUMO GERAL

A podridão peduncular causada por *Lasiodiplodia theobromae* é uma das mais importantes doenças pós-colheita do mamão no Nordeste Brasileiro. Os frutos são infectados pelo fungo em campo, permanecendo em estado quiescente até que ocorram condições favoráveis para a colonização e aparecimento dos sintomas, que geralmente aparecem na fase de pós-colheita. Tiabendazol é o único fungicida registrado no Brasil para o controle de *L. theobromae* em mamoeiro, com uso restrito à pós-colheita. Esse fungo, no entanto, é exposto a outros fungicidas, incluindo tiofanato metílico, difenoconazole e azoxistrobina, registrados e aplicados nos pomares para o controle da antracnose, do oídio e da varíola. Diante disso, essa tese teve como objetivos: (a) analisar a sensibilidade de populações de *L. theobromae* obtidas de mamão no Nordeste brasileiro a azoxistrobina; (b) investigar os mecanismos moleculares associados às reações de sensibilidade e não sensibilidade dos isolados de *L. theobromae* de mamão aos fungicidas tiofanato metílico, difenoconazole e azoxistrobina. A sensibilidade *in vitro* a azoxistrobina revelou que as populações de *L. theobromae* do Nordeste brasileiro possuem três fenótipos: isolados sensíveis (S), moderadamente resistentes (MR) e altamente resistentes (HR), cujos valores de EC₅₀ foram de 0.35-10 µg i.a./ml, 10.01-90 µg i.a./ml e > 300 µg i.a./ml, respectivamente. Na investigação dos mecanismos moleculares de resistência a tiofanato metílico foram comparadas sequências de nucleotídeos do gene β-tubulina de isolados resistentes e sensíveis ao fungicida. Isolados resistentes a esse fungicida revelaram mutação no códon 198, com a substituição de um ácido glutâmico por uma lisina (E198K). Em relação à azoxistrobina, não foram encontrados pontos de mutação no citocromo b (*cytb*) quando comparadas as sequências de nucleotídeos de isolados S, MR e HR. Quanto a difenoconazol, a superexpressão do gene *cyp51* foi encontrada em isolados MR, no entanto, não foram encontrados pontos de mutação na região codificante do gene e nem inserções na região promotora do gene. Outros mecanismos moleculares, que não os investigados neste estudo, podem estar envolvidos na resistência de isolados de *L. theobromae* obtidos de pomares de mamoeiro do Nordeste brasileiro aos fungicidas azoxistrobina e difenoconazol.

Palavras-chave: *Carica papaya*, podridão peduncular, resistência a fungicidas, mecanismos de resistência, MBC, QoI, DMI

GENERAL ABSTRACT

The stem-end rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* is one of the most important papaya postharvest diseases in Brazilian Northeastern. The fungus infects the fruits in the field, and stay in a quiescent state until favorable conditions to colonization. The typical symptom in the fruits usually appears during the postharvest. Thiabendazole is the only fungicide registered in Brazil to *L. theobromae* control in papaya, but just in postharvest. However, this fungus has been exposed to other fungicides, including thiophanate-methyl, difenoconazole and azoxystrobin. These fungicides are registered and are sprayed in papaya orchards to control anthracnose, powdery mildew and black spot. Therefore, the goals of this dissertation were: (a) analyze the sensibility to azoxystrobin in *L. theobromae* populations from Brazilian Northeast papaya orchards; (b) investigate the molecular mechanisms associated to sensitive and non-sensitive reactions of *L. theobromae* isolates from papaya to thiophanate-methyl, difenoconazole and azoxystrobin fungicides. The *in vitro* sensitivity to azoxystrobin showed that *L. theobromae* populations from Brazilian Northeast belong to three phenotypes: sensitive (S), moderately resistant (MR) and highly resistant (HR) isolates, where the EC₅₀ values were 0.35-10 µg a.i./ml, 10.01-90 µg a.i./ml e > 300 µg a.i./ml, respectively. In the study of molecular mechanisms in the resistance to thiophanate-methyl, nucleotide sequences from β-tubulin gene of sensitive and resistant isolates were compared. Resistant isolates showed a mutation that led to a change of glutamic acid to a lysine at codon 198 (E198K). In difenoconazole, an overexpression of CYP51 gene was found in MR isolates, however, no point mutations at encoding region of the gene and no insertions in the promoter region of the gene were found. Other molecular mechanisms, besides the ones investigated in this study, could be involved in the resistance of *L. theobromae* isolates from Brazilian northeastern papaya orchards to azoxystrobin and difenoconazole.

Key-words: *Carica papaya*, stem-end rot, fungicide resistance, resistance mechanisms, MBC, QoI, DMI.

Capítulo I

Introdução Geral

MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE *LASIODIPLODIA* *THEOBROMAE* DE MAMOEIRO A FUNGICIDAS

INTRODUÇÃO GERAL

1. Importância da produção de mamão

O mamão (*Carica papaya* L.) é produzido durante todo o ano no Brasil e as perspectivas de comercialização no mercado doméstico e de exportação são bastante favoráveis (REETZ et al., 2015). O Brasil ocupa a segunda colocação entre os países produtores de mamão em nível mundial, tendo produzido cerca de 1,6 milhões de toneladas em 2014, superado apenas pela Índia, com cerca de 5,5 milhões de toneladas. A produção anual brasileira corresponde a aproximadamente 13% da produção mundial (FAO, 2016). A região Nordeste é responsável por 60,4% da produção de mamão do Brasil, com destaque para o estado da Bahia, que produziu 794.565 toneladas em 2014 (AGRIANUAL, 2015).

A quase totalidade da produção brasileira de mamão é destinada ao mercado interno, pois apenas 2% da produção foi exportado em 2014, gerando uma receita de US\$ 47 milhões (REETZ et al., 2015). Os países da União Europeia (EU) são os principais parceiros de exportação do Brasil, e nos últimos 15 anos, a comercialização do mamão para a UE cresceu mais de 600% (FAO, 2016).

2. Perdas na produção de mamão e doenças

Em nível mundial, são estimadas perdas de até 32% na cadeia produtiva do mamão (REETZ et al., 2015). Vários fatores podem influenciar negativamente na produção de mamão, mas as doenças se destacam economicamente, pois acarretam severas perdas nas fases de produção, comercialização e exportação (PAULL; DUARTE, 2010). A importância de cada doença em mamão varia de acordo com a região onde as plantas são cultivadas, as condições climáticas, o manejo do pomar, a densidade de inóculo do patógeno e o destino final da produção para o mercado interno ou externo (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004). No Brasil, as principais doenças na fase de produção são as viroses, com destaque para o mosaico causado por *Papaya ringspot virus* type P (PRSV-P) e a meleira causada por *Papaya meleira virus* (PMeV) (SANTANA et al., 2007; VENTURA; COSTA; TATAGIBA,

2004). Na pós-colheita, a antracnose, causada por espécies de *Colletotrichum*, é considerada a doença mais importante, seguida pela podridão peduncular, causada por um complexo de fungos, com destaque para a espécie *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. (DANTAS; OLIVEIRA, 2006; MICHEREFF; CORREIA, 2015; NETTO et al., 2014; SANTANA et al., 2007; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004). As doenças foliares, quando não controladas adequadamente, podem causar grandes danos nos frutos, depreciando-os comercialmente, como ocorre com a varíola (*Asperisporium caricae* (Speg) Maulb), a mancha-de-ascoquita (*Phoma caricae-papayae* (Tarr) Punith), o oídio (*Oidium caricae* Noack) e a mancha-de-corynespora (*Corynespora cassicola* (Berk & Curt) Wei). Outra doença de grande importância na cultura do mamoeiro é a podridão-do-pé e dos frutos causada por *Phytophthora palmivora* (Botler) Butler (VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004).

3. Podridão peduncular do mamoeiro

As doenças na pós-colheita constituem um dos principais problemas na cadeia produtiva do mamão, especialmente quando o destino dos frutos é a exportação. Dentre essas doenças, a podridão peduncular é uma das mais preocupantes no Brasil (DANTAS; OLIVEIRA, 2006; NETTO et al., 2014; PEREIRA et al., 2012; SANTANA et al., 2007). Em épocas de grande intensidade pluviométrica, a incidência da podridão peduncular em frutos oriundos de lavouras de mamoeiro 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 mamão durante a fase de comercialização, foram analisados quatro supermercados localizados na cidade de Recife (Estado de Pernambuco, Brasil), sendo constatado que a podridão peduncular 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 de mamão foram amostrados durante seis meses e a podridão peduncular foi a principal doença constatada, sendo registrada em 39,7% dos frutos amostrados (DANTAS et al., 2003).

Embora o sintoma típico da podridão peduncular causado por *L. theobromae* ocorra durante a pós-colheita, a infecção pelo patógeno ocorre no campo, em frutos imaturos, permanecendo num estado de quiescência, sem sintomas visuais, até que ocorram condições favoráveis para iniciar o processo de colonização do tecido hospedeiro. Quando isso ocorre,

normalmente no início da maturidade dos frutos, 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, 2004).

O manejo da podridão peduncular consiste em práticas para prevenir a infecção e retardar o desenvolvimento dos sintomas, que se estendem desde o campo até a pós-colheita. As medidas incluem: colher frutos no estágio de maturação ideal, evitar ferimentos na epiderme, manter os frutos limpos e realizar rigorosa sanitização de todas as instalações, realizar tratamento pós-colheita, como imersão dos frutos em água quente e/ou fungicida registrado para a cultura (tiabendazol), e armazenar os frutos em condições que retardem ou diminuam o apodrecimento sem afetar a qualidade dos mesmos (DANTAS; OLIVEIRA, 2006; PEREIRA et al., 2012; SANTANA et al., 2007; VENTURA; COSTA; TATAGIBA, 2004).

O controle químico não tem demonstrado elevada eficácia no controle da podridão peduncular, sendo então indicada a adoção de uma série de medidas adicionais de controle (PEREIRA et al., 2006; TAVARES, 1995). No Brasil, nenhum fungicida é registrado para aplicação no campo visando o controle de *L. theobromae* em mamão. Somente tiabendazol (metil benzimidazol carbamato - grupo MBC) é registrado para tratamento na pós-colheita (MAPA, 2016). No entanto, outros princípios ativos, incluindo tiofanato metílico (grupo MBC), difenoconazol e tebuconazol (inibidores da biosíntese do esterol - grupo DMI), azoxistrobina e piraclostrobina (inibidores da quinona oxidase - grupo QoI), são registrados e aplicados nos pomares de mamoeiro do Nordeste brasileiro para o controle da antracnose, do oídio e da varíola (BANDEIRA et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2014; MAPA, 2016; PEREIRA et al., 2012). Dentre estes, tiofanato metílico é o mais utilizado desde a retirada do princípio ativo benomil (grupo MBC) do mercado brasileiro em 1992 (CAVALCANTE et al., 2014).

4. Controle químico de doenças de plantas

Um dos principais métodos de controle de doenças de plantas é o uso de fungicidas, tanto pela facilidade de aplicação quanto pelos resultados imediatos obtidos (GHINI; KIMATI, 2000). Ao longo dos anos, os programas de pesquisa das indústrias têm investido no desenvolvimento de compostos para proteção de culturas de alto valor agregado. As características desejáveis desses produtos incluem: especificidade, ações sistêmica, curativa e erradicante, e alta atividade mesmo a baixas doses (AVENOT; MICHAILIDES, 2010).

O primeiro fungicida descoberto para uso na agricultura, no início do século XIX, foi a calda sulfocálcica, introduzida por William Forsyth e recomendado para o controle de oídio (*Oidium* spp.) em fruteiras. O próximo marco foi a introdução por Millardet, em 1885, da calda bordalesa, uma preparação à base de cobre usada para combater o míldio da videira (*Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni). Os primeiros fungicidas orgânicos - compostos organomercuriais - foram introduzidos para o tratamento de sementes de cereais no início do século XX e, desde a década de 1930, compostos orgânicos tais como os ditiocarbamatos e as ftalimidas tornaram-se ferramentas importantes para o controle de doenças em plantas. O modo de ação destes fungicidas é descrito como multissítio, uma vez que inibem simultaneamente uma gama de enzimas e estruturas celulares e proporcionam uma proteção preventiva de plantas contra várias doenças de maneira não sistêmica, na superfície da planta (KUCK; LEADBEATER; GISI, 2012).

Os primeiros fungicidas com mecanismo específico de ação - os benzimidazóis, carboxamidas, e inibidores de biossíntese de esterol precoces (SBIS), tais como triforine - foram descobertos na década de 1960 e início de 1970. Durante o final dos anos 1970 e início dos anos 1980, dicarboximidas, fenilamidas, e os primeiros triazóis entraram no mercado. Fungicidas específicos controlam patógenos de plantas de forma mais eficaz e a uma concentração muito menor em comparação com fungicidas multisítio. A maioria, mas não todos, dos fungicidas específico têm propriedades sistêmicas e, portanto, são capazes de penetrar no tecido da planta e se distribuírem através dos vasos do xilema (apoplasto) em partes de plantas que não foram atingidas diretamente durante a aplicação. No geral, os fungicidas específicos com propriedades sistêmicas foram considerados um verdadeiro progresso na proteção de plantas, pois têm menor probabilidade de serem removidos pela chuva e também muitas vezes são redistribuídos na planta. Como resultado, eles permitiram uma redução considerável, não só na quantidade aplicada, mas também no número de aplicações por estação de cultivo. O modo de ação específico, no entanto, tornou-se a origem

de um novo fenômeno - a seleção de indivíduos resistentes em populações fúngicas, e o desenvolvimento da resistência de campo (KUCK; LEADBEATER; GISI, 2012).

Em nível mundial, fungicidas DMI aparecem em posição de liderança no mercado, representando 29% dos fungicidas vendidos para utilização na agricultura, seguido dos fungicidas QoI, com 22%. Em relação aos cultivos, 22% dos fungicidas comercializados em nível global são destinados ao controle de doenças em cereais, enquanto 18% são utilizados em fruteiras e hortaliças. Dentre as fruteiras, o maior consumo ocorre em videira, responsável por 9% do volume utilizado em nível mundial (KUCK; LEADBEATER; GISI, 2012).

No mercado brasileiro, de 2013 para 2014 as vendas em valor cresceram 12,2% para fungicidas, 7,4% para inseticidas e 4,4% para herbicidas, enquanto a dos acaricidas decresceu 1,5%. A classe de maior acréscimo nas vendas em quantidade de produto comercial foi dos fungicidas, que, em 2014, aumentou 17,2% em relação ao ano anterior. A comercialização de fungicidas, em 2014, movimentou US\$ 2,91 bilhões no Brasil, o que correspondeu a 120.712 toneladas de produto comercial e 36.328 toneladas de ingrediente ativo. Cerca de 96% dos fungicidas vendidos, em produto comercial, foram para aplicação foliar e o restante para tratamento de sementes. O valor das vendas de fungicidas destinaram-se, principalmente, para soja (62,6%), milho safrinha, culturas de inverno, algodão, café, feijão e batata-inglesa (FERREIRA; VEGRO, 2015). Não existem estatísticas disponíveis sobre o mercado brasileiro considerando diferentes grupos de fungicidas.

Vários fatores podem levar a resultados desfavoráveis quando as doenças são manejadas com fungicidas, mas um dos principais fatores é a perda de eficácia devido à resistência das populações dos fitopatógenos aos fungicidas. O surgimento de populações de fungos resistentes a fungicidas é resultante do uso intensivo de fungicidas sistêmicos com mecanismos específicos de ação, que causam um aumento na pressão de seleção nas populações de fungos não-sensíveis (AVENOT; MICHAILIDES, 2010; HOLLON, 2015; MA; MICHAILIDES, 2005; MILGROOM, 2015; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007).

5. Resistência a fungicidas

Resistência a fungicida pode ser definida como um ajuste hereditário estável de um fungo a um fungicida, resultando em sensibilidade reduzida do fungo ao fungicida (MA; MICHAILIDES, 2005). Apesar do uso massal de fungicidas para o controle de doenças de plantas nos últimos 90 anos, foi somente na década de 1970 que a resistência surgiu como um

problema prático. Atualmente, a resistência a fungicidas acarreta sérias consequências a todos os segmentos da cadeia produtiva, desde as empresas fabricantes que perdem a confiabilidade de seus clientes, passando pelos produtores agrícolas, que ao perceberem que o fungicida não controla a doença, tendem a aumentar as aplicações e as dosagens, chegando aos consumidores, que recebem um produto com resíduos de fungicidas e preços elevados (GHINI; KIMATI, 2000).

A incidência da resistência tem sido restrita a fungicidas sistêmicos que agem em alvos bioquímicos de inibição em um único sítio, o que inclui a maior parte dos grupos de fungicidas (CAPOTE et al., 2012). A ocorrência de isolados resistentes pode ocorrer depois de poucos anos após esses compostos serem introduzidos no mercado devido a seu uso intensivo (DEISING et al., 2008). A capacidade de determinar esse risco de resistência é de grande ajuda na seleção dos produtos químicos a serem utilizados e no estabelecimento de estratégias para aumentar sua durabilidade (BRENT; HOLLON, 2007; HOLLON, 2015). A resistência de fungos a fungicidas tem sido amplamente estudada para condições de clima temperado, principalmente nos Estados Unidos da América e alguns países da Europa (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2001; KUCK; LEADBEATER; GISI, 2012).

A resistência pode ser resultante de mutações genéticas simples ou múltiplas. Mutações genéticas naturais podem dar origem a isolados resistentes, que não são afetados ou não são inibidos como um todo, pela aplicação do fungicida. Desde que o fungicida consiga controlar isolados sensíveis, falhas no controle de doenças podem ocorrer devido ao uso prolongado do mesmo, que por pressão de seleção, pode levar à dominância dos isolados resistentes dentro de uma população. Essa dinâmica pode ser afetada em algumas situações pela adaptação do isolado resistente. Os isolados resistentes podem ser menos adaptados que os isolados sensíveis, assim eles não sobrevivem na ausência da pressão de seleção exercida pelo fungicida. Assim, ao cessar as aplicações do fungicida, a frequência dos isolados resistentes na população do patógeno poderá diminuir. Outro caso seria dos isolados resistentes aos fungicidas benzimidazóis ou estrobilurinas, onde os isolados resistentes são tão adaptados quanto os sensíveis, podendo persistir por longos períodos de tempo mesmo sem a aplicação do fungicida (BARALDI et al., 2003; ISHII, 2015; KOENRAADT et al., 1992; MA; MICHAILIDES, 2005).

O genoma fúngico apresenta grande plasticidade e pode conter vários polimorfismos (CUOMO et al., 2007). Uma população pode conter raros indivíduos, estáveis e distintos geneticamente, aptos a sobreviverem em condições de impacto metabólico não favoráveis, e que em resposta a uma pressão de seleção poderiam aumentar nessa população ao custo dos

indivíduos sensíveis. A ocorrência de resistência a um fungicida, irá depender de qual mecanismo de resistência está relacionado. Se o alvo do fungicida for um ponto específico, um único ponto de mutação causando uma troca de aminoácido pode rápida e efetivamente bloquear a ligação do fungicida ao sítio-alvo, geralmente causando altos níveis de resistência (HOLLOMON, 2015).

Genes responsáveis pela resistência a fungicidas podem estar localizados em cromossomos dentro do núcleo ou em determinantes genéticos extracromossômicos. Genes nucleares e citoplasmáticos podem ser diferenciados pelos padrões de herança. Genes citoplasmáticos estão presentes em mitocôndrias e plasmídeos. O genoma mitocondrial, que contém genes rRNA mitocondrial e algumas proteínas da cadeia respiratória, é o mais relevante elemento extracromossômico dos fungos afetando a resistência a fungicidas. A maioria dos genes de resistência a fungicidas estão localizados em cromossomos nucleares. Na maioria dos casos, há somente uma cópia desse gene no genoma e as mutações geralmente estão em genes que codificam proteínas estruturais ou enzimáticas. Além disso, diferentes mutações em um mesmo gene podem causar diferentes níveis de resistência a um fungicida específico (ANGELINI; POLLASTRO; FARETRA, 2015).

A resistência a fungicidas pode acontecer por diversos mecanismos como: alteração do sítio alvo, o que reduz a ligação do fungicida, a síntese de uma enzima alternativa capaz de substituir a enzima alvo, uma superprodução do alvo do fungicida, um efluxo ativo ou redução da captação do fungicida e a quebra metabólica do fungicida. No entanto, ainda existem alguns mecanismos desconhecidos que também podem conferir essa resistência a fungicidas (CAPOTE et al., 2012; MA; MICHAILIDES, 2005).

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).

5.1. Resistência a benzimidazóis

Os tiofanatos são considerados como pertencentes à classe dos benzimidazóis desde que são convertidos a carbendazim. Foram introduzidos na década de 1960 como fungicidas sistêmicos altamente efetivos e controlam desde ascomycetos até alguns basidiomicetos, mas são ineficazes para oomicetos. Atualmente, os princípios ativos comerciais incluem carbendazim, fuberidazol, tiabendazol e tiofanato metílico (YOUNG, 2015). Esses fungicidas

atuam sobre a tubulina na célula fúngica. A tubulina é um dímero de proteína, que consiste das subunidades α e β . É o principal componente de filamentos de microtúbulos, os quais desempenham um papel central na divisão nuclear em todas as células eucarióticas. A função dos microtúbulos na divisão nuclear exige a montagem reversível da tubulina nos polímeros dos microtúbulos. Os benzimidazóis atuam interrompendo esse processo nas células, bloqueando a divisão nuclear ao se ligarem à β -tubulina e inibindo a montagem dos microtúbulos (DAVIDSE; ISHII, 1995). Mais de 150 espécies fúngicas desenvolveram resistência aos benzimidazóis, e a velocidade com que a resistência foi desenvolvida para diferentes patógenos foi maior para fungos com muitos ciclos de vida por estação de cultivo (FRAC, 2016).

Resistência a benzimidazóis tem sido relacionada, na maioria dos casos, a mutações pontuais exibindo mudanças nos códons 6 (COOLEY; CATEN, 1993; MA et al., 2003), 50 (MCKAY et al., 1998), 167 (BARALDI et al., 2003; HOU et al., 2011; ZHANG et al., 2013), 198 (CUNHA; RIZZO, 2003; KONGTRAGOUL et al., 2011; LEE et al., 2011; SHI et al., 2013; WONG et al., 2008), 200 (LEE et al., 2011; SHI et al., 2013) e 240 (ALBERTINI; GREDDT; LEROUX, 1999; MA et al., 2005) no gene da β -tubulina, resultando em alterações na sequência de aminoácidos do sítio alvo dos benzimidazóis (MA; MICHAILIDES, 2005).

As mutações mais comumente relatadas associadas à resistência aos benzimidazóis estão localizadas nos códons 50 (MCKAY et al., 1997), 198 e 200 (ALBERTINI; GREDDT; LEROUX, 1999; KOENRAADT et al., 1992; LEE et al., 2011; SHI et al., 2013; YARDEN; KATAN, 1993) e 240 (ALBERTINI; GREDDT; LEROUX, 1999) do gene β -tubulina.

Em muitos casos, tem sido demonstrado que os mutantes resistentes persistem na população por muitos anos, mesmo após a utilização de benzimidazol ter sido descontinuada (LEROUX et al., 2005; WALKER et al., 2013).

Para isolados fúngicos com resistência de campo a benzimidazóis, geralmente ocorre resistência cruzada entre diferentes benzimidazóis, de tal modo que quando a resistência a um composto ocorre, toda a classe de benzimidazóis perde eficácia (DELP, 1995). Como seria de esperar para um mecanismo de resistência baseado em um único sítio, as mutações que causam resistência à benzimidazóis não afetam a sensibilidade aos fungicidas que têm um modo de ação diferente (YOUNG, 2015).

Apesar de mutações no gene β -tubulina serem a principal causa do desenvolvimento de resistência e da perda da eficácia no controle de doenças fúngicas em campo, outros mecanismos também podem afetar a sensibilidade a benzimidazóis. Em *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter um mecanismo de efluxo envolvendo uma proteína, a transportadora

multidroga, mostrou afetar a sensibilidade a carbendazim e a tiabendazol (ANDRADE et al., 2000), mas ainda não é claro como esse mecanismo afeta a sensibilidade de fitopatógenos a benzimidazóis em campo. Por exemplo, *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds é menos sensível a benzimidazóis que outras espécies de *Colletotrichum* Corda. Em alguns isolados essa baixa sensibilidade parece ser resultado da superexpressão da tubulina (NAKAUNE; NAKANO, 2007), enquanto em outros isolados a substituição do ácido glutâmico no codon 198 pela lisina estava implicada (CHUNG et al., 2006).

5.2. Resistência a triazóis

Esteróis são constituintes essenciais na membrana celular de fungos, regulando sua estabilidade e permeabilidade, portanto a biossíntese de esterol é um alvo importante na inibição do crescimento fúngico. Fungicidas DMI inibem a demetilação do esterol C14 durante o processo de formação de esterol em fungos. A demetilação do lanosterol C14 é mediada por uma função mista de citocromo oxigenase P450, que é uma espécie de hemoproteína. DMIs ligam-se ao ferro do citocromo P450 por um átomo de nitrogênio e inibem a ligação de O₂ e sua transferência para o grupo metílico lanosterol C14, que é a principal fase no processo de demetilação do lanosterol C14. A inibição da demetilação resulta no desequilíbrio entre as membranas lipídicas, com a inibição da acumulação de fosfolípidos e ácidos graxos livres que atingem níveis tóxicos aos fungos (KUCK; STENZEL; VORS, 2012; ZIOGAS; MALANDRAKIS, 2015).

Fungicidas inibidores da demetilação (DMI) fazem parte de um importante grupo de compostos comercialmente bem-sucedido. Estes fungicidas pertencem à classe dos triazóis, imidazóis, piperazinas, pirimidinas e piridinas, sendo recomendados no controle de ascomicetos, basidiomicetos e fungos imperfeitos. Os triazóis são fungicidas orgânicos com ação acropetal, possuem alta fungitoxicidade, rápida penetração e translocação nos tecidos da planta. Os princípios ativos mais importantes do grupo dos triazóis incluem ciproconazol, difenoconazol, flutriafol, propiconazol, tebuconazol, triadimefon e triadimenol (KUCK; STENZEL; VORS, 2012; ZAMBOLIM; VENÂNCIO; OLIVEIRA, 2007; ZIOGAS; MALANDRAKIS, 2015).

Desde a década de 1970, mais de 40 moléculas de DMI foram introduzidas na agricultura para controlar um vasto número de patógenos, dominando o mercado de fungicidas agrícolas (ZIOGAS; MALANDRAKIS, 2015). No entanto, devido ao uso

intensivo de DMIs, já na década de 1980 começaram a ocorrer problemas de controle em certas populações de patógenos (MA; MICHALIDES, 2005).

Estudos sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos na resistência a DMIs relatam uma variedade de modelos para aquisição de resistência: (a) a sobrevivência de células mutantes com esteróis metílicos C14 anormais nas suas membranas plasmáticas (deficiência na demetilação C14); (b) diminuição na acumulação intracelular do fungicida mediada pelo aumento do efluxo do fungicida dependente de energia; (c) modificação do sítio-alvo no gene demetilase C14 (*cyp51*), resultando em diminuição da afinidade a fungicidas; (d) superexpressão do gene-alvo durante a formação do ergosterol; e (e) múltipla *cyp51s*, que parece reduzir os custos de adaptabilidade associados com as alterações na estrutura de demetilase C14 ou superexpressão do gene codificante e aumento no espectro da resistência a fungicidas. Resultados de estudos bioquímicos e moleculares da resistência a DMIs parecem suportar a hipótese de que uma combinação dos mecanismos de resistência acima pode contribuir para a diminuição da eficácia desse grupo de fungicidas no campo (ZIOGAS; MALANDRAKIS, 2015).

O mecanismo mais conhecido que confere resistência a fungicidas DMI envolve mutações no gene *cyp51* e tem sido descrito para vários patógenos como *Botrytis cinerea* Pers. (ALBERTINI et al., 2002; ALBERTINI; LEROUX, 2004), uma substituição de Try por Phe na posição 136 (Y136F) foi encontrada para *Uncinula necator* (Schwein.) Burrill (DÉLYE et al., 1997) e também para *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* Jacz. (DÉLYE et al., 1998). Mutações em dois únicos nucleotídeos de *cyp51* resultando em substituições nos aminoácidos Y135F e K147Q em *Blumeria graminis* (DC.) Speer também foram encontrados (WYAND; BROWN, 2005). Diferentes mutações também foram relatadas em *Tapesia* sp (ALBERTINI; GRETT; LEROUX, 2003), *Penicillium italicum* Wehmer (JOSEPH-HORNE; HOLLOMON, 1997), *Ustilago maydis* (DC.) Corda (BUTTERS et al., 2000) e *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx (MA et al., 2006).

Em *Penicillium digitatum* (Pers) Sacc, uma sequência única de 126 pares de bases (pb) na região promotora de *cyp51* foi repetida cinco vezes em isolados resistentes e foi encontrada somente uma repetição nos isolados sensíveis. Isso forneceu um método rápido e fácil de detectar isolados de *P. digitatum* resistentes a DMI (HAMAMOTO et al., 2001). Inserções na região promotora também foram encontradas em *B. jaapii* (MA et al., 2006), *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter (SCHNABEL; JONES, 2001) e em *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey (LUO et al., 2008). Recentemente, outra inserção de 199 pb foi encontrada em

P. digitatum nos genes *cyp51A* (GHOSOPH et al., 2007) e PdCYP51B (SUN et al., 2011; SÁNCHEZ-TORRES; TUSET, 2011) levando a fenótipos resistentes (CAPOTE et al., 2012).

Um aumento nos níveis de *cyp51* mRNA tem sido associado com a inserção de elementos transponíveis na região promotora upstream de *cyp51* em vários patógenos. Um elemento de 126 pb ou 199 pb em *P. digitatum* (HAMAMOTO et al., 2000; SUN et al., 2013), uma inserção de 553 pb em *V. inaequalis* (SCHNABEL; JONES, 2001), um elemento repetitivo (mona) de 65 pb em *M. fructicola* (LUO; SCHNABEL, 2008) e um retrotransposon de 1.3 Kb em *B. cinerea* (KRETSCHMER et al., 2009).

5.3. Resistência a estrobilurinas

Entre os fungicidas agrícolas, os pertencentes ao grupo dos inibidores da respiração são a segunda mais importante classe química, atrás apenas dos inibidores da demetilação (azoles). Esse sucesso de mercado baseia-se no amplo espectro de ação além dos efeitos benéficos na fisiologia da planta, deixando-as mais verdes e vigorosas (SIEROTZKI, 2015). Dentre os fungicidas inibidores da respiração, as estrobilurinas destacam-se pelo volume comercializado em nível mundial. O princípio ativo azoxistrobina foi lançado em 1997 e domina o mercado mundial das estrobilurinas (SAUTER, 2012)

As estrobilurinas são umas das poucas classes de fungicidas que podem controlar ascomicetos, basidiomicetos, fungos imperfeitos e também oomicetos, devido à inibição geral de uma fase central no metabolismo primário: o fluxo de elétrons na cadeia respiratória no centro Qo do complexo citocromo bc1 na mitocôndria. Esse bloqueio no fluxo de elétrons leva a uma deficiência de energia devido à falta de ATP nas células fúngicas. Respiração mitocondrial é importante em todos os estádios de vida dos fungos, que são altamente dependentes de energia, como a germinação de esporos ou movimento de zoósporos (SIEROTZKI, 2015). O modo de ação específico de inibição QoI (quinone outside inhibitor) demonstra o potencial para desenvolvimento de resistência a estes fungicidas. Os dois principais mecanismos de resistência a fungicidas QoI são a expressão da respiração alternativa e mutações que mudam o sítio-alvo do citocromo b. A respiração alternativa requer a ativação da oxidase alternativa (AOX), uma enzima codificada por um gene nuclear e importada para o interior das membranas da mitocôndria. Resistência a QoIs também podem ser baseadas em pontos de mutação, sendo a principal no G143A que tem como efeito uma elevada resistência nas populações em campo, enquanto que as mutações F129L e G137R podem causar resistência, mas em menor relevância (SIEROTZKI, 2015).

As mutações G143A ou no F129L levam à completa perda ou a uma redução drástica na eficácia do fungicida (KIM et al., 2003; LESEMANN et al., 2006). Isolados monospóricos de *Podosphaera leucotricha* (Ellis & Everh.) E.S. Salmon, causadores de oídio da macieira, coletados de pomares comerciais, foram todos heteroplásmicos com respeito ao seu gene citocromo b mitocondrial e diferiram quanto à sensibilidade a estrobilurina. Reações de cadeia da polimerase (PCR) semi-quantitativa e análises de sequências polimórficas amplificadas clivadas, sugerem que a porção da mitocôndria carregando o G143A governa a resistência a estrobilurinas. Outro fato importante é que mesmo esses isolados sendo mantidos em condições controladas de ausência dos fungicidas, eles mantiveram a heteroplasmia do citocromo b e mostraram aumento nos níveis de resistência a estrobilurinas (DEISING et al., 2008; LESEMANN et al., 2006)

Outro mecanismo envolvendo a resistência à QoIs seriam os transportadores de efluxo que permitem que o fungo sobreviva à exposição a compostos tóxicos através da prevenção da acumulação destes dentro da célula fúngica. São proteínas ligadas à membrana que promovem proteção a vários compostos tóxicos e xenobióticos. A família dos transportadores de ligação de ATP (ABC) e a principal superfamília facilitadora (MFS) são as bombas de efluxo mais importantes envolvidas na proteção dos fungos contra os fungicidas (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008). O primeiro transportador de efluxo envolvido na resistência a QoI foi detectado em *A. nidulans*. Esse transportador ABC é codificado pelo gene *AtrB* e envolve a proteção contra a maioria das classes de fungicidas, incluindo as estrobilurinas (ANDRADE et al., 2000).

Mutações nem sempre são a explicação para resistência a fungicidas QoIs. Isolados de *Podosphaera fusca* (Fr.) U. Braun & Shishkoff apresentando alta resistência não apresentaram a mutação mais comum G143A e nem nenhuma outra no citocromo b. Uma hipótese seria uma mudança na proteína Rieske, no entanto, evidências do envolvimento dessa proteína na resistência a QoIs ainda não foram elucidadas (FERNÁNDEZ-ORTUÑO et al., 2008).

6. Resistência a fungicidas em *Lasiodiplodia theobromae*

Estudos envolvendo a análise da resistência a fungicidas em populações de *L. theobromae* são escassos em nível mundial. Em todos os estudos realizados até o momento foram utilizadas populações coletadas em pomares de mamoeiro no Nordeste brasileiro. Inicialmente, foi analisada a sensibilidade de isolados de *L. theobromae* aos fungicidas MBCs (benomil e tiabendazol) e DMIs (imazalil, procloraz e tebuconazol), bem como avaliados os

componentes de adaptabilidade aos fungicidas MBCs. Dentre os 120 isolados analisados, 8,4% apresentaram baixa sensibilidade aos MBCs ($CE_{50} > 100 \mu\text{g}$ de ingrediente ativo (i.a.)/ml), enquanto 91,6% foram sensíveis, com médias de CE_{50} de $0,08 \mu\text{g/ml}$ para benomil e $0,76 \mu\text{g/ml}$ para tiabendazol. Para os DMIs, as médias de CE_{50} foram $0,63 \mu\text{g/ml}$, $0,20 \mu\text{g/ml}$ e $0,49 \mu\text{g/ml}$ para imazalil, procloraz e tebuconazol respectivamente. Os valores de CE_{50} para os isolados não sensíveis a DMIs foram significativamente maiores que para os isolados sensíveis. Não houve evidência de resistência múltipla, mas foi constatada resistência cruzada dos isolados para os MBCs. Nenhuma evidência sólida foi encontrada para custos adaptativos relacionados com os isolados não sensíveis aos MBCs, pois o crescimento micelial em meio de cultura sem fungicida e a virulência em frutos de mamão foram semelhantes aos dos isolados sensíveis (PEREIRA et al., 2012).

Em outro estudo, foi estimada a sensibilidade das populações de *L. theobromae* à tiofanato metílico e analisados componentes de adaptabilidade. Dos 109 isolados utilizados, 20,2% foram resistentes ao fungicida com $CE_{50} > 300 \mu\text{g/ml}$, enquanto 79,8% foram sensíveis, com média de $CE_{50} = 1,87 \mu\text{g/ml}$. Em relação aos componentes de adaptabilidade, houve diferença entre isolados sensíveis e resistentes somente na produção de esporos, pois estes últimos apresentaram uma capacidade de esporulação significativamente menor, indicando um custo de adaptabilidade (CAVALCANTE et al., 2014).

Recentemente, 107 isolados de *L. theobromae* foram avaliados quanto à sensibilidade a difenoconazol, bem analisados componentes de adaptabilidade, estabilidade da resistência e eficácia de controle da doença em frutos de mamão. Valores de CE_{50} maiores que $10 \mu\text{g/ml}$ ocorreram em 2,8% dos isolados, enquanto que 64,5% dos isolados apresentaram CE_{50} entre 0,01 e $1,00 \mu\text{g/ml}$. O valor de CE_{50} médio para os isolados menos sensíveis ($7,27 \mu\text{g/ml}$) foi significativamente mais elevado do que para isolados sensíveis ($0,10 \mu\text{g/ml}$). Não foram observadas alterações significativas na sensibilidade a difenoconazol para isolados sensíveis e menos sensíveis após 10 transferências sequenciais para meio de cultura sem fungicida. Difenoconazol apresentou baixa eficácia no controle de isolados menos sensíveis em frutos de mamão. Não foi encontrada diferença entre isolados sensíveis e menos sensíveis para os componentes da adaptabilidade, indicando que não houve custo adaptativo para os isolados menos sensíveis (BANDEIRA et al., 2016).

Até o momento, inexistem estudos em nível mundial sobre a sensibilidade de *L. theobromae* a azoxistrobina, bem como sobre os mecanismos moleculares associados à resistência aos principais grupos de fungicidas. Portanto, esta tese teve como objetivos: (a) analisar a sensibilidade de populações de *L. theobromae* obtidas de mamão no Nordeste

brasileiro a azoxistrobina; (b) investigar os mecanismos moleculares associados às reações de sensibilidade e não sensibilidade dos isolados de *L. theobromae* de mamão aos fungicidas tiofanato metílico, difenoconazol e azoxistrobina.

Referências Bibliográficas

AGRIANUAL 2015. **Anuário da agricultura brasileira**. Informa Economics South America FNP, 2015. 504 p.

ALBERTINI, C.; GREDET, M.; LEROUX, P. Mutations of the β -tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. **Pesticide Biochemistry Physiology**, San Diego, v. 64, p. 17-31, 1999.

ALBERTINI, C.; GREDET, M.; LEROUX, P. Polymorphism of the 14 α -demethylase gene (*cyp51*) in the cereal eyespot fungi *Tapesia acuformis* and *Tapesia yallundae*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 117-128, 2003.

ALBERTINI, C.; LEROUX, P. A. *Botrytis cinerea* putative 3-keto reductase gene (ERG27) that is homologous to the mammalian 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7 genes (17 beta-HSD7). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n.7, p.723-733, 2004.

ALBERTINI, C.; THEBAUD, G.; FOURNIER, E.; LEROUX, P. Eburicol 14 α -demethylase gene (*cyp51*) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 106, p. 1171-1178, 2002.

ANDRADE, A. C.; DEL SORBO, G.; NISTELROY, J. G. M.; DE WAARD, M. A. The ABC transporter from *Aspergillus nidulans* is involved in resistance to all major classes of fungicides and natural toxic compounds. **Microbiology**, Reading, v. 146, p. 1987-1997, 2000.

ANGELINI, R. M. M.; POLLASTRO, S.; FARETRA, F. Genetics of fungicide resistance. In: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer Japan, 2015. p. 13-34.

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, p. 643-651, 2010.

BANDEIRA, M. A.; TSUJI, S. S.; MARTINS, R. B.; SCHNABEL, S.; CÂMARA, M. P. S.; MICHEREFF, S. J. Sensitivity and fitness of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to difenoconazole and implications for disease management. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, 2016. (Submetido)

BARALDI, E.; MARI, M.; CHIERICI, E.; PONDRELLI, E.; BERTOLINI, P.; PRATELLA, G. C. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: Pathogenic fitness and genetic characterization. **Plant Pathology**, Oxford, v. 52, p. 362-370, 2003.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Epidemiologia comparativa entre os patossistemas temperado e tropical: conseqüências para a resistência a fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 119-127, 2001.

BRENT, K. J.; HOLLOMON, D. W. **Fungicide resistance: the assessment of risk**. 2. ed. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee, 2007. 53 p.

BUTTERS, J. A.; ZHOU, M.; HOLLOMON, D. W. The mechanism of resistance to sterol 14-demethylation inhibitors in a mutant (Erg40) of *Ustilago maydis*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, p. 257-263, 2000.

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.

CAVALCANTE, R. D.; LIMA, W. G.; MARTINS, R. B.; TOVAR-PEDRAZA, J. M.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S. Thiophanate-methyl sensitivity and fitness in *Lasiodiplodia theobromae* populations from papaya in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 140, p. 251-259, 2014.

CHUNG, W.; ISHII, H.; NISHIMURA, K.; FUKAYA, M.; YANO, K.; KAJITANI, Y. Fungicide sensitivity and phylogenetic relationship of anthracnose fungi isolated from various fruit crops in Japan. **Plant Disease**, St. Paul, v. 90, p. 506-512, 2006.

COOLEY, R. N.; CATEN, C. E. Molecular analyses of the *Septoria nodorum* β -tubulin gene and characterization of a benomyl-resistance mutation. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 237, p. 58-64, 1993.

CUNHA, M. G.; RIZZO, D. M. Development of fungicide cross resistance in *Helminthosporium solani* populations from California. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 798-803, 2003.

CUOMO, C. A.; GÜLDENER, U.; XU, J. R.; TRAIL, F. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen speciation. **Science**, Washington, v. 317, p. 1400-1402, 2007.

DANTAS, S. A. F.; OLIVEIRA, S. M. A. Doenças do mamão. In: OLIVEIRA, S. M. A.; TERAPO, 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. 695-729.

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**, Brasília, v. 28, p. 528-533, 2003.

DAVIDSE, L. C.; ISHII, H. Biochemical and molecular aspects of the mechanism of action of benzimidazoles, *N*-phenylcarbamates and *N*-phenylformamidoximes and the mechanism of resistance to these compounds in fungi. In: LYR, H. (Ed.). **Modern selective fungicides - properties, applications, mechanisms of action**. 2. ed. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1995. p. 305-322.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 286-295, 2008.

- DELP, C. J. Benzimidazole and related fungicides. In: LYR, H. (Ed.). **Modern selective fungicides** - properties, applications, mechanisms of action. 2. ed. Jena: Gustav Fischer Verlag, 1995. p. 291-303.
- DÉLYE, C.; BOUSSET, L.; CORIO-COSTET, M. F. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 α -demethylase (*cyp51*) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*, a “recalcitrant” fungus. **Current Genetics**, New York, v. 34, p. 399-403, 1998.
- DÉLYE, C.; LAIGRET, F.; COSTER, M. F. A mutation in 14 α demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 2966-2970, 1997.
- FAO. **Faostat**. Roma: Food and Agricultural Organization, 2016 [online]. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/home/E>>. Acesso em: 15 jan. 2016.
- FERNÁNDEZ-ORTUÑO, D.; TORÉS, J. A.; VICENTE, A.; PÉREZ-GARCIA, A. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. **International Microbiology**, Barcelona, v. 11, p. 1-9, 2008.
- FERREIRA, C. R. R. P. T.; VEGRO, C. L. R. Defensivos Agrícolas: em 2014, faturamento do segmento foi o destaque. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 10, n. 5, p. 1-7, 2015.
- FRAC. **Benzimidazoles**: resistance risk and current status. Brussels: Fungicide Resistance Action Committee, 2016 [online]. Disponível em: <<http://www.frac.info/expert-fora/benzimidazoles/resistance-risk-and-current-status>>. Acesso em: 15 jan. 2016.
- GHINI, R.; KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Jagariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 78 p.
- GHOSOPH, J. M.; SCHMIDT, L. S.; MARGOSAN, D. A.; SMILANICK, J. L. Imazalil resistance linked to a unique insertion sequence in the PdCYP51 promoter region of *Penicillium digitatum*. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 44, p. 9-18, 2007.
- HAMAMOTO, H.; HASEGAWA, K.; NAKAUNE, R.; LEE, Y. J.; MAKIZUMI, Y.; AKUTSU, K.; HIBI, T. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of sterol 14 α -demethylase gene (*cyp51*) in *Penicillium digitatum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3421-3426, 2000.
- HAMAMOTO, H.; NAWATA, O.; HASEGAWA, K.; NAKAUNE, R.; LEE, Y. J.; MAKIZUMI, Y.; AKUTSU, K.; HIBI, T. The role of the ABC transporter gene *PMR1* in demethylation inhibitor resistance in *Penicillium digitatum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 70, p. 19-26, 2001.
- HOLLOMON, D. W. Fungicide resistance: 40 years and still a major problem. In: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer Japan, 2015. p. 3-12.
- HOU, Y.; LOU, Q.; CHEN, C.; ZOU, M. Application of cleave PCR to the detection of a

point mutation (F167Y) in the β 2-tubulin gene of *Fusarium graminearum*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 67, p. 1124–1128, 2011.

ISHII, H. Stability of resistance. In: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer Japan, 2015. p. 35-48.

JOSEPH-HORNE, T.; HOLLOMON, D.W. Molecular mechanisms of azole resistance. **FEMS Microbiology Letters**, London, v. 149, p. 141-149, 1997.

KIM, Y.-S.; DIXON, E. W.; VINCELLI, P.; FARMAN, M. L. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. **Phytopathology**, St. Paul, v. 93, p. 891-900, 2003.

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

KONGTRAGOUL, P.; NALUMPANG, S.; MIYAMOTO, Y. Mutation at codon 198 of *Tub2* gene for carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* causing mango anthracnose in Thailand. **Journal of Plant Protection Research**, Poznan, v. 51, n. 4, p. 378-384, 2011.

KRETSCHMER, M.; LEROCH, M.; MOSBACH, A.; WALKER, A.; FILINGER, S.; MERNKE, D.; SCHOONBEECK, H.; PRADIER, J.; LEROUX, P.; WAARD, M. A.; HAHH, M. Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, e1000696, 2009.

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

KUCK, K. H.; STENZEL, K.; VORS, J-P. Sterol biosynthesis inhibitors. In: KRÄMER, W.; SCHIRMER, U.; JESCHKE, P.; WITSCHHEL, M. (Eds.). **Modern crop protection compounds**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012. p. 761-805.

LEE, M. H.; PAN, S.; NG, T.; CHEN, P.; WANG, L.; CHUNG, K. Mutations of β -tubulin codon 198 or 200 indicate thiabendazole resistance among isolates of *Penicillium digitatum* collected from citrus in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 150, p. 157–163, 2011.

LEROUX, P.; GREDET, M.; WALKER, A. S.; MOINARD, J. M.; CARON, D. Resistance of the wheat leaf blotch pathogen *Septoria tritici* to fungicides in France. In: DEHNE, H. W.; GISI, U.; KUCK, K. H.; RUSSELL, P. E.; LYR, H. (Eds.). **Modern fungicides and antifungal compounds IV**. Alton: The British Crop Protection Council, 2005. p. 115-124.

LESEMAN, S. S.; SCHIMPKE, S.; DUNEMANN, F.; DEISING, H. B. Mitochondrial heteroplasmy for the cytochrome *b* gene controls the level of strobilurin resistance in the

apple powdery mildew fungus *Podosphaera leucotricha* (Ell. & Ev.) E.S. Salmon. **Journal of Plant Disease and Protection**, Berlin, v. 113, p. 259-266, 2006.

LUO, C.; COX, K.D.; AMIRI, A.; SCHNABEL, G. Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, p. 1099-1103, 2008.

LUO, C. X.; SCHNABEL, G. The cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 359-366, 2008.

MA, Z.; FELTS, D.; MICHAILIDES, T. J. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, p. 66-74, 2003.

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, p. 853-863, 2005.

MA, Z.; PROFFER, T. J.; JACOBS J. L.; SUNDIN G. W. Overexpression of the 14 α -demethylase target gene (*cyp51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 2581-2585, 2006.

MA, Z.; YOSHIMURA, M. A.; HOLTZ, B. A.; MICHAILIDES, T.J. Characterization and PCR-based detection of benzimidazole-resistant isolates of *Monilinia laxa* in California. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, p. 449-452, 2005.

MAPA. **AGROFIT** - sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Brasília: Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2016 [online]. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 15 jan. 2016.

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

MCKAY, G. J.; EGAN, D.; MORRIS, E.; BROWN, A. E. Identification of benzimidazole resistance in *Cladobotryum dendroides* using a PCR-based method. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, p. 671-676, 1998.

MICHEREFF, S. J.; CORREIA, K. C. Manejo de doenças em fruteiras tropicais. In: COLMÁN, A.; BARROS, A. V.; MACHADO, F. J. (Eds.). **Doenças em espécies florestais e fruteiras**. Viçosa: Editora UFV, 2015. p. 36-53.

MILGROOM, M. G. **Population biology of plant pathogens**: genetics, ecology and evolution. St. Paul: APS Press, 2015. 399 p.

NAKAUNE, R.; NAKANO, M. Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of β -tubulin 1 gene regulated by putative leucine zipper protein

CaBEN1. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 44, p. 1324-1335, 2007.

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, v. 67, p. 127-141, 2014.

PAULL, R. E.; DUARTE, O. **Tropical fruits**. 2. ed. Wallingford: CAB International, 2011. 400 p.

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, p. 572-578, 2006.

PEREIRA, A. V. S.; MARTINS, R. B.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, M. B. DA; CÂMARA, M. P. S. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. **European Journal of Phytopathology**, Dordrecht, v. 132, p. 498-498, 2012.

REETZ, E. R.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; DRUM, M. **Anuário brasileiro da fruticultura 2015**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2015. 104 p.

REZENDE, J. M. A.; MARTINS, M. C. Doenças do mamoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. M. A.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO L. E. A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 435-443.

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, 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: NEFIT-UFLA (Ed.). **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2007. p. 107-127.

SAUTER, H. Strobilurins and other complex III inhibitors. In: KRÄMER, W.; SCHIRMER, U.; JESCHKE, P.; WITSCHERL, M. (Eds.). **Modern crop protection compounds**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2012. p. 584-627.

SCHNABEL, G.; JONES, A L. The 14 α -demethylase(*cyp51A1*) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, p. 102-110, 2001.

SHI, H.; WU, H.; ZHANG, C.; SHEN, X. Monitoring and characterization of resistance development of strawberry Phomopsis leaf blight to fungicides. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 135, n. 4, p. 655-660, 2013.

SIEROTZKI, H. Respiration inhibitors: complex III. In: ISHII, H.; HOLLOMON, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer Japan, 2015. p. 119-144.

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

SUN, X.; WANG, J.; FENG, D.; MA, Z.; LI, H. PdCYP51B, a new putative sterol 14 α -demethylase gene of *Penicillium digitatum* involved in resistance to imazalil and other fungicides inhibiting ergosterol synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, p. 1107-1119, 2011.

SUN, X.; XU, Q.; RUAN, R.; ZHANG, T.; ZHU, C.; LI, H. PdMLE1, a specific and active transposon acts as a promoter and confers *Penicillium digitatum* with DMI resistance. **Environmental Microbiology Reports**, Cambridge, v. 5, n. 1, p. 135-142, 2013.

TAVARES, S. C. C. H. **Principais doenças da mangueira e alternativas de controle: Informações técnicas sobre a cultura da manga no Semi-Árido Brasileiro**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995. 173p.

VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI, S. A. M. H. (Ed.). **Diseases of fruits and vegetables**. Dordrecht: Kluwer, 2004. v. 2, p. 261-268.

WALKER, A. S.; MICOUD, A.; RÉMUSON, F.; GROSMAN, J.; GREDT, M.; LEROUX, P. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould). **Pest Management Science**, Sussex, v. 69, p. 667-678, 2013.

WONG, F. P.; DE LA CERDA, K. A.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; MIDLAND, S. L. Detection and characterization of benzimidazole resistance in california populations of *Colletotrichum cereale*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 92, n. 2, p. 239-246, 2008.

WYAND, R. A.; BROWN, J. K. M. Sequence variation in the *cyp51* gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 42, p. 726-765, 2005.

YARDEN, O.; KATAN, T. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 83, n. 12, p. 1478-1483, 1993.

YOUNG, D. H. Anti-tubulin agents. In: ISHII, H.; HOLLON, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer Japan, 2015. p. 93-104.

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

ZHANG, L.; JIA, X.; CHEN, C.; ZHOU, M. Characterization of carbendazim sensitivity and trichothecene chemotypes of *Fusarium graminearum* in Jiangsu Province of China. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 84, n. 1, p. 53-60, 2013.

ZIOGAS, B. N.; MALANDRAKIS, A. A. Sterol biosynthesis inhibitor: C14 demethylation (DMIs). In: ISHII, H.; HOLLON, D. W. (Eds.). **Fungicide resistance in plant pathogens**. Tokyo: Springer Japan, 2015. p. 199-216.

Capítulo II

Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya to azoxystrobin and thiophanate-methyl and investigation of molecular mechanisms of resistance

Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya to azoxystrobin and thiophanate-methyl and investigation of molecular mechanisms of resistance

Susan Satie Tsuji, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil; **Mengjun Hu** School of Agricultural, Forest & Environmental Sciences, Clemson University, Clemson, SC, USA; **Moara Alexandrino Bandeira**, **Marcos Paz Saraiva Câmara**, **Sami Jorge Michereff**, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil; and **Guido Schnabel**, School of Agricultural & Environmental Sciences, Clemson University, Clemson, SC, USA.

Corresponding author: G. Schnabel, E-mail: schnabe@clemson.edu

ABSTRACT

Stem-end rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* is one of the most devastating diseases of papaya in northeastern Brazil and management is dependent on fungicide applications. Sensitivity to quinone outside inhibitor (QoI) azoxystrobin was determined by inhibition of mycelial growth on fungicide-amended media. The EC₅₀ values for azoxystrobin ranged from 0.35 to 10 µg/ml, 10 to 90 µg/ml and >300 µg/ml, for sensitive (S), moderately resistant (MR), and highly resistant (HR) isolates, respectively. The majority of MR isolates were from Goiana. Sequence analysis of the cytochrome b (*cytb*) gene from isolates sensitive, medium resistant, and resistant to azoxystrobin did not reveal nucleotide variations. A partial fragment of the β-tubulin (*tub2*) gene was cloned from isolates sensitive or resistant to the methybenzimidazole carbamate (MBC) thiophanate methyl and the E198K mutation was identified in resistant isolates. The majority of thiophanate-methyl-resistant isolates were from Parnamirim and São José do Mipibu; only one resistant isolate was from Juazeiro. The emergence of *L. theobromae* isolates resistant to MBC and QoI fungicides in some regions of Brazil needs to be considered when designing stem end rot management strategies in papaya orchards.

RESUMO

Podridão peduncular causada por *Lasiodiplodia theobromae* é uma das doenças de mamão mais importantes no Nordeste do Brasil, e o manejo é dependente de aplicações de fungicida. A sensibilidade de azoxistrobina, um inibidor de quinona, foi determinada pela inibição do crescimento micelial do fungo em placas de Petri contendo meio de cultura com fungicida. Os valores da CE₅₀ para azoxistrobina variaram de 0.35 a 10 µg/ml, 10 a 90 µg/ml e >300 µg/ml, para os isolados sensíveis, moderadamente resistentes e altamente resistente respectivamente. A maioria dos isolados moderadamente resistentes foram provenientes de Goiana. Análises de sequências do gene citocromo b (*cytb*) dos isolados sensíveis, moderadamente resistentes e altamente resistente a azoxistrobina, não revelaram variações nos nucleotídeos. Um fragmento do gene β-tubulina (*tub2*) foi clonado de isolados sensíveis ou resistentes a tiofanato metílico, um fungicida metil benzimidazol carbamato (MBC) e a mutação E198K foi encontrada nos isolados resistentes. A maioria dos isolados resistentes a tiofanato metílico foram provenientes de Parnamirim e São José do Mipibu; somente um isolado resistente foi encontrado em Juazeiro. A emergência de isolados resistentes de *L. theobromae* aos fungicidas MBC e QoI em algumas partes do Brasil precisa ser levada em consideração ao se desenvolver estratégias de manejo da podridão peduncular nos pomares de mamão.

INTRODUCTION

The Brazilian annual production of papaya (*Carica papaya* L.) corresponds to about 13% of overall global production, which in 2014 was equivalent to 1.6 million tons, placing the country as the second-largest producer of papaya worldwide, only trailing India which produces about 5 million tons annually (FAO 2016). The Northeast region accounts for most (60.4%) of the Brazilian papaya production and most (about 0.7 million tons) is produced in the state of Bahia (IBGE, 2016).

Several factors can negatively influence the papaya production, including diseases caused by plant pathogenic fungi (Paull and Duarte 2010). The importance of specific papaya diseases varies according to the region where they are grown, climatic conditions, management of the orchard, inoculum density and the final destination of production for internal or external market (Ventura et al. 2004). Stem-end rot, caused by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., is one of the most devastating diseases of papaya in Brazil. It causes production losses and reduction in the commercial value of the fruit (Dantas and Oliveira 2006; Netto et al. 2014; Pereira et al. 2012). In periods of high rainfall, the disease incidence on fruit harvested from orchards that do not adopt any control measures may reach 100% (Santana et al. 2007). Silva et al (2002) found the stem-end rot was responsible for 17% of losses in Formosa group and 24% of losses in Sunrise Solo group (Silva et al. 2002) during papaya marketing phase in Brazil.

Stem-end rot of papaya starts in the field, where the pathogen is established in immature fruit and remains quiescent until favorable conditions occur to initiate the infection process. Symptoms begin in the stem-end region and advance across the entire surface within 7 days depending on environmental conditions. The affected tissues look wet in the beginning and the lesions become dark brown, and being covered by a gray mycelium under high

humidity conditions (Dantas and Oliveira 2006; Ventura et al. 2004). Moreover, *L. theobromae* is able to infect the trunks of the papaya in the mid region, which in worst case scenarios can lead to the destruction of entire orchards (Viana et al. 2007).

The management of papaya stem-end rot consists of practices to prevent infection and delay symptoms development, which extends from the field to postharvest. The measures include application of fungicides during fruit development and postharvest, postharvest heat treatment by immersion of fruit in hot water, and storage the fruit at low temperature (Dantas and Oliveira 2006; Santana et al. 2007; Ventura et al. 2004). No fungicide is registered for stem end rot disease, but thiophanate-methyl (MBC group) and azoxystrobin (quinone outside inhibitor - QoI group) are often applied in papaya orchards located in Northeastern Brazil for the control of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., black spot caused by *Asperisporium caricae* (Speg) Maulb), and oidium caused by *Oidium caricae* Noack (Bandeira et al., *unpublished*; Cavalcante et al. 2014; MAPA 2016; Pereira et al. 2012). These products provide suppressive action against stem end rot (Cavalcante et al. 2014; Durgadevi et al. 2014; Li et al. 1995).

Thiophanate-methyl and azoxystrobin are prone to resistance development due to their site-specific modes of action. MBC fungicides act in the mitosis and cell division by binding to β -tubulin subunits to inhibit the microtubule assembly and QoI fungicides inhibit the electron transport in the mitochondrial cytochrome b complex. Single point mutations in the β -tubulin (*tub2*) and cytochrome b (*cytb*) genes may result in qualitative resistance (Ma and Michailides 2005; Sierotzki 2015; Young 2015). In a previous study, 20.2% of 109 *L. theobromae* isolates collected in papaya orchards in the Brazilian Northeast were resistant to thiophanate-methyl with effective concentration to inhibit 50% of mycelial growth (EC_{50}) greater than 300 $\mu\text{g/ml}$ (Cavalcante et al. 2014). Resistance to azoxystrobin has not been documented in *L. theobromae*. Therefore, the objective of this study was to characterize the

sensitivity of *L. theobromae* isolates from Brazilian papaya orchards to azoxystrobin, and to investigate the molecular basis of resistance to thiophanate-methyl and azoxystrobin.

MATERIAL AND METHODS

Fungal isolates. *L. theobromae* isolates were from papaya orchards in Northeastern Brazil. They were genetically identified to the species level previously using partial sequences of the elongation factor 1- α gene (EF1- α) and the internal transcript spacer regions ITS1 and ITS4 (Netto et al. 2014). The isolates are maintained at the Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” (CMM) at the Federal Rural University of Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil). Their origin and sensitivity to thiophanate-methyl was reported previously (Cavalcante et al. 2014) and was listed in this study for reader convenience with permission. The number of fungicide sprays per season for each location, EC₅₀ values and the phenotypic categories sensitive (S) and resistant (R) for thiophanate-methyl are indicated in table 3. S isolates were designated to have EC₅₀ values ranging from 0.88 to 6 μ g/ml and >300 μ g/ml for R isolates. Papaya growers used MBCs, QoIs, demethylation inhibitors (DMIs) and copper-based materials during the season to control leaf spots and fruit diseases.

In vitro sensitivity to azoxystrobin in *L. theobromae* isolates. Sensitivity to azoxystrobin was assessed in 66 isolates of *L. theobromae* from papaya orchards located in Juazeiro, Amaragi, Goiana, Santa Rita, Conde, Parnamirim and São José do Mipibu (Fig. 1). All orchards received at least two applications of thiophanate-methyl per year and zero to three applications of azoxystrobin per year for the two growing seasons prior to isolate sampling (Table 2). The active ingredient azoxystrobin was obtained as formulated compound (Amistar, 500 g/kg a.i., Syngenta Crop Protection, São Paulo, Brazil). The following final concentrations were used on fungicide-amended potato dextrose agar (PDA) medium: 0.01,

0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1 and 3 $\mu\text{g/ml}$. Salicylhydroxamic acid (SHAM) was added to azoxystrobin amended PDA at 77 $\mu\text{g/ml}$ to suppress the alternative oxidase pathway. Less-sensitive isolates were subjected to a second series of sensitivity assays involving PDA amended with azoxystrobin at 5, 10, 50, 100, 300 and 500 $\mu\text{g/ml}$.

For sensitivity assays, mycelial plugs (5 mm in diameter) were removed from the margins of 5-day-old cultures of *L. theobromae* and transferred to the center of plastic petri dishes (9 cm in diameter) with PDA amended with the different fungicide concentrations. Petri dishes containing PDA without fungicide were used as controls. Each isolate was tested in triplicates and the entire experiment was conducted twice. After a 48-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 EC_{50} was calculated for individual isolates by linear regressions of the mycelial growth inhibitions versus the \log_{10} transformation of the fungicide concentrations. One-way analyses of variance (ANOVA) of the EC_{50} values from two experiments showed that the two experiments did not differ statistically ($P > 0.05$); thus, the average EC_{50} values of two experiments for each isolate were used in the data analysis. Frequency distributions of the isolates between the intervals of EC_{50} values were established. Isolates were considered azoxystrobin-sensitive (S) if EC_{50} values were between 0.35 and 10 $\mu\text{g a.i./ml}$, moderately resistant (MR) between 10.01 and 90 $\mu\text{g a.i./ml}$, and highly resistant (HR) was $\geq 300 \mu\text{g/ml}$. Cross-resistance between azoxystrobin and thiophanate-methyl was assessed using the Pearson's correlation analysis using the EC_{50} values of each isolate observed in this study and previously reported EC_{50} values for thiophanate-methyl for the same isolates (Cavalcante et al. 2014). The mean EC_{50} values of the five populations were compared using the Fisher's LSD test ($P = 0.05$).

DNA extraction of fungal isolates. *L. theobromae* isolates were grown on PDA plates for 3 days at 25°C in the dark. Single agar plugs containing actively growing mycelium were taken from the periphery of the advancing colonies and transferred to 250-ml flasks containing 40 ml of potato dextrose broth (PDB). Flasks were shaken at 120 rpm for 48 h at 22 °C. The mycelium was then removed from the broth, rinsed under sterile deionized water, and genomic DNA was subsequently extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's instruction. The DNA concentrations were measured by a NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA).

Cloning of the β -tubulin and *cytb* genes of *L. theobromae* isolates. Both gene sequences were unknown prior to this study. Based on conserved sequences of β -tubulin genes from *Alternaria alternata* (HQ413316), *Colletotrichum gloeosporioides* (JX868539), *Phomopsis* sp. (HQ586910) and *Verticillium dahlia* (DQ166865), degenerate primers Tub_F1 and Tub_R1 (Table 2) were designed to amplify a β -tubulin gene fragment containing the codon 198 (Table 3). The *cytb* gene was cloned in a similar fashion. Two degenerate primers Dcytb_F1 and Dcytb_R1 (Table 2) were designed based on the sequences of conserved regions of the *cytb* gene from other filamentous fungi including *Botryotinia fuckeliana* (AB262969), *Cercospora beticola* (JQ360628), *Monilinia fructicola* (GQ304941) and *Blumeria graminis* (AJ293567) to amplify the corresponding fragment in *L. theobromae*. Fragment-specific primers Ncytb_F1 and Ncytb_R1 were designed based on the initial fragment sequence to amplify a slightly smaller fragment containing amino acid positions 129, 137, and 143 of *L. theobromae*.

All amplifications were performed using the T100™ Bio-Rad thermal cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) in a total volume of 25 μ l. The PCR mixtures contained 1 \times PCR buffer, 20 ng template DNA, 0.6 μ M of each primer, 200 μ M of each dNTP, 1 unit of Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA). The amplification parameters

for the β -tubulin gene consisted of an initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 35 cycles of 94°C for 40 seconds, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final elongation step of 72°C for 5 min. The parameters for amplification of the *cytb* gene was largely as described above, except that the annealing temperature were reduced to 50°C, and extension time was 1 min and 30 sec. PCR products were verified on 1% agarose gels in 1x Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (40 mM Tris acetate and 1 mM EDTA, pH 8,0). Unincorporated primers and dNTPs remaining in the PCR products were removed using ExoSAP-IT® reagent according to the manufacturer's instruction. Sequencing was conducted at Clemson University Genomics Institute (CUGI; Clemson, SC). Nucleotide sequences were assembled and aligned with DNASTAR software (DNASTAR, Inc., Madison, WI).

RESULTS

Sensitivity to azoxystrobin in *L. theobromae* isolates. The EC₅₀ values of all isolates investigated ranged from 0.36 μ g a.i./ml to 364.24 μ g a.i./ml, which was exactly the range found for population from Santa Rita and Conde. The range of all other populations was narrower and settled from slightly less than 1 to about 79 μ g/ml. Among the 66 field isolates, 40 (61%) were S, 25 (38%) were MR and only one isolate was HR to azoxystrobin. Sensitive and MR isolates coexisted in all location, except that S isolates were only found in Vale do Lório Farm in São José do Mipibu - RN. The HR isolate was found in Paraiba. Isolates from Santa Rita and Conde was more resistant compared to populations from Juazeiro and Amaragi ($P < 0.05$; table 1). No cross resistance ($P > 0.05$) was detected between EC₅₀ values for azoxystrobin and EC₅₀ values for thiophanate-methyl.

Mutation E198K confers resistance to thiophanate-methyl in *L. theobromae*. The primer pair Tub_F1/Tub_R1 amplified a 751-bp fragment of the β -tubulin gene from two sensitive

and a total of sixteen resistant isolates, including 1 isolate (2435) from location A and 15 isolates from location E. Sequencing analysis of the fragment revealed that a nucleotide change at the codon 198 from GAG (glutamic acid) to AAG (lysine) in all resistant isolates regardless of the origin of isolate (Fig. 2, Table 3).

Nucleotide sequence analysis of *cytb* gene. Degenerate primer pair Dcytb_F1/Dcytb_R1 amplified a 765-bp fragment of the *cytb* gene in *L. theobromae*. To facilitate PCR amplification and sequencing, specific primer pairs Ncytb_F1 and Ncytb_R1 was designed based on the initial fragment and used to amplify a 630-bp fragment of the *cytb* gene from seven *L. theobromae* isolates including three sensitive isolates (2172, 2239 and 2345), three moderately resistant isolates (2167, 2174 and 2180), and the highly resistant isolate 2190. The results indicate no sequence variations in this fragment for S, MR, and even HR isolates.

DISCUSSION

Originally considered a secondary disease that was managed with fungicides targeted to control anthracnose and black spot disease, stem end rot of papaya recently has become a difficult disease to manage, causing production losses and reducing the commercial value of the fruit (Dantas et al. 2003; Ventura et al. 2003; Pereira et al. 2012; Netto et al. 2014). Stem end rot of papaya fruit was observed in several commercial orchards in Northeastern Brazil in 2007 and 2008. In vitro tests revealed *L. theobromae* isolates S and HR to thiophanate-methyl (Cavalcante et al. 2014) and isolates S, MR and HR to azoxystrobin (this study). To our knowledge this is the first report of resistance to azoxystrobin in this plant pathogen. Although it appears that resistance is not yet widespread, this study provides solid evidence however, that resistance emerged and is being selected.

Phenotypes MR and HR to azoxystrobin were identified, with EC₅₀ values between 10.01 to 90 µg/ml or >300 µg/ml, respectively. MR isolates were more commonly found, however, and HR isolates appear to be rather rare based on our limited dataset. Whether MR and the one HR isolate would be non-controllable with current label rates of formulated product was not investigated in this study. For some fungi isolates MR to azoxystrobin were still controlled in the field using recommended label rates (Sierotzki et al. 2000). But for other pathogens such as *Podosphaera fusca* Fr.) U. Braun & Shishkoff, *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev (Ishii et al. 2001), *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt (Fraaije et al. 2005) and *Mycosphaerella fijiensis* M. Morelet (Sierotzki et al. 2000) isolates HR to QoI fungicides have proven to be associated with performance failure in the field.

The sixteen isolates selected from different geographical regions resistant to MBC fungicides were all found to possess the E198K mutation in the beta tubulin protein. This amino acid change is not as common as E198A, but it has previously been reported in *M. fructicola* (Koenraadt et al. 1992; Ma et al. 2003), *Penicillium digitatum* (Koenraadt et al. 1992), *B. cinerea* (Yarden and Katan 1993), *P. expansum* (Albertini et al. 1999) and *Colletotrichum cereale* (Wong et al. 2001). Mutations at codon 198 are associated with high levels of resistance to MBCs (Chen et al. 2014). The E198A mutation is the most commonly found mutation and has been described in important pathogens like *Monilinia fructicola* (Ma et al. 2003), *Botrytis cinerea* (Luck and Gillings 1995) and *Venturia inaequalis* (Koenraadt et al. 1992). Other mutations at codons 6, 50, 167, 198, 200 and 240 in *TUB2* gene may also result in MBC resistance (Ma and Michailides 2005; Young 2015). However, mutations at codon 198 and 200 are detected most frequently in field isolates (Albertini et al. 1999; Baraldi et al. 2003; Koenraadt et al. 1992; Ma and Michailides 2005; Young 2015). The fact that all isolates from all regions had the same mechanism of resistance may indicate a common

ancestor, but it is also possible that these isolates emerged independently in the various regions. A population genetics analysis of isolates in our collection might help answer this question in the future.

Sequence analysis of the *cytb* gene revealed that point mutations were not involved in conferring moderate or high resistance to QoI fungicides in our isolates and thus the mechanism of resistance remains unknown. In general, moderate and high levels of resistance to QoIs is conferred by point mutations in cytochrome b (*CYTB*) gene at the position 129 (Kim et al. 2003), 137 (Sierotzki et al. 2006) and 143 (Baumler et al. 2003; Ma et al. 2003; Sierotzki et al. 2000). Our fragment amplified from S, MR, and HR isolates covered all of these positions. While the G143A mutation in cytochrome b is associated with high levels of resistance to QoI fungicides in many pathogenic fungi, amino acid substitutions at codons 137 and 129 were shown to confer moderate resistance to QoIs (Gisi et al. 2002; Kim et al. 2003; Ma and Michailides 2005; Sierotzki et al. 2007). Other mechanism of resistance might explain the observed phenotype, such as alternative respiration mediated by the alternative oxidase (Tamura et al. 1999) or the activity of drug efflux transporters that prevent the accumulation of high concentrations of toxic compounds inside the fungal cells (Fernández-Ortuño et al. 2008). Efflux transporters involved in QoI resistance have been reported for plant pathogens such as *Mycosphaerella graminicola* (Roohparvar et al. 2007) and *Pyrenophora tritici-repentis* (Reimann and Deising 2005).

Although thiophanate-methyl and azoxystrobin are not registered for control of *L. theobromae* causing stem-end rot in papaya in Brazil, the frequencies of resistance to MBC and QoI could be explained with the fact that both fungicides are used for the control of other diseases in papaya such anthracnose and black spot disease.

The majority of MBC resistant isolates belonged to population from Parnamirim and São José do Mipibu and one isolate came from Juazeiro. Parnamirim and São José do Mipibu

are located in State of Rio Grande do Norte, which is the main area of papaya production for export in Brazil. In this region, MBC fungicides were and still are used widely for disease control, with at least four application of thiophanate-methyl-based products per season. Taking into account the occurrence of thiophanate-methyl resistance, and the likely high fitness of resistant isolates (Cavalcante et al. 2014), this fungicide must not be used for stem end rot any longer or should be used for other targets with caution in papaya orchards.

Chemical management of papaya diseases must consider the now documented resistance to MBC and QoI fungicides. Farmers need to be made aware of this threat and resistance management practices must be put in place to prolong the efficacy and usefulness of these products for primary and secondary pathogens such as *L. theobromae*. This is true for locations where resistance has already been identified and for locations that are now threatened by resistance either through migration of genotype or independent emergence. Although thiophanate-methyl and azoxystrobin are not registered for use in stem end rot, the emergence of field strains with resistance to these fungicides provide evidence that the fungus had been affected by the spray applications used to control other diseases in papaya. Monitoring the occurrence of MBC and QoI resistance in *L. theobromae* populations is an important component to development of an integrated management program for postharvest papaya diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE (IBPG-1297-5.01/11). We are thankful to Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Brazil) for the doctoral studentship (Ciência Sem Fronteiras) granted to S. S. Tsuji. M. P. S. Câmara and S.

J. Michereff also acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq research fellowships.

LITERATURE CITED

Albertini, C., Gredt, M., and Leroux, P., 1999. Mutations of the b-tubulin gene associated with different phenotypes of benzimidazole resistance in the cereal eyespot fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acutormis*. Pestic. Biochem. Physiol. 64, 17–23.

Bandeira, M. A., Tsuji, S. S., Martins, R. B., Schnabel, S., Câmara, M. P. S., and Michereff, S. J. 2016. Sensitivity and fitness of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to difenoconazole and implications for disease management. Eur. J. Plant Pathol. (submitted)

Baumler, S., Felsenstein, F.G., and Schwarz, G., 2003. CAPS and DHPLC analysis of a single nucleotide polymorphism in the cytochrome b gene conferring resistance to strobilurin in field isolates of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. J. Phytopathol. 151:149–152.

Cavalcante, R. D., Lima, W. G., Martins, R. B., Tovar-Pedraza, J. M., Michereff, S. J., and Câmara, M. P. S. 2014. Thiophanate-methyl sensitivity and fitness in *Lasiodiplodia theobromae* populations from papaya in Brazil. Eur. J. Plant Pathol. 140:251–259.

Chen, S. N., Shang, Y., Wang, Y., Schnabel, G., Lin, Y., Yin, L. F., and Luo, C. X. 2014. Sensitivity of *Monilinia fructicola* from peach farms in china to four fungicides and

characterization of isolates resistant to carbendazim and azoxystrobin. *Plant Dis.* 98:1555-1560.

Dantas, S. A. F., and Oliveira, S. M. A. 2006. Doenças do mamão. Pages 695–729 in: *Patologia Pós-Colheita: Frutas, Olerícolas e Ornamentais Tropicais*. S. M. A. Oliveira, D. Terao, S. A. F. Dantas, S. C. C. H. Tavares, eds. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.

Dantas, S. A. F., Oliveira, S. M. A., Michereff, S. J., Nascimento, L. C., Gurgel, L. M. S., and Pessoa, W. R. L. S. 2003. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na Central de Abastecimento do Recife. *Fitopatol. Bras.* 28:528-533.

Durgadevi, D., Sankaralingam, A. and Prabhu, S. 2014. Impacto of fungicides and biocontrol agents in managing peduncle blight of tuberose caused by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. *Plant Pathol. J.* 13 (3):203-207.

FAO. 2016. Faostat. Food and Agricultural Organization. Resource database. <http://faostat3.fao.org/home/E>

Fernández-Ortuño, D., Torés, J. A., De Vicente, A., and Pérez-García, A. 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *Int. Microbiol.* 11:1–9.

Fraaije, B. A., Cools, H. J., Fountaine, J., Lovell, D. J., Motteram, J., West, J. S., and Lucas, J. A. 2005. Role of ascospores in further spread of QoI-resistant cytochrome b alleles (G143A) in field populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Phytopathology* 95:933–41.

FRAC. 2015. FRAC Code List © * 2015 : Fungicides Sorted by Mode of Action (including FRAC Code Numbering), 1–10. Online publication. [http://www.frac.info/publication/anhang/FRAC Code List 2015-update April-2015](http://www.frac.info/publication/anhang/FRAC%20Code%20List%202015-update%20April-2015).

Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., and McCaffery, A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo Inhibitor fungicides. *Pest. Manag. Sci.* 58:859–867.

IBGE. 2016. Est@dos: banco de dados. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Resource database. <http://www.ibge.gov.br/estadosat/>.

Ishii, H, Fraaije, B. A., Sugiyama, T., Noguchi, K., Nishimura, K., Takeda, T., Amano, T., and Hollomon, D. W. 2001. Occurrence and molecular characterization of strobilurin resistance in cucumber powdery mildew and downy mildew. *Phytopathology* 91:1166–1171.

Kim, Y., Dixon, E. W., Vincelli, P., and Farman, M. L. 2003. Field resistance to strobilurin (Q(o)I) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* 93:891–900.

Koenraadt, H., Somerville, S. C., and Jones, A. L. 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82:1348–1354.

Li, H., Cao, R., Mu, Y. 1995. In vitro inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop Prot.* 14:187-191.

Luck, J. E., and Gillings, M. R., 1995. Rapid identification of benomyl resistant strains of *Botrytis cinerea* using the polymerase chain reaction. *Mycol. Res.* 99:1483–1488.

Ma, Z., Felts, D., and Michailides, T. J. 2003. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pestc. Biochem. Physiol.* 77:66–74.

Ma, Z., and Michailides, T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 24:853–863.

MAPA. 2016. Agrofit - Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Resource database. http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.

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., and Câmara, M. P. S. 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Divers.* 67:127–41.

Paull, R. E., and Duarte, O. 2011. *Tropical Fruits*. 2nd ed. CAB International, Wallingford.

Pereira, A. V. S., Martins, R. B., Michereff, S. J., Silva, M. B., and Câmara, M. P. S. 2012. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *Eur. J. Plant Pathol.* 132:489–498.

Pereira, A. L., Silva, G. S., and Ribeiro, V. Q. 2006 Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. Fitopatol. Bras. 31:572–578.

Reimann, S., and Deising, H. B. 2005. Inhibition of efflux transporter-mediated fungicide resistance in *Pyrenophora tritici-repentis* by a derivative of 4'-hydroxyflavone and enhancement of fungicide activity. Appl Environ Microbiol 71:3269-3275

Roohparvar, R., De Waard, M., Kema, G. H. J., and Zwiers, L-H. 2007. MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*, is a strong protectant against natural toxic compounds and fungicides. Fungal Genet Biol 44:378-388

Santana, E. N., Martins, M. V. V., Lima, I. M., Costa, H., Ventura, J. A., and Vieira, P. 2007. Manejo das doenças do mamoeiro. Pages 107-127 in: Manejo integrado de doenças de fruteiras. Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Brasília.

Sierotzki, H. 2015. Respiration inhibitors: complex III. Pages 119-144. in: Fungicide Resistance in Plant Pathogens. H. Ishii, D. W. Hollomon, eds. Springer Japan, Tokyo.

Sierotzki, H., Frey, R., Wullschleger, J., Palermo, S., Karlin, S., Godwin, J., and Gisi, U. 2007. Cytochrome b gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. Pest Manag Sci 63:225–233

Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., and Gisi, U. 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc 1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Manag. Sci.* 56:833–841.

Silva, C. F. B., Michereff, S. J., Albuquerque, H. S., Silva, J. A., Oliveira, S. M. A., Dantas, S. A. F. 2002. Epidemiología de enfermedades fúngicas poscosecha en frutos de papaya. *Bol. Micol.* 17: 1-7.

Tamura, H., Mizutani, A., Yukioka, H., Miki, N., Ohba, K., and Masuko, M. 1999. Effect of the methoxyiminoacetamide fungicide, SSF129, on respiratory activity in *Botrytis cinerea*. *Pestic. Sci.* 55, 7, 681-686.

Ventura, J. A., Costa, H., and Tatagiba, J. S. 2004. Papaya diseases and integrated control. Pages 201-268 in: *Diseases of Fruits and Vegetables*, vol 2. S. A. M. H. Naqvi ed. Kluwer, Dordrecht.

Viana, F. M. P., Cardoso, J. E., Souza, R. N. M., and Holanda, V. O. 2007. Controle da Podridão-da-haste-do-mamoeiro no Estado do Ceará - Comunicado Técnico. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza.

Wong, F. P., de cerda, k. a., hernandez-martinez, r., and midland, s. l. 2001. detection and characterization of benzimidazole resistance in California populations of *Colletotrichum cereale*. *Plant Dis.* 92:239–946.

Yarden, O, and Katan, T. 1993. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 83:1478-1483.

Young, D. H. 2015. Anti-tubulin agents. Pages 93-104 in: *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. H. Ishii, D. W. Hollomon, eds. Springer Japan, Tokyo.

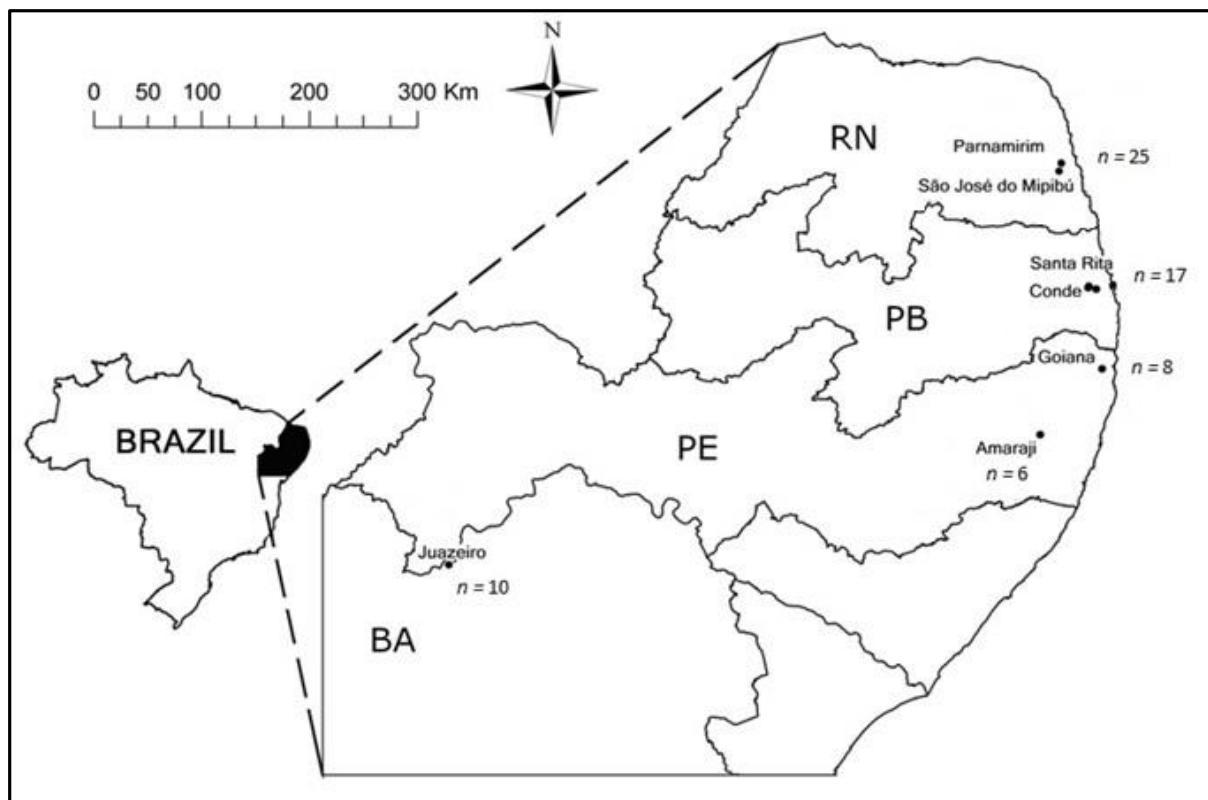


Fig 1. Collections sites of *Lasiodiplodia theobromae* isolates from Brazilian papaya orchards in states of Bahia (BA), Pernambuco (PE), Paraíba (PB) and Rio Grande do Norte (RN). The n corresponds to the number of isolates in each population.

Thiophanate-methyl Phenotype		codon 198
Sensitive	CMM 2236	CGTCCACCAGCTCGTTGAGAACTCGGACGAGACCTTCTGTATCGACAACGAGGTACGTGA
	CMM 2326	CGTCCACCAGCTCGTTGAGAACTCGGACGAGACCTTCTGTATCGACAACGAGGTACGTGA
Resistant	CMM 2345	CGTCCACCAGCTCGTTGAGAACTCGGACAAAGACCTTCTGTATCGACAACGAGGTACGTGA
	CMM 2167	CGTCCACCAGCTCGTTGAGAACTCGGACAAAGACCTTCTGTATCGACAACGAGGTACGTGA

Fig. 2. Nucleotide sequences of the partial β -tubulin gene for *Lasiodiplodia theobromae* isolates S or R to thiophanate-methyl. Nucleotides encoding amino acid 198 are boxed. Nucleotide in gray indicates mutation that caused the glutamic acid substitution for a lysine.

Table 1. Comparison of EC₅₀ values between isolates of *Lasiodiplodia theobromae* from papaya of five locations in Brazil

Location ^x	N ^o . of isolates	EC ₅₀ (µg/ml)	
		Range	Mean ^z
Juazeiro, BA	10	0.50 – 50.41	12.26 c
Amaraji, PE	6	0.98 – 79.18	15.62 bc
Goiana, PE	8	0.75 – 41.68	18.16 b
Santa Rita/Conde, PB	17	0.36 – 364.24	32.88 a
São José do Mipibu/Parnamirim, RN	25	0.54 – 71.25	13.92 c

^x City, state, as indicated in Fig. 1.

^z Values (µg/ml) 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 ($P=0.05$).

Table 2. Primers used in this study

Primer name	Sequence (5' - 3')	Description
Tub_F1	AGTATGGCAATCTTCTGAACG	To amplify and sequence partial fragment containing “hot spot” of beta tubulin gene
Tub_R1	TTGGGGTCGAACATCTGCTG	Same as Tub_R1
Dcyt_F1	TTAYWTACAYDSWAAYACWGCWTC	To amplify the ‘initial’ fragment of cytochrome b gene
Dcyt_R1	AAGGHACTATDATYAARAARTGKG	Same as Dcyt_F1
NCytb_F1	CTACAGCTTTCTTGGGTTATG	Specific primer designed based on the initial fragment to amplify and sequence fragment containing “hot spot” of cytochrome b gene’
NCytb_R1	TTGCACCTATTACCATTAAC	Same as NCytb_F1

Table 3. Sensitivity to azoxystrobin and thiophanate-methyl in isolates of *L. theobromae* from Northeast of Brazil papaya orchards

CMM ^x Isolate	Location ^y	Azoxystrobin (QoI)			Thiophanate-methyl (MBC)		
		EC ₅₀ (µg a.i./mL)	Sensitivity	Number of sprays/season ^z	Sensitivity	Number of sprays/season ^z	E198K mutation in <i>tub2</i>
2190	Santa Rita	>300	HR	2	S	4	-
2205	Conde	0.35	S	2	S	4	-
2206	Conde	7.50	S	2	S	4	-
2204	Conde	15.50	MR	2	S	4	-
2264	Goiana	0.75	S	-	S	2	-
2345	Juazeiro	0.50	S	-	R	3	Present
2326	Juazeiro	1.67	S	-	S	2	Absent
2337	Juazeiro	5.16	S	-	S	3	-
2335	Juazeiro	5.58	S	-	S	3	-
2322	Juazeiro	50.41	MR	-	S	3	-
2176	S. J. Mipibu	0.72	S	2	R	3	Present
2243	S. J. Mipibu	0.84	S	2	R	4	Present

CMM ^x Isolate	Location ^y	Azoxystrobin (QoI)			Thiophanate-methyl (MBC)		
		EC ₅₀ (µg a.i./mL)	Sensitivity	Number of sprays/season ^z	Sensitivity	Number of sprays/season ^z	E198K mutation in <i>tub2</i>
2179	S. J. Mipibu	1.04	S	2	R	3	Present
2177	S. J. Mipibu	1.06	S	2	R	3	Present
2183	S. J. Mipibu	1.12	S	2	R	3	Present
2306	S. J. Mipibu	1.72	S	2	R	4	Present
2309	S. J. Mipibu	1.92	S	-	R	4	Present
2239	S. J. Mipibu	1.94	S	2	S	2	-
2242	S. J. Mipibu	2.89	S	2	R	4	Present
2241	S. J. Mipibu	3.77	S	2	R	4	Present
2236	S. J. Mipibu	5.18	S	2	S	2	Absent
2244	S. J. Mipibu	9.69	S	2	R	4	Present
2180	S. J. Mipibu	11.49	MR	2	R	3	Present
2182	S. J. Mipibu	40.81	MR	2	R	3	Present
2172	Parnamirim	2.96	S	3	R	4	Present

CMM ^x Isolate	Location ^y	Azoxystrobin (QoI)			Thiophanate-methyl (MBC)		
		EC ₅₀ (µg a.i./mL)	Sensitivity	Number of sprays/season ^z	Sensitivity	Number of sprays/season ^z	E198K mutation in <i>tub2</i>
2167	Parnamirim	40.03	MR	3	R	4	Present
2174	Parnamirim	62.92	MR	3	R	4	Present

^x Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” at the Federal Rural University of Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil).

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

^z Numbers of sprays applied per season between 2006 and 2007 based on growers testimony. All growers report to have used thiophanate-methyl and azoxystrobin as formulated compounds Cercobin 700 WP (700 g/kg a.i., Iharabras, São Paulo, Brazil) and Amistar (500 g/kg a.i., Syngenta Crop Protection, São Paulo, Brazil), respectively.

Capítulo III

Mechanisms of difenoconazole resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya by comparing sequences and expression levels of *cyp51* gene

Mechanisms of difenoconazole resistance in *Lasiodiplodia theobromae* from papaya by comparing sequences and expression levels of *cyp51* gene

S. S. Tsuji^a, M. Hu^b, M. P. S. Câmara^a, G. Schnabel^b and S. J. Michereff^{a*}

^aDepartamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Brazil; School of Agricultural, Forest & Environmental Sciences, Clemson University, Clemson, SC 29634, USA

* Corresponding author: S. J. Michereff - e-mail: sami.michereff@ufrpe.br

Telephone number: +55 8133206208

Fax number: +55 8133206200

Abstract

The fungus *Lasiodiplodia theobromae* causes stem-end rot in papaya. It is one of the most important postharvest diseases of papaya in the northeastern Brazil. In our previous study, some single-spore isolates of *L. theobromae* were found to be moderately resistant (MR) to difenoconazole. Molecular mechanisms of resistance in *L. theobromae* to this fungicide were therefore studied in present study. As a result, no mutations were found in *cyp51* gene when compared MR and sensitive isolates, indicating other mechanism maybe responsible for the differential sensitivity of *L. theobromae* isolates to difenoconazole. However, *cyp51* was overexpressed in isolates high EC₅₀ value compared with isolates with low EC₅₀ values, but no insertions were found in the promoter region.

Keywords: Botryosphaeriaceae, *Carica papaya*, DMI fungicide, fungicide resistance, *cyp51*

Resumo

O fungo *Lasiodiplodia theobromae* causa a podridão peduncular no mamão. É uma das mais importantes doenças pós-colheita do mamão no Nordeste do Brasil. Em nosso estudo anterior, alguns isolados monospóricos de *L. theobromae* foram moderadamente resistentes (MR) a difenoconazol. Mecanismos moleculares de resistência de *L. theobromae* a esse fungicida foram investigados nesse estudo. Como resultado, não foram encontradas mutações no gene *cyp51* quando comparados os isolados moderadamente resistentes e os sensíveis, indicando que outros mecanismos podem ser responsáveis pela diferença de sensibilidade dos isolados de *L. theobromae* ao difenoconazol. Entretanto, a foi observada superexpressão de *cyp51* dos isolados com maiores valores de CE₅₀ quando comparados com isolados com baixa CE₅₀, mas não foram encontradas inserções na região promotora.

Palavras chave: Botryosphaeriaceae, *Carica papaya*, fungicida DMI, fungicide resistance, *cyp51*

Introduction

Brazil is the second-largest producer of papaya (*Carica papaya* L.) worldwide, with 1.6 million tons produced in 2014 (FAO, 2016). The Northeast region is responsible for 60.4% of the Brazilian papaya production (IBGE, 2016). Most papaya fruits are destined for fresh-market consumption and any morphological abnormality, especially lesions caused by pathogens, renders the fruit unsuitable for the retail market. Fruit rots caused by fungi are the most common diseases found in the markets (Dantas & Oliveira, 2006). Stem-end rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. is an important postharvest disease of this crop in Brazil, especially in the Northeast (Bandeira *et al.*, 2016; Dantas & Oliveira, 2006; Netto *et al.*, 2014; 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% (Santana *et al.*, 2007).

The *L. theobromae* infection occurs in immature fruit in the field and remains in a quiescent stage, without visual symptoms until have favorable conditions to initiate the host tissue colonization with the appearance of the typical stem-end rot symptoms. The disease symptoms begin in the stem and spread across the whole surface. In the peduncle, lesions cover a wide margin of tissue that gets drenched aspect, and its surface becomes rough due to pycnidia formation. The lesions become dark brown, and in high humidity conditions, are covered by a gray mycelium (Dantas & Oliveira, 2006; Ventura *et al.*, 2004). Moreover, *L. theobromae* is able to infect the trunks of papaya in the median region, which in severe cases can lead to the destruction of entire orchards (Viana *et al.*, 2007).

The management of papaya stem-end rot basically consists in practices to prevent the infection and delay the development of the symptoms. The papaya diseases control is based on frequently fungicide applications. The only fungicide registered for *L. theobromae* control in papaya is thiabendazole (methyl benzimidazole carbamate - MBC group) for postharvest treatments (MAPA, 2016). However, other active ingredients, including the demethylation inhibitor (DMI) fungicides difenoconazole and tebuconazole, are registered and applied in papaya orchards located in Northeastern Brazil to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., black spot caused by *Asperisporium caricae* (Speg) Maulb and powdery mildew caused by *Oidium caricae* Noack (Bandeira *et al.*, 2016; MAPA, 2016; Pereira *et al.*, 2012). Based on information from growers, difenoconazole has been historically more used than others DMIs in papaya orchards (Bandeira *et al.*, 2016).

Since the 1970s, more than 40 DMI molecules were introduced in agriculture to control a wide range of pathogens, dominating the agricultural fungicides market (Ziogas & Malandrakis, 2015). However, due to intensive use, resistance problems with the use of DMIs have been reported in several phytopathogenic fungi since the 1980s (Ma & Michailides, 2005; Hollomon, 2015).

DMI fungicides inhibit the sterol C14-demethylation during the process of sterol formation in higher fungi (Ziogas & Malandrakis, 2015). DMI resistance mechanisms include point mutations in the 14 α -demethylase (*cyp51*) gene, most frequently reported a single mutation leading to the substitution of phenylalanine for tyrosine at codon position 136 (Y136F) (Caña-Gutierrez, 2009; Chen *et al.*, 2012; Delye *et al.*, 1997; Wyand & Brown, 2005), the overexpression of *cyp51* gene (Chen *et al.*, 2012; Hamamoto *et al.*, 2000; Kretschmer *et al.*, 2009; Luo & Schnabel, 2008; Schnabel & Jones, 2001) and increase activity of ABC (ATP binding cassette) transporters (Kretschmer *et al.*, 2009; Luo & Schnabel, 2008; Nakaune *et al.*, 1998).

To date, only one study was conducted to evaluate the resistance of *L. theobromae* isolates to DMI fungicide. In a study, 109 isolates of *L. theobromae* from Brazilian papaya orchards were evaluated in relation to difenoconazole sensitivity, and EC₅₀ values higher than 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ occurred in 2.8% of the isolates, while 64.5% of the isolates had EC₅₀ values between 0.01 and 1.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$. The mean EC₅₀ value for the less sensitive (7.27 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was significantly higher than that for the most sensitive isolates (0.10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Bandeira *et al.* 2016).

To our knowledge, no reports have been published on the molecular basis of DMI fungicide resistance in *L. theobromae*. This information could improve in the development of detecting methods of DMI resistance in the field and in spray recommendations for papaya growers. The objective of this study was investigate the possible mechanisms of difenoconazole resistance in *Lasiodiplodia theobromae* isolates from papaya Brazilian orchards by comparing sequences and expression levels of *cyp51* gene from sensitive and resistant isolates.

Materials and methods

Fungal isolates

Isolates of *L. theobromae* collected from papaya orchards in Northeastern Brazil and 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) were used for this study. 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). Their origin and sensitivity to difenoconazole

was reported previously (Bandeira *et al.*, 2016) and is reported here again with permission. Furthermore, we list the number of fungicide sprays per season per location and the phenotypic categories sensitive (S) and moderately resistant (MR). The EC₅₀ values for S isolates were between 0.01 and 5.99 µg a.i. ml⁻¹ and for MR isolates were between 6.00 and 15.40 µg a.i. ml⁻¹. Six isolates belong to the category MR, three from location C, two from location D and one from location E. All other 60 isolates belong to the category S and they are distributed in all populations (A, B, C, D and E) (Fig. 1). In this study, the characterization and expression of *cyp51* gene was determined for three sensitive and three moderately resistance isolates (Table 1).

Extraction of genomic DNA

Fungal isolates were grown on potato dextrose agar (PDA) plates for 3 days at 25°C in the dark. Single agar plugs containing actively growing mycelium were taken from the periphery of the advancing colonies and transferred to 250-ml flasks containing 40 ml of potato dextrose broth (PDB). Flasks were shaken at 120 rpm for 48 h at 22°C. The mycelium was then removed from the broth, rinsed under sterile deionized water, and genomic DNA was subsequently extracted using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. The DNA concentrations were measured by a NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA).

Cloning of the *cyp51* gene of *L. theobromae* isolates

Degenerate primers CYP_F2 and CYP_R2 were designed (Table 2) based on conserved sequences of *cyp51* gene from *Aspergillus fumigatus* (AF222068), *Botryotinia fuckeliana* (AF296249), *Cercospora beticola* (JN399055), *Erysiphe necator* (KM077182), *Giberella zeae* (JN416622), *Monilinia fructicola* (GU136400), *Mycosphaerella graminicola* (GU144810), *Penicillium digitatum* (AJ439081), *Podosphaera fusca* (GQ292524), *Tapesia yallundae* (AF276661), *Uncinula necator* (AF042067), *Venturia nashicola* (AJ314649) and *Zymoseptoria tritici* (JN63940). This primer pairs were used to amplify a core fragment of the gene from isolates with differing phenotypes to investigate the molecular basis of resistance to difenoconazole in the different locations of Northeastern Brazil. The polymerase chain reaction (PCR) was performed in 25 µl volume containing 20 ng of fungal genomic template, 0.5 µM each primer, 200 mM each dNTP, 1x PCR buffer and 1 unit of Taq polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The PCR was performed in a T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) with the following parameters: an initial denaturation for 5 minutes at 94°C, followed by 35 cycles at 94°C for 1 minute, annealing at 50°C for 1 minute, extension at 72°C

for 1 minute, and terminated with a final extension at 72°C for 10 minutes. PCR products were verified on 1,5% agarose gels in 1x Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (40 mM Tris acetate and 1 mM EDTA, pH 8,0). Unincorporated primers and dNTPs remaining in the PCR products were removed using ExoSAP-IT® reagent (Affimetrix Co., Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Sequencing was conducted at Clemson University Genomics Institute (CUGI; Clemson, SC, USA).

The full length *cyp51* gene was obtained using the Universal GenomeWalker™ 2.0 kit (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA). DNA of isolate CMM2239 was individually digested using four restriction enzymes (DraI, EcoRV, PvuII and StuI). The adaptors (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGT-3') and (3'-H₂N-CCCGACCA-PO₄-5') were ligated to blunt ends of the digested fragments according to manufacturer's instructions, creating four GenomeWalker libraries. The libraries were storage at -20°C. The 5' and 3' ends of *cyp51* were amplified by PCR method for walking in the uncloned total DNA. Gene specifics primers were designed based on the previously obtained *cyp51* sequence fragment. The gene specific primers used to amplify the 3' end and 5' end are listed in Table. 2. Adaptor specific primers AP1 and AP2 were used for the first and the second rounds of PCR, respectively (Table 2). Reactions were performed in a total volume of 50 µl containing 2 µl of each Genome walking library (0.1 µg/µl), 39 µl deionized water, 5 µl 10X Advantage 2 PCR Buffer, 1 µl dNTP (10 µM each), 1 µl primer adaptor (10 µM), 1 µl gene specific primer (10 µM) and 1 µl Advantage 2 Polymerase Mix (50X) using the Advantage® 2 PCR Kit (Clontech). All PCR were performed in a T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad) and the products were verified on 1,5% agarose gels in 1x Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer (40 mM Tris acetate and 1 mM EDTA, pH 8,0). The PCR conditions for amplification were as follows: 7 cycles (first PCR) and 5 cycles (second PCR) at 94°C for 25 seconds and 72°C for 3 minutes, followed by 32 cycles (first PCR) and 20 cycles (second PCR) at 94°C for 25 seconds and 67°C for 3 minutes, and terminated with a final extension at 67°C for 7 minutes.

RNA isolation, cDNA synthesis

Mycelia of *L. theobromae* isolates were transferred into 125 ml erlenmeyers containing 50 ml of potato dextrose broth (PDB) and four glass beads (10 mm in diameter). The flasks were incubated at 28°C for 48 h with shaken to uniform mycelium growth. Mycelium was washed with sterile water and dried between filter papers. Approximately 300 mg of mycelium was pulverized in a mortar with liquid nitrogen and total RNA was isolated using Master Pure™ Yeast RNA Purification Kit (EpiCentre Pte. Ltd. Madison, WI, USA) according to

manufacture and quantified. The extraction procedures were performed at room temperature and the centrifugations were conducted at 4°C at 10,000 rpm. To the removal of genomic DNA from RNA preparations was used the Thermo Scientific Kit and quantified. cDNA was synthesized by using iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Real time PCR was used to quantify mRNA levels of *cyp51* gene in cDNA. The samples were stored at -80°C until further use.

Quantification of *cyp51* gene expression levels using real time PCR

Quantitative real time PCR was used to quantify cDNA levels *cyp51* with the primer pair Real-F1 and Real-R2. The expression levels of *cyp51* gene was normalized with the expression of elongation factor (*EF1-α*) gene by using the primer pair RT_EF_F1 and RT_EF_R1. All experiments were performed in a sequence detector using iQ™ SYBR Green I (Bio-Rad). The PCRs were amplified in triplicates in program: one cycle of polymerase activation and template denaturation at 95°C for 3 minutes, and 40 cycles at 95°C for 15 seconds, primer annealing at 58°C for 20 seconds and extension at 72°C for 30 seconds. The reactions were completed with a melting curve. Reactions were performed in iCycler thermal cycler (Bio-Rad). Two biological replicates were conducted using new cultures for RNA extraction. The comparative Ct method was chosen to determine *cyp51* expression relative to the expression of the sample with the least copies of *cyp51* using expression of elongation factor as housekeeping gene for normalizing the data. For each isolate, the Δ Ct value was determined by subtracting the average of elongation factor Ct from average *cyp51* Ct value. To calibrate the data, the $\Delta\Delta$ Ct was calculated for each isolate by subtracting the Δ Ct from the Δ Ct from isolate CMM 2324, which was chosen as a calibrator because it was shown to have low expression of *cyp51* and is sensitive to difenoconazole. The relative expression of *cyp51* was calculated according to the formula:

$$2^{-(\Delta\Delta Ct)} = 2^{-[(Ct_{cyp51} - Ct_{ef1\alpha})_x - (Ct_{cyp51} - Ct_{ef1\alpha})_y]}$$

“x” was the isolate of interest and “y” was the isolate CMM 2324.

Results

Identification and characterization of *cyp51*

A 566 bp fragment was amplified and sequenced with degenerate primers DegCYP_F2 and DegCYP_R2. No differences on nucleotide sequences were found between sensitive and moderately resistance isolates. The resulting *cyp51* gene was 1,793 bp in length and 524 bases upstream of the predicted start codon. No inserts on the promoter region were found. The nucleotide sequence of *cyp51* was 89% and 85% identical to *cyp51* genes from *Neofusicoccum parvum* and *Cercospora beticola*, respectively (GenBank Accession numbers XM_007581922.1 and JN399033.1)

***cyp51* gene expression in *L. theobromae* isolates**

For normalizing the *cyp51* expression data, the *EF1- α* gene from *L. theobromae* was used as housekeeping gene. Isolates with low EC₅₀ values had lower expression of *cyp51* compared with EC₅₀ values >6 μ g a.i./ml (Fig. 2). For example, *cyp51* fold change for S isolate CMM2237 was 0,81 and MR isolate CM2204 was 8,51. The addition of 1 ppm of difenoconazole to the PDB medium 5 hours before RNA was extracted from the mycelium did not increase the level of *cyp51* expression (data not shown).

Discussion

DMI fungicides are widely used to control several diseases in the field. Stem-end rot caused by *L. theobromae* is an important disease in postharvest in papaya fruits, especially in Brazilian northeastern. In papaya orchards of Brazil, DMI fungicides such difenoconazole and tebuconazole are registered to use in the control of anthracnose, black spot and powdery mildew. In a previous study, in vitro tests revealed *L. theobromae* isolates sensitive and moderately resistance to difenoconazole (Bandeira *et al.*, 2016). This moderately resistance may be attributed to the possibly continuous non-target exposures of the *L. theobromae* to this fungicide wide applications on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Asperisporium caricae* management in papaya orchards.

Since resistance to DMI fungicides could be related to polymorphisms in the promoter and the coding regions of *cyp51*, sequence diversity was accessed by sequencing nucleotides of *cyp51* coding and flanking regions. Point mutations at codon 136 have been related with DMI resistant isolates in the field for several fungi. Resistance to difenoconazole in *L. theobromae* is not due a mutation in gene encoding the target enzyme, at least to the moderately resistant isolates chosen for this study. This result goes in contrast with the results previously found in other important pathogens like *U. necator* (Delye *et al.*, 1997) and *P. digitatum* (Hamamoto *et al.*,

2000). Other fungi, such *Venturia nashicola* (Cools *et al.*, 2002) and *Tapesia yallundae* (Wood *et al.*, 2001), also showed no sequence changes in resistant isolates to DMI fungicides.

The overexpression of *cyp51* has been associated with DMI resistance in several pathosystems. In *P. digitatum*, the expression of *cyp51* is correlated with a tandemly repeat 126 bp sequence in the promoter region on DMI resistant isolates (Hamamoto *et al.*, 2000). Schnabel and Jones (2000) identified a presence of a 553 bp insertion located upstream of *cyp51A1* correlated with the high expression in isolates of *V. inaequalis* resistant to myclobutanil. Despite cloning 525 bp upstream of the *cyp51* ATG start codon, no promoter differences were found that correlated with difenoconazole sensitivity in *L. theobromae*. Similarly, Bolton *et al.* (2012) in a characterization of *CbCyp51* from field isolates of *C. beticola*, not found any mutations or haplotypes associated with DMI resistance, or any insertion located upstream region of *CbCyp51*. However, *CbCyp51* was overexpressed in isolates with high EC₅₀ values compared with isolates with low EC₅₀ values.

The resistance to DMI fungicides include several mechanisms like mutations in the *cyp51* gene, overexpression of the target gene leading to an excess of the CYP51 DMI target, the reduction of fungicide concentration inside the cell by increasing the activity of the ABC transporters or major facilitator superfamily (MFS) and multiples copies of *cyp51s* (Bolton *et al.*, 2012, Ma and Michailides, 2005, Ziogas and Malandrakis, 2015). Further studies are needed to investigate other possible mechanisms of *L. theobromae* resistance to DMIs.

In conclusion, in this study *cyp51* and the flanking regions were cloned and characterized, in sensitive and moderately resistant isolates. No mutations in the coding regions or insertions in the upstream region were found in *cyp51*. The overexpression of *cyp51* appears to play a role in DMI resistance of *L. theobromae* isolates. Since the moderately resistant isolates have high stability, no fitness penalties and difenoconazole showed low efficacy in controlling this isolates on *in vivo* test at label rate (Bandeira *et al.*, 2016), the monitoring of DMI sensitivity in *L. theobromae* population is essential for long term control of this important disease in the Northeastern Brazil papaya orchards.

Acknowledgements

This work was financially supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco - FACEPE (IBPG-1297-5.01/11). We are thankful to Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Brazil) for the doctoral studentship (Ciência Sem Fronteiras) granted to S.

S. Tsuji, M. P. S. Câmara and S. J. Michereff also acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq research fellowships.

References

- Bolton, M. D., Keshav, B., Rivera-Varas, V., Rudolph, K. D., & Secor, G. A. (2012). Characterization of CbCyp51 from field isolates of *Cercospora beticola*. *Phytopathology*, *102*, 298-305.
- Caña-Gutierrez, G. P., Patiño, L. F., Arango, E. R., & Arango, R. (2009). Molecular characterization of benomyl-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, collected in Colombia. *Journal of Phytopathology*, *154*, 403-409.
- Chen, F. P., Fan, J. R., Zhou, T., Liu, X. L., & Schnabel, G. (2012). Baseline sensitivity of *Monilinia fructicola* from China to the DMI fungicide SYP-Z048 and analysis of DMI-resistant mutants. *Plant Disease*, *96*, 416-422.
- Cools, H. J., Ishii, H., Butters, J. A., & Hollomon, D. W. (2002). Cloning and sequence analysis of the eburicol 14- α demethylase encoding gene (CYP51) from the Japanese pears scab fungus *Venturia nashicola*. *Journal of Phytopathology*, *150*, 444-450.
- Dantas, S. A. F.; & Oliveira, S. M. A. (2006). Doenças do mamão. In S. M. A. Oliveira, D. Terao, S. A. F. Dantas, S. C. C. H. Tavares. (Eds.), *Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais* (695-729). Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.
- Délye, C., Laigret, F., & CorioCostet, M. F. (1997). A mutation in the 14 α -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. *Applied Environmental Microbiology*, *63*, 2966-2970.
- FAO (2016). Faostat. (2016). Resourced document. Food and Agricultural Organization. <http://faostat3.fao.org/home/E>. Accessed on 15 January 2016.

- Hamamoto, H., Hasegawa, K., Nakaune, R., Lee, Y.J., Makizumi, Y., Akutsu, K., & Hibi, T. (2000). Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14 alpha-demethylase gene (*cyp51*) in *Penicillium digitatum*. *Applied Environmental Microbiology*, *66*, 3421–3426.
- Hollomon, D. W. (2015). Fungicide Resistance: 40 Years on and Still a Major Problem. In H. Ishii, D. W. Hollomon (Eds.), *Fungicide resistance in plant pathogens* (pp. 3-12). Tokyo: Springer Japan.
- IBGE (2016). Est@dos: Banco de dados. Resource document. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/estadosat/>. Accessed 15 January 2016.
- Kretschmer, M., Leroux, P., Mosbach, A., Walker, A. S., Fillinger, S., Mernke, D., Schoonbeek, H. J., Pradier, J. M., Leroux, P., De Waard, M. A., & Hahn, M. (2009). Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mold fungus *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, *5* (12), e1000696
- Luo, C. X., & Schnabel, G. (2008). Adaptation to fungicides in *Monilinia fructicola* isolates with different fungicide resistance phenotypes. *Phytopathology*, *98*, 230-238.
- Ma, Z., & Michailides, T. J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*, *24*, 853–863.
- MAPA. AGROFIT - Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. (2016) Resource document. Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Accessed on 15 January 2016.
- Nakaune, R., Adachi, K., Nawata, O., Tomiyama, M., Akutsu, K., & Hibi, T. (1998). A novel ATP-binding cassette transporter involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Applied Environmental Microbiology*, *64*, 3983–3988.

- 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. (2014). Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*, 67, 127-141.
- Pereira, A. V. S, Martins, R. B., Michereff, S. J., Silva, M. B., & Câmara, M. P. S. (2012). Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, 132, 489-498.
- Santana, E. N., Martins, M. V. V., Lima, I. M., Costa, H., Ventura, J. A., & Vieira, P. (2007). Manejo das doenças do mamoeiro. In: NEFIT-UFLA (Ed.), *Manejo integrado de doenças de fruteiras*. (pp. 107-127). Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia.
- Schnabel, G., & Jones, A. L. (2001). The 14a-Demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology*, 91, 102-110.
- Ventura, J. A., Costa, H., & Tatagiba, J. S. (2004). Papaya diseases and integrated control. In S. A. M. H. NAQVI (Ed.), *Diseases of fruits and vegetables*. (v. 2, pp. 261-268). Dordrecht: Kluwer.
- Viana, F. M. P., Cardoso, J. E., Souza, R. N. M., & Holanda, V. O. (2007). *Controle da podridão-da-haste-do-mamoeiro no estado do Ceará – Comunicado Técnico*. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical.
- Wyand, R. A., & Brown, J. K. M. (2005). Sequence variation in the CYP51 gene of *Blumeria graminis* with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 726-735.
- Wood, H. M., Dickinson, M. J., Lucas, J. A., & Dyer, P. S. (2001). Cloning of the CYP51 gene from the eyespot pathogen *Tapesia yallundae* indicates that resistance to the DMI fungicide prochloraz is not related to sequence changes in the gene encoding the target site enzyme. *FEMS Microbiology Letters*, 196, 183-187.

Ziogas, B. N., & Malandrakis, A. A. (2015). Sterol biosynthesis inhibitors: C14 demethylation (DMIs). In H. Ishii, & D. W. Hollomon (Eds.), *Fungicide resistance in plant pathogens* (pp. 198-216). Tokyo: Springer Japan.

Table 1. Effective difenoconazole concentration to inhibit 50% of mycelial growth (EC_{50}), phenotype classes, origin and history of fungicide exposure of six *Lasiodiplodia theobromae* isolates from Brazilian papaya orchards

CMM^a	EC_{50}	Phenotype^b	State^c	City/Farm	Number of
Isolate	($\mu\text{g a.i./ml}$)				sprays/season^d
2238	0.01	S	RN	São José do Mipibú/Fazenda Sol Nascente	3
2324	0.05	S	BA	Juazeiro/Mandacaru Lote 09	None
2237	0.07	S	RN	São José do Mipibú/Fazenda Sol Nascente	3
2191	10.69	MR	PB	Santa Rita/Fazenda Santo Antônio	2
2204	13.95	MR	PB	Conde/Mata da Chica I	2
2239	15.40	MR	RN	São José do Mipibú/Fazenda Sol Nascente	3

^a Culture Collection of Phytopathogenic Fungi “Prof. Maria Menezes” at the Federal Rural University of Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil)

^b Difenoconazole sensitivity classes. S = sensitive ($EC_{50} = 0.01\text{-}5.99 \mu\text{g a.i./ml}$), MR = MR = moderately resistant ($EC_{50} > 6 \mu\text{g a.i./ml}$)

^c BA = Bahia, PE = Pernambuco, PB = Paraíba (PB), RN = Rio Grande do Norte

^d Numbers of sprays applied per season between 2006 and 2007 based on growers’ testimony. All growers report to have used difenoconazole as formulated compound Score 250 EC ($250 \text{ g L}^{-1} \text{ a.i.}$, Syngenta Crop Protection, São Paulo, Brazil).

Table 2. Nucleotide sequence and characteristics of primers used in this study

Primers	5'->3' sequence	Description
Degenerate		
DegCYP_F2	CVAARYTVATGGARCARAARAAGT	To amplify and sequence
DegCYP_R2	GAMGARTGYTGDCCDGCCATNARHAG	partial fragment of <i>cyp51</i>
Genome walking		
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	Adaptor primer
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	Adaptor primer
5GSP1	CATCAATGGTGCCGATTTCCGCCCTTGAAG	Primers used in the nested
5GSP2	TGGACCTCGGAGGTGATCAGGTCGACGTA	PCR for 1° round of genome walking
3GSP4	AGGAGGAAGACATGATCTGGAACCTG	Primers used in the nested
3GSP5	TCGACGTACAAGAACGGCACTCCTCTG	PCR for 1° round of genome walking
UPGW1	ACGTTGAGGAAGATGGACGCGAAGAAG	Primers used in the nested
UPGW2	AACTTGACGGGTCCATGCCATAGGTG	PCR for 2° round of genome walking
UPGW3	TGTCCAGGCTGCGCTCCTAAATAATGTAC	Primers used in the nested
UPGW4	ATCCGTATGGGTATCTGACACGCCATGAAC	PCR for 3° round of genome walking
Specific primers 5'		
Cyp51_F1	AGCAGATCGGTACCTGCGTC	Specific primers designed to
Cyp51_R1	ATCGAATTTCTCACGCACC	amplify and sequence the 5'
Specific primers 3'		
Cyp51_F2	TTCGGCCTGACCAGCGACGC	Specific primers designed to
Cyp51_R2	TTCCGTGTGTGTGGTCTAG	amplify and sequence the 3'
Upstream		
UPCYP_F	GTGTCAGATACCCATACGGA	Specific primers designed to
UPCYP_R	TTGAGTGACAGTGGAGGCG	amplify and sequence the upstream region

Primers	5'->3'sequence	Description
Real time PCR		
Real-F1	TCTACACGGACATCATCAAGG	To perform the real time PCR
Real-R2	GCAATCATCATGCAAGCAATC	for <i>cyp51</i>
RT_EF_F1	GTGGTCTGAGGAGCGTTACC	To perform the real time PCR
RT_ER_R1	AACGGTCTTGGGGTTGTAGC	for housekeeping gene <i>EF1-α</i>

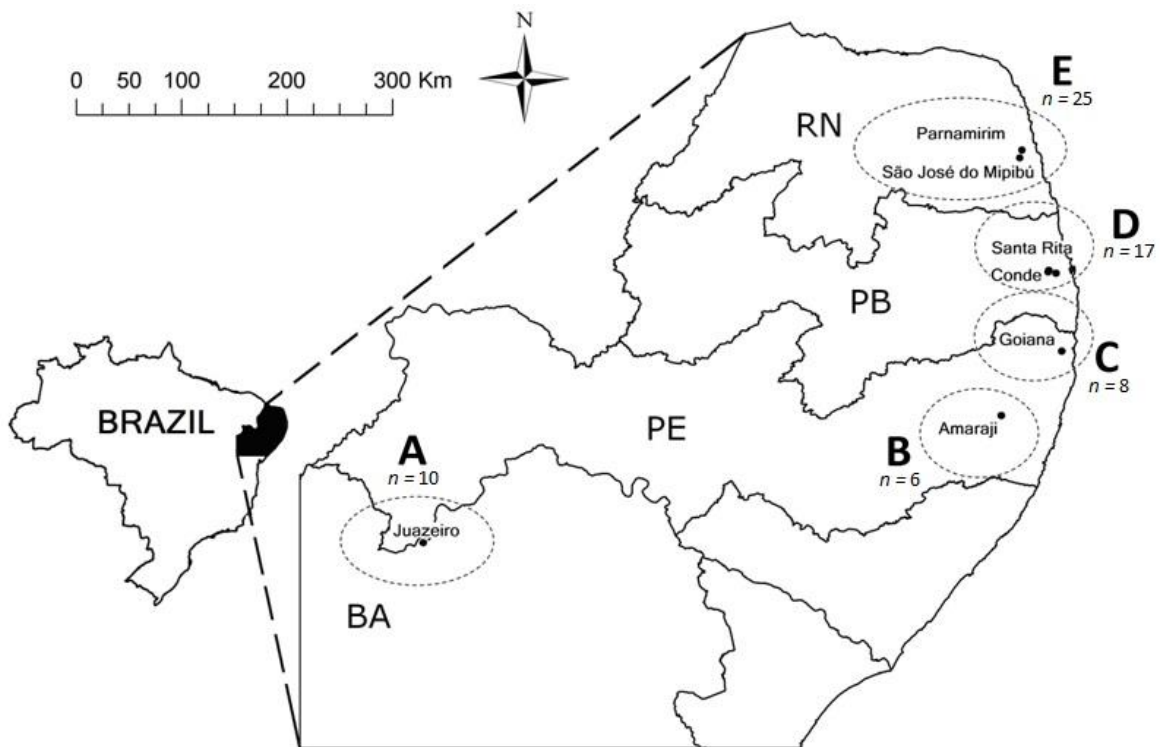


Fig. 1. Collection sites of *Lasiodiplodia theobromae* isolates from Brazilian papaya orchards in states of Bahia (BA), Pernambuco (PE), Paraíba (PB) and Rio Grande do Norte (RN). The letters correspond to coding attributed to the population and n=number of isolates in each population

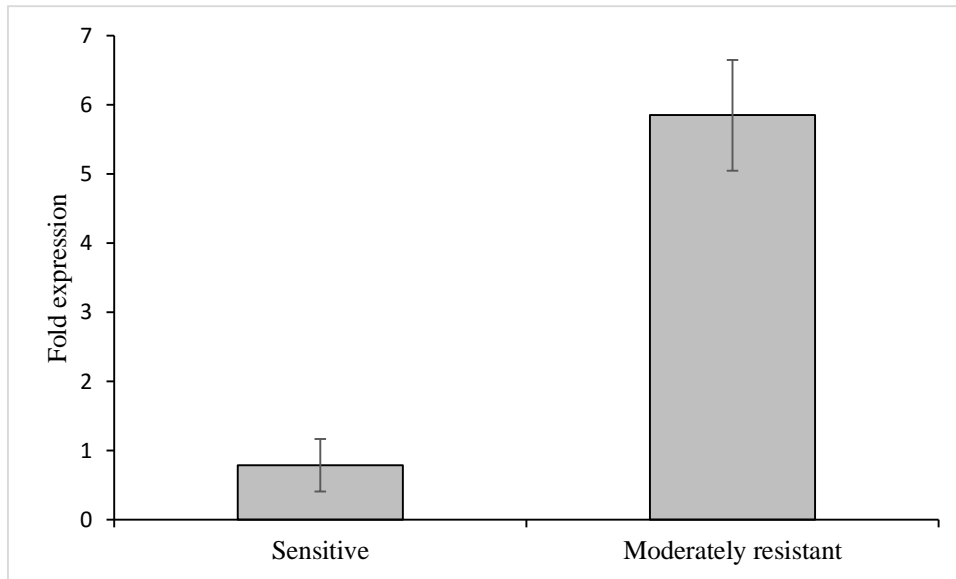


Fig 2. Expression levels of *cyp51* in *Lasiodiplodia theobromae* isolates sensitive and moderately resistant to difenoconazole determined by quantitative RT-PCR. The bars represent the standard error

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

1. As populações de *Lasiodiplodia theobromae* obtidas de pomares de mamoeiro do Nordeste brasileiro apresentaram diferentes níveis de sensibilidade ao fungicida azoxistrobina;
2. A presença de isolados moderadamente e altamente resistentes a azoxistrobina, indica a ocorrência de pressão de seleção sobre a população de *L. theobromae* por este fungicida utilizado para controle de outros patógenos na cultura do mamoeiro;
3. A mutação E198K no gene β -tubulina é a responsável pela resistência a tiofanato metílico em isolados de *L. theobromae* obtidos de pomares de mamoeiro do Nordeste brasileiro;
4. Pontos de mutação no gene citocromo b não são os responsáveis pelos diferentes perfis de sensibilidade a azoxistrobina em isolados de *L. theobromae* obtidos de pomares de mamoeiro do Nordeste brasileiro;
5. A superexpressão do gene *cyp51* é um dos mecanismos de resistência a difenoconazol em isolados de *L. theobromae* obtidos de pomares de mamoeiro do Nordeste brasileiro;